
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



INDUCCION DE ORGANIZADORES NUCLEOLARES (NOR'S)
EN CROMOSOMAS DEL CERDO DOMESTICO (*Sus Scrofa*).

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA
P R E S E N T A
GILBERTO GALINDO CASTRO

Asesor: M.V.Z. M.C. Rogelio Alonso Morales
GUADALAJARA, JAL. 1986

A mis padres y hermanos

Gracias por su apoyo

Mi agradecimiento a mi asesor y colaboradores:

Sr. M.V.Z. Rogelio A. Morales

Sr. M.V.Z. Daniel A. F. Villagomez

Sr. M.V.Z. Sergio L. Scheminiski B.

A mi H. Jurado

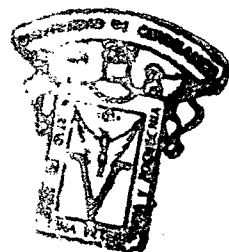
A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia U. de G.

Y

A quienes me impartieron sus cátedras

Gracias

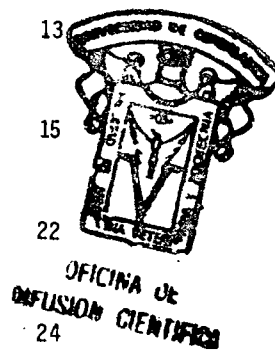
"INDUCCION DE ORGANIZADORES NUCLEOLARES (NOR's)
EN CROMOSOMAS DEL CERDO DOMESTICO (Sus Scrofa)"



OFICINA DE
GENETICA E INGENIERIA

I N D I C E

	PAGINA
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES CIENTIFICOS	6
III. OBJETIVO	12
IV. MATERIAL Y METODOS	13
V. RESULTADOS Y DISCUSIONES	15
VI. CONCLUSIONES	22
VII. RESUMEN	24
VIII. BIBLIOGRAFIA	25



I. INTRODUCCION

Con la teoría cromosómica de la herencia de Thaeamas Hunt Morgan, en la que postula que los cromosomas son los portadores de las características genéticas de los individuos, la genética recibe el primer impulso progresista. Posteriormente, se enriqueció asociando alteraciones cromosómicas con hallazgos clínicos así como la implantación de mejoras en las técnicas que redundaron en la mayor simplicidad y eficiencia de los análisis cromosómicos. (4)

El perfeccionamiento de las técnicas para la obtención de cariotipos, fue logrado primeramente por Hsu (1952), con el descubrimiento del choque hipotónico, así como el empleo de cultivos de tejidos por Tjio y Levan (1956), y el cultivo de linfocitos de sangre periférica utilizando colchicina y fitohemoaglutinina por Moorheat et al. (1960). Esto ha permitido reconocer la estructura y el número normal de los cromosomas en varias especies de animales. (1,4)

El verdadero desarrollo de la citogenética fue impulsado por la asociación de estados patológicos con desarreglos cromosómicos, tanto estructurales como numéricos. La citogenética en la medicina humana ha llegado a reconocer alteraciones en los cromosomas como causa de muerte temprana, retraso del desarrollo psicosomático,

malformaciones e infertilidad. (4, 12).

En contra parte, la citogenética animal ha evolucionado poco debido, en gran medida, a la falta de interés, tanto institucional como individual. Es importante dar el impulso a esta rama de la genética para la solución o esclarecimiento de las probables patologías cromosómicas involucradas en los problemas reproductivos, tales como intersexualidad, esterilidad, muerte embrionaria y defectos congénitos, en los animales domésticos. (4)

En el caso específico del cerdo, éste es un animal adecuado para la experimentación en medicina veterinaria así como en biomedicina, esto debido a sus características reproductivas (especie politoca) como por su bajo número diploide de cromosomas ($2n=38$), que pueden redundar en un mejor modelo en investigación para fines económicos, evolutivos ó científicos. (23)

La investigación citogenética del cerdo se inició con Wodselek (1913), reportando un número diploide de 16 en el macho y 18 en la hembra con un complemento sexual XX-X0. (21)

Hance (1919), reportó 40 cromosomas. Trabajos posteriores entre 1931 a 1944 reportan un número cromosómico de 38, con una dotación del complemento sexual XX en la hembra, XV en el macho.

Sin embargo, trabajos como el de Kronacher (1937), Sachs

(1954), señalan un número cromosómico de 40. Hasta que Mc Connel (1963), confirma el número diploide de 38 cromosomas. La disparidad del recuento cromosómico fue debido a la calidad de las técnicas utilizadas. (19, 2)

Cada cromosoma en metafase posee dos cromatidas idénticas que están unidas a nivel del centrómero. Dependiendo de la posición del centrómero los cromosomas pueden ser Metacéntricos, Submeta-céntricos, Acrocéntricos y Telecéntricos. Al grupo de características que permite la identificación de un conjunto de cromosomas se le llama cariotipo. (9)

Los cromosomas han desarrollado una especialización de sus segmentos resultando en la aparición de regiones tales como Cinetócoro, Telómero, Organizadores Nucleolares, Heterocromatina Constitutiva, Eucromatina. La distribución de la secuencia de bases a lo largo del cromosoma no se encuentran al azar, se ha determinado que las zonas ricas en Guanina-Citocina son las activamente transcritas, las cuales son de replicación temprana y se encuentran en los segmentos intercromoméricos, en cambio las zonas ricas en Adenina-Timina, son casi genéticamente inactivas, de replicación tardía y forman los cromómeros. (6, 11)

Los cariotipos de tinción convencional sin la utilización de técnicas de bandeado cromosómico no son suficientes para determinar que cromosomas del cariotipo participan en las alteracio-

nes cromosómicas, tales como las euploidias, aneuploidias y aneusomías, ya sea debido al gran parecido morfológico entre algunos cromosomas no homólogos ó porque los cambios sutiles alteran levemente la estructura cromosómica. (1, 4)

En la literatura se han reportado varios procedimientos de bandeo (Q, C, G, R, T, CD, NOR's, etcétera). Todos estos patrones de bandeo inducidos en los cromosomas, son el resultado de tratamientos diversos, como son calor, alcalis ó ácidos fuertes y enzimas, los cuales provocan la desnaturalización de proteínas y ADN, posteriormente el empleo de colorantes que reaccionan específicamente con ellos permite la obtención de determinado patrón de bandeo. (1, 6, 13, 23)

Las técnicas de bandeo revelan nuevas características para la identificación de los cromosomas (número e intensidad de sus bandas). El reconocimiento de las bandas ha permitido una identificación de los cromosomas o de sus partes, para caracterizar a cada cromosoma, además de la posición de los centromeros, y el tamaño de los brazos, se han encontrado técnicas de bandeo especiales las cuales permiten establecer regiones para subdividir los brazos cromosómicos. (12, 23)

Los organizadores de regiones nucleolares (NOR's) ó bandas N corresponden a regiones específicas (constricciones secundarias)

de algunos cromosomas, los cuales se caracterizan por que en ellos acumulan proteínas acidas. Por otra parte se sabe que en dichas regiones se localizan los genes que codifican para los ARN ribosomales 18s y 28s, estos genes se transcriben en forma muy activa e interfieren con la condensación del cromosoma a ese nivel, conduciendo así a una alta frecuencia de asociación cromosómica.

(2, 24)

Las regiones NOR's pueden ser fácilmente identificables mediante tratamientos que utilizan nitrato de plata. (2, 23)

En el hombre los NOR's han sido asignados a los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22, los cuales son acrocéntricos y poseen satélites.
(2, 12, 23, 24)

II. ANTECEDENTES CIENTIFICOS

Veijalainen P. y Ramalla-Parranene E. (1978), durante una investigación citogenética de cerdos consanguíneos afectados con el síndrome de incoordinación y ataxia progresiva, encontraron que una cerda presentaba un cromosoma 10 sin su típica constricción secundaria. El cromosoma fue estudiado por bandas C con la técnica de Hansen-Melander et al. (1974), y con la técnica modificada para organizadores nucleolares (NOR's), de Bloom y Goodpasture (1976). En los cromosomas teñidos con bandas C, el cromosoma normal 10 tuvo un bloque centromérico densamente teñido, mientras que el cromosoma 10 anormal tuvo una región centromérica débilmente teñida y sometidos a la técnica de NOR's, el cromosoma normal 10 mostró una sobresaliente región, en cambio el cromosoma anormal no la presentó.

Los autores no logran determinar si la carencia de la constricción secundaria del cromosoma 10 sea un factor etiológico en el síndrome de incoordinación y ataxia progresiva. (25)

Christensen K. (1980), encuentra en el cerdo variaciones individuales en el número de organizadores nucleolares para el cromosoma 10, igualmente encontró variaciones en el tamaño de la banda N en el cromosoma 8.

En este estudio encontró que estas dos formas de variación en las bandas N, se heredan en forma Mendeliana en tres generaciones de una familia. Además estudió la segregación de 18 sistemas de grupos sanguíneos y proteínas séricas, encontrando que el grupo sanguíneo M se encuentra ligado al cromosoma número 10. (5)

Lin C. C. et al. (1980), utilizando el método Ag-As de Bloom (1975), para localizar los organizadores nucleolares (NOR's), en encontró que un cerdo presentaba únicamente Ag-NOR's en los cromosomas número 10, mientras otro individuo, de ocho de sus células examinadas 7 lo presentaban sólo en el par 10, y en una célula estaban localizados en un cromosoma 10 y en un 8.

Otro cerdo mostraba en células NOR's presentes sólo en el par 10, mientras que en una célula apareció en el par 8 y además en un cromosoma 10. La identificación de los cromosomas específicos fue llevada a cabo por tinción secuencial con quinacrina y giemsa seguido por Ag-As. El número máximo de cromosomas mostrando NOR's en una metafase dada es de tres, el cual incluye al menos un cromosoma 10. (18)

Czaker R. y Mayer B. (1980), indican que la exacta identificación de los cromosomas porcinos que portan NOR's es difícil si no se combina otro patrón de bandeo. Para esto utilizan la combinación de las técnicas modificadas de Mikelsaar et al. (1977),

las cuales identifican tanto bandas N como G. Encuentran que mientras en el cromosoma 10 siempre es evidente una constricción secundaria, en el cromosoma 8 esta región puede ser vista sólo en algunas células. En proporción significativa de todas las metafases examinadas, los NOR's se confirman en estas regiones. Sin embargo, en un número menor de células, puede presentarse un NOR's adicional cerca del centrómero en uno de los homólogos del par 11. El número de NOR's que se encuentran varían de dos a cinco por célula.

Reportan así mismo que la cantidad de precipitado de plata es variable, siendo muy poco en algunos cromosomas, mientras que otros tienen grandes cantidades. Esto puede representar un número variable de genes que codifican para el ARN ribosomal por organizadores nucleolares. (7, 8)

E Kopp, B Mayer, R Czaker y W Schleger (1981), usando una combinación de la técnica de plata y giemsa, demostraron en el caballo doméstico (Equus Equinus, $2n=64$), que las regiones de organizadores de los cromosomas, estaban teloméricamente en los cromosomas 1, 25, 30. (14)

E Kopp, B Mayer y W Schleger (1982), utilizando la misma técnica especificaron que en perro doméstico (Cannis Familiaris, $2n=78$) la mayor concentración de plata en las regiones de orga-

nizadores nucleolares fueron detectadas en regiones teloméricas de los cromosomas 7, 8, 27 y en ocasiones el 38. (15)

B Mayer, D Schweizer, G Geber (1984), analizando el cariotipo del cerdo salvaje europeo (*Sus Scrofa Scrofa*), mediante la técnica de plata en combinación con la técnica de Cromomicina A₃/distamicina A/DAPI, técnica para bandas fluorescentes que localizan NOR's activos y además diferencian las bandas C, asignaron el RNA ribosomal en los genes de la constricción secundaria de los cromosomas 8 y 10. Además encontraron que todos los cromosomas metacéntricos y submetacéntricos con excepción de un cromosoma translocado 15/17 y el cromosoma Y, mostraron fluorescencia de cromomicina A₃ sobre su heterocromitina centromérica. En contraste, las regiones de bandas C en los cromosomas acrocéntricos mostró solamente mediana fluorescencia de cromomicina A₃. En la fluorescencia de DA/DAPI solamente el cromosoma 15/17 mostró tinción brillante de la cromatina centromérica mientras que la heterocromatina centromérica de todos los otros cromosomas metacéntricos y submetacéntricos se tiñó débilmente. La heterocromatina centromérica de los cromosomas acrocéntricos mostraron tinción brillante DA/DAPI.

Las variaciones no sólo se observaron en la cantidad de los depósitos de plata, sino también en el número de NOR's presentes.

La presencia o ausencia de NOR's en cromosomas característicos varía poco entre las células, proporcionando un patrón relativamente constante, típico para cada individuo.

Por otra parte compararon los cariotipos de ambas especies de cerdos y discuten sobre los presuntos mecanismos de la evolución cromosómica. (2)

B Meyer, D Schweizer, G Geber y Czaker R. (1984), reportan que existen diferencias significativas en el número de NOR's entre cuatro razas de cerdos estudiados. Esto puede reflejar la ausencia de los sitios de ARN'r o la ausencia de actividad genética. Estos autores encuentran frecuentemente depósitos de plata que aparecen como pequeños puntos en los centrómeros de todos los cromosomas. Por último señalan que en el hombre y en la mayoría de los animales investigados, la asociación entre los cromosomas que portan NOR's se observa con alta frecuencia, en las metafases observadas. (3, 8)

El hecho de que los NOR's presenten polimorfismo, es decir variaciones tanto en su tamaño como en su número, brinda la posibilidad de usarse como marcador genético para mapear genes, estudiar las características y la dinámica de las poblaciones, así como autenticación de registros y la investigación de la asociación de determinadas variantes polimórficas con enfermedades,

o bien rasgos productivos, esto último es promisorio, por el papel tan importante de los ribosomas en la síntesis de proteínas, y de ahí la producción animal. (17)



III. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo va dirigido a valorar que método o métodos de los descritos para inducir bandas N con la utilización de nitrato de plata (Tabla No. 1), nos pueden proporcionar resultados más reproductibles, confiables y de calidad óptima en los cromosomas del cerdo doméstico (*Sus Scrofa*).



IV. MATERIAL Y METODOS

Para obtener preparaciones cromosómicas se efectuaron cultivos de linfocitos de sangre periférica de cerdo doméstico (Sus Scrofa), según la técnica de Moorhead et al. (1960).

Al revisar la literatura se encontró que para la tinción de las regiones NOR's se han descrito varias técnicas (tabla # 1).

Hay cuatro procedimientos que emplean un sólo paso, empleando tiempos prolongados, encontramos cuatro protocolos que recomiendan dos pasos con el empleo de menos tiempo y una sola técnica . emplea tres pasos. Casi todas las técnicas emplean una solución acuosa de nitrato de plata al 50%. Las técnicas de un sólo paso emplean incubación prolongada para que la precipitación de la plta ocurra, esto es acelerado por el calor y el pH ácido.

En la mayoría de las técnicas de dos a tres pasos se emplean además incubaciones cortas con la mezcla 1:1 de solución de plata amoniacal y una solución de formalina Ph 4.5 (tabla #1).

Para explorar en los cromosomas del cerdo el efecto de las distintas técnicas descritas, se probaron las variantes técnicas descritas y especificadas en la (tabla ¿ 2).

Básicamente consisten en probar tiempos mayores y menores del

tiempo óptimo que recomiendan los distintos autores, con el fin de obtener las condiciones óptimas de tratamientos para los mejores resultados, en cada experimento se estudiaron 10 metafases, registrando el estado de la morfología cromosómica y el grado del precipitado específico de nitrato de plata. Se anotaron qué cromosomas presentaron NOR's y se contaron cuántos cromosomas de cada mitosis los portaban (tabla #3).

Para la clasificación de los cromosomas se siguió las sugerencias aceptadas en la Conferencia Internacional para la estandarización de los cariotipos en los animales domésticos, de Reading Inglaterra (1976), (16).



TABLA No.1

Comparacion de distintas técnicas empleadas para la tinción diferencial. para las regiones de Organizadores Nucleolares(NOR'S)

	Denton 1977	Good pasture y Bloom 1975	Bloom y Good pasture 1976		Czaker.R.Y. 1980	Bloom y Good pasture 1976	Verley 977	Veijalainen 1978
Pretratamiento Na OH 0.01% (10 M) PH 8.5 30"- 40"	+							
Sol Ag NO ₃ 33.3% en H ₂ O Iluminación 10' temp ± 50°C-70°C	+							
Sol (Ag) Sol Acuosa de Ag NO ₃ 50%		Iluminacion ± 60°C 10'	Δ 50-60°C 15' camara humeda	Δ 50-60°C 15' camara humeda	Δ 60°C 10'	Δ 37°C 18 hrs. ó Δ 50°C 2-5hrs camara humeda	Δ 65°C 4-12 hrs. camara humeda	Δ 40°C toda la noche camara humeda
Sol (AS) 4 grs Ag NO ₃ + 5cc H ₂ O + 5 ml NH ₄ OH PH 12 a 13. 1:1 Formalina 3% Neutralizada con Acetato de Na y Llevado a PH 4.5 con Ac formico		tiempo variable ± 30"-5' Monitoreo	frio 30"-5'					
Sol (As) + formalina 1:1 10% o PH 5.0				+	3' Monitoreo			
Sol (As) + formalina 1:1 Na HCH 1.2% PH 7.0	1'-3' +							
Sol (As) + formalina 1:1 97 H ₂ O, 3 formaldeido 3.2 grs acetato Na					+	3' Monitoreo		

Tabla No. 2

Descripción de las condiciones y variables experimentos que serán ensayados para la inducción de (NORs) en los cromosomas del cerdo (*Sus scrofa*)

Variantes técnicas de las descritas por:	Denton 1977									Good pasture Bloom 1975					Bloom y Good pasture 1976										Czaker RY 1980				Bloom y Good pasture 1976						Verley 1977					Verjalainen 1978																				
	EXPERIMENTOS No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59
PRETRATAMIENTO Na OH 0.01% (10 ⁻⁵ M) PH 8.5 30" - 40"	30"		40"																																																									
Sol Ag NO ₃ 33.3% en H ₂ O Iluminación 10' tem ± 50-70° c	10'																																																											
Sol (Ag) Sol. acuosa de Ag NO ₃ 50%											60° c iluminacion 10'					50° c camara humeda 15'		60° c camara humeda 15'			50° c camara humeda 15'			60° c camara humeda 15'		60° c camara humeda 10'				37° c camara hum. 9,14,18,20,24 horas			50° c camara hum. 12 3 5 6 horas			65° c camara hum 2 4 6 12 14 horas				40° c camara hum. 10 12 14 16 18 horas																				
Sol (AS) 4 grs Ag NO ₃ + 5cc H ₂ O + 5 ml NH ₄ OH PH 12 -13 1:1 formalina 3% Neutralizado con Acetato de Na y llevado a PH 4.5											15" 30" 1' 3' 5'		15" 30" 1' 3' 5'			15" 30" 1' 3' 5'																																												
Sol (As) 1:1 formalina 10% o PH 5.0																					15" 30" 1' 3' 5'		15" 30" 1' 3' 5'																																					
4 gms Ag NO ₃ + 5cc H ₂ O + 7.5 NH ₄ OH 1:1 FORMALINA 3% con Na HCHO 1.2% pH 7	30" 1'		30" 1' 2' 3' 5'																																																									
Sol (As) 1:1 97 H ₂ O, 3 formaldeido 3.2 g. de acetato de Na																																																												



V. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Del total de los 60 ensayos realizados de las siete técnicas ver (tabla # 2), se lograron obtener resultados apreciablemente reproducibles con una variante de la técnica recomendada por Bloom y Goodpasture (1976).

Siendo esta la que utiliza además de nitrato de plata, un revelador con formalina, esto se obtuvo con las siguientes concentraciones, tiempo de exposiciones y temperatura.

Ag No_3 al 50% a una temperatura de 50°C por un tiempo de incubación de 15 minutos en cámara húmeda, y solución (As) formalina al 10% (1:1) a temperatura ambiente por un minuto esto realizado en el experimento No. 28 en el cual la presentación de regiones portadoras de organizadores nucleolares en el cromosoma No. 10 fue de un 90% de las metafases observadas, en el cromosoma No. 8 fue de un 80% de las metafases observadas, obteniéndose también que un 10% de las células observadas, presentarían NOR's aparentemente en el cromosoma No. 11.

La morfología cromosómica fue en un 30% buena, en un 20% hinchada, en un 30% plumosa, en un 20% despirilizada. La tinción fue de color dorado. El precipitado de plata inespecífico resultó en un 80% parcial y en un 20% alto.

Por otra parte en el experimento de la laminilla No. 26 el cual utiliza las mismas soluciones que la anterior, diferenciándose únicamente al tiempo de la solución (As) por 15 segundos, se obtuvo el bandeo N con presentación en el cromosoma No. 10 en un 100%, y en el cromosoma No. 8 en un 70% de las metafases analizadas. Presentando una morfología cromosómica del 30% buena, 35% hinchada, 20% plumosa y un 5% despirilizada. La tinción se presentó de color dorado. El precipitado de plata fue en un 5% nulo, 45% despreciable, 5% parcial y 45% alto.

En la laminilla del experimento No. 39 con la técnica descrita por Czaker R Y. (1980). (Ver tabla No. 2). La que utiliza solución (Ag) solución acuosa de Ag NO_3 al 50% por un tiempo de exposición de 10 minutos en cámara húmeda a una temperatura de 60°C y solución (As) 1:1 97ml. H_2O , 3ml. formaldeido y 3.2 gramos de acetado de sodio por tres minutos. Se obtuvo el siguiente resultado; presentación de bandas N en el cromosoma No. 10 fue del 70% y el cromosoma No. 8 mostró bandas en el 20% de las metafases observadas.

Presentando una morfología de un 10% hinchada, 40% plumosa, de un 50% despirilizada.

La tinción fue de color dorado. El precipitado de plata ineficaz se visualizó en un 10% despreciable y un 90% parcial.

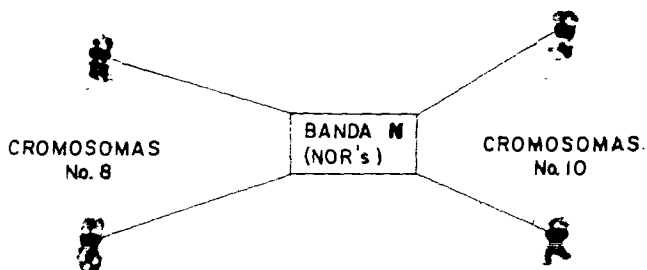
En la técnica utilizada en la laminilla No. 33, de acuerdo a Bloom y Goodpasture (1976), (ver tabla No. 2), que utiliza Ag NO_3 al 50% a 60°C en cámara húmeda por un tiempo de 15 minutos y solución (As) 1:1 por un minuto. Se demostró la presencia de bandas N en el cromosoma No. 10 en un 90% de las metafases y en el cromosoma No. 8 con el 10%. La morfología fue 90% hinchada, 10% plumosa.

Se observó tinción de color dorado, el precipitado de plata inespecífico observable fue de 70% despreciable y un 30% parcial.

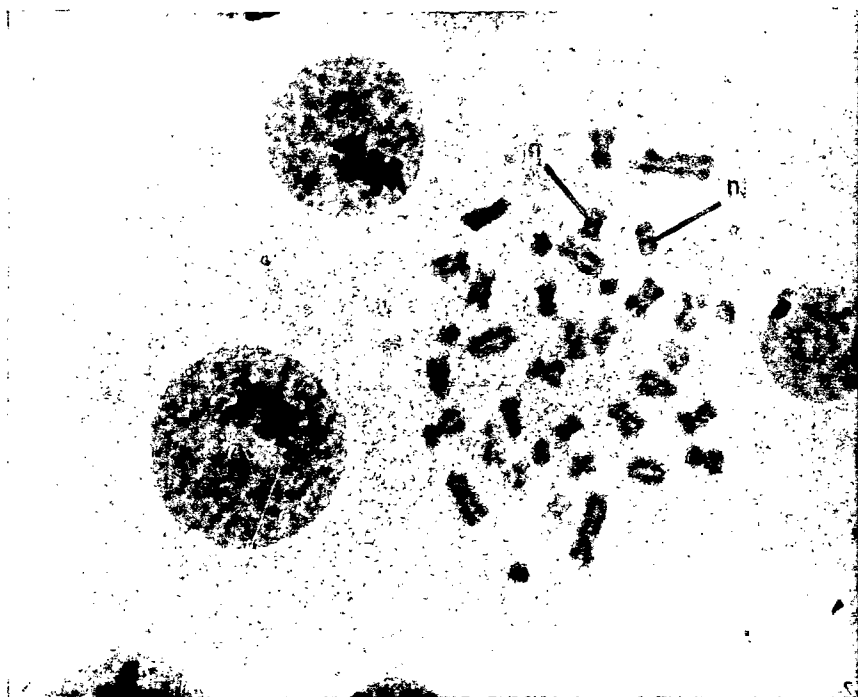
En las demás técnicas nosotros no pudimos obtener resultados reproducibles posiblemente debido a las condiciones imperantes en nuestro laboratorio.

Como por ejemplo las variables a la otra técnica descrita por Bloom y Goodpasture (1976), que abarcan los experimentos de las laminillas de la 41 a la 50, dichas variables emplean un sólo paso como tratamiento, la cantidad de NOR's aquí fue muy bajo en su presentación y únicamente correspondió al cromosoma No. 10 en un .26%.

Las diferentes técnicas y sus variables reportadas por los otros autores, dieron resultados negativos, no observándose bandas NOR' en los cromosomas de cada ensayo.



CROMOSOMAS DEL CERDO (SUS SCROFA)
 MOSTRANDO SU TIPICA BANDA N (NOR's)



CARIOTIPO NORMAL CON BANDAS N DEL CERDO (SUS SCROFA).

VI. CONCLUSIONES

La variabilidad de los resultados es acorde a los observados por otros autores pues el estado técnico específico de cada laboratorio puede influir en la calidad de los cultivos así como en la propia técnica de bandeado No a ensayar. (6, 7, 10)

Este trabajo indica que utilizando la técnica Ag-As se obtienen resultados rápidos (ensayo N. 28 tabla No. 2).

La inducción sí se lleva a cabo, pero la morfología puede afectarse inadecuadamente. Por otro lado en la técnica que utiliza Ag al 50% (ensayo No. 44 tabla No. 2), se obtienen resultados más lentos aunque la morfología se ve afectada y la coloración es muy tenue siendo la presentación de NOR's nula ó mal definida.

Cuando se utiliza Ag al 50% / Ag-As, los NOR's se presentan muy oscuros y el precipitado de plata inespecífico aumenta dificultando la lectura. En suma sólo tres de las variantes técnicas con solución de plata presentaron los NOR's de color dorado a negro en un fondo azul tenue de las cromátides, constituyendo que las técnicas con mejor resultado así como las más reproducibles fueron; la técnica con solución Ag al 50% 1:1 As por segundos y un minuto, además de la técnica que usa solución Ag al 50% / solución As más acetato de sodio por tres minutos ambas a tempe

ratura ambiente. Distinguiéndose entre estas la variante que es expuesta por un minuto.

Una hipótesis del número característico y del patrón de distribución de las bandas N y la variación del tamaño entre las líneas celulares, así como también entre individuos es soportado por este trabajo y por otros. (1, 2, 5, 13, 18)



VII. RESUMEN

Se obtuvieron preparaciones cromosómicas de cerdo doméstico (*Sus Scrofa*) a través del cultivo de linfocitos de sangre periférica, ensayándose posteriormente 60 variantes de siete técnicas para la inducción de bandas NOR's reportadas en la literatura por varios autores. Concluyéndose que sólo una variante a la técnica descrita por Bloom y Goodpasture (1976) da resultados confiables y reproducibles. Encontrándose que los cromosomas que portan NOR's en los animales estudiados coinciden con los reportados por otros autores siendo estos el 10, 8, 11.



BIBLIOGRAFIA

- 1.- Basrur, P.K. (1974) Innovation in cytogenetics and their applications to domestic animal. Primer Congreso Mundial de Genética Aplicada a la Producción Ganadera. (Madrid) Tomo 1:215-27
- 2.- Bloom, S.E. and Good pasture. (1976) An improved technique for selective silver staining of nucleolar organizer regions in human chromosomes. Hum Genet. 34:199-206.
- 3.- B. Meyr, D. Schweizer, and G. Gebe-, (1984) NOR activity, heterochromatin differentiation, and the Robertsonian polymorphism in *Sus scrofa* L. The Journal of Heredity 75:79-80.
- 4.- Bruere, A.N. (1974) The discovery and biological consequences of some important chromosome anomalies in populations of domestic animals. Primer Congreso Mundial de Genética Aplicada a la Producción Ganadera. (Madrid) Tomo 1:151-75.
- 5.- Christensen, K. (1980) Evidence for polymorphism of the nucleolar organizer region (N-band) in pig chromosome. 4 th Eur Colly Cytogenet Domestic Anim. pp. 467

- 6.- Comings, D.E. (1980) Mechanisms of Chromosome banding and implication for chromosomes structure. *Ann. Rev. Genet.*, 12:25-46
- 7.- Czaker, R. and Mayr, B. (1980) Ag-G staining a rapid technique for producing silver staining and giemsa banding in mammalian chromosomes. *Experientia*, 26:625-26
- 8.- Czaker, R. and Mayr, B. (1980) Detection of nucleolus organizer (NOR) in the chromosomes of domestic pig (*Sus Scrofa domestica*) *Experientia* 36:1356-57
- 9.- Danil, A. (1979) Structural difference in reciprocal translocation, potential for a model of risk in ccc human. *Genetic* 51:171-182
- 10.- Denton, T.E. Brooke, W.R. and Howell, W.M. (1977) A technique for the simultaneous staining of both nucleolar organizer regions and kinetochores of human chromosomes with silver. *Stain Technology*. 52(6):311-13
- 11.- De Robertis, E.D.P. y De Robertis, E.M.P. (1981) Meiotic and Mitotic chromosomes in mammalian testes. *Cytology*

12(5):686-89

- 12.- De Robertis y De Robertis (h) *Biología celular y molecular*.
Décima Edición, Editorial El Ateneo. 412-15, 454-66
- 13.- Dutrillaux, B. (1973) Nouveau sistema de marquage chromoso-
mique: Les Bande T. *Chromosoma (Berl)* 41:395-402
- 14.- E. Kopp, B. Mayr, R. Czaker, and W. Schleger. (1981) Nucleo-
lus organizer regions in the chromosomes of the domestic hor-
se. *The Journal of Heredity* 72:375-58
- 15.- E. Kopp, B. Mayr, and W. Schleger. (1982) Nucleolus organi-
zer regions on chromosomes of the domestic dog. *The Journal*
of Heredity 73:73
- 16.- Fechner, N.S. (1979) Cytogenetics in animal production.
Journal of dairy science 62:844-53
- 17.- Ford, C.E. Pollock, D.L. and Gustavsson, I. (1980) Proce-
dings of the first international conference for the standar-
disation of Banded Karyotypes of the Domestic Animals.
(Reading, England) *Hereditas*. 92:145-162

- 18.- Goodpasture, C. and Bloom, D.E. (1975) Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. Chromosome (Berl) 53:35-50
- 19.- Homedes, J. Haro García, F. (1958) Zoogenética. Ed. Salvat Barcelona (España)
- 20.- Lin, C.C. Niedrma, B.M. Jamro, H.K. Hawthorne, A.B. and Church, R.S. (1980) Porcine (*Sus scrofa domestica*) Chromosome identification and suggested nomenclature can. J. Genet, Cytol 22:103-16
- 21.- McConnell, J. Fechheimer, N.S. and Gilmor, L.O. (1963) Somatic chromosomes of the domestic pig. J. Animal Sci. 22: 374-79
- 22.- Moorhead, P.S. Nowel, P.C. Mellman, J. Battips, P.M. and Hungerford, D. (1960) Chromosome preparations of Leukocytes cultured from peripheral blood. Exp. Cell. Res. 20:613
- 23.- Pathak Sen (1978) Cytogenetic research technique in human and laboratory animal that can be applied most profitably to livestock. J. Dairy Science. 3:836-43

- 24.- Schnedl, W (1974) Banding Patterns in chromosomes. Int. Rev. Citol. 4:237-72
- 25.- Veijalaine, P and Rimalla-Parmanene, E. (1978) A case of chromosomal polimirphism in as inbred yorkshire pig. Hereditas. 88:275-79
- 26.- Verly J.M. (1977) Pattern of silver staining of human chromosomes. Chromosoma 61:207-14



APENDICE

- 1.- Chamla Yves and Rufie Marie. (1976) Production of C and T bands in human mitotic chromosomes after heat treatment. Human Genet, 34:213-16
- 2.- Gagne, R. (1981) DNAsa I digestion of fixed chromosomes specifically reveals NOR's in man. Exo. Cellres. 131
- 3.- Hansen-Melander, E. and Melander, Y. (1974) The karyotype of the pig. Hereditas 77:149-58
- 4.- Hizume, M. Sato, S. and Tanaka, A. (1980) A highly reproducible method of nucleolar organizing regions staining in Plants, Stain Technology 5(1):87-90
- 5.- Jenifer, M. Verley (1977) Patterns of silver staining of human chromosomes. Chromosoma (Berl) 61:207-14
- 6.- Jawwell, D.C. (1981) Recognition of two types of positive staining chromosomal material by manipulation of critical steps in the N-banding. Stain Technology. 56(4):227-34

- 7.- Moorhead, P.S. Nowell, P.C. Mellman, J. Battips, D.M. and Hungerford, D.A. (1960) Chromosome preparation of leukocytes cultured from prerothelial blood. Exp. Cellres, 20:613
- 8.- Morrow, D.C. (1980) Current therapy theriogenology. Ed. Saunders :117-55
- 9.- H.G. Schwarzacher, A.- V. Mikelsaar and W. Schnedl (1978) The nature of the Ag-Staining of nucleolus organizer region. Cytogenet, Cell. Genet. 20:24-39
- 10.- Ved, B.S. Verma, R.S. and Dosik, H. (1980) NSG banding of sequentially FRQ and RFA banded human acrocentric chromosomes, Stain Technology. 55:77-80
- 11.- Ved Brat, S. Verma, R.S. and Dosik, H. (1979) Asimplified technique for simultaneous staining of nucleolar organizer and kinetochores. Stain Technology 54:107-08
- 12.- Zankl, H. and Bernhardt. (1977) Combine silver staining of the nucleolus organizing regions and giemsa banding in human chromosomes. Hum Genet 37:79-80