

**ESTUDIO CITOGENETICO (FRAGILIDAD DEL CROMOSOMA SEXUAL X)
EN VAQUILLONAS HOLANDO****Llambí, S*; Coppola, B*, Cavestany, D**.**

*Area Genética. Facultad de Veterinaria.

UDELAR. A Lasplaces 1550 CP11600

sllambi@adinet.com.uy

**Departamento de Reproducción. Facultad de Veterinaria. UDELAR.

RESUMEN

Se realiza el estudio citogenético en células linfocitarias (fragilidad del cromosoma X) en vaquillonas Holando (Holstein-Friesian) controladas reproductivamente. Se utiliza la técnica de macro-cultivo en medio RPMI-1640 completo inducido con afidicolina (concentración final: 0.3 μ M). Los animales presentan un cariotipo normal, (2n=60,XX). Del análisis de 600 placas metafásicas se identifican 75 sitios frágiles en el cromosoma X (bandas Xq1.2, Xq3.1, Xq4.1, Xp1.2.2, Xp2.3). Se observa diferencia significativa ($p < 0.001$) en la expresión de fragilidad de las vaquillonas que han requerido un mayor número de servicios por preñez.

Palabras claves: bovinos, sitios frágiles, cromosoma sexual X.

SUMMARY

A cytogenetic study (X chromosome fragility) was carried out on lymphocyte cell of reproductive controls heifers Holando (Holstein-Friesian). The analysis was performed by using macrocultures in complete RPMI-1640 cell culture medium induced with aphidicolin (final concentration: 0.3 μ M). The analyzed heifers showed a normal female chromosome complement (2n=60,XX). 600 metaphase spreads comprised in the study, a total of 75 X chromosome fragile sites were identified (bands Xq1.2, Xq3.1, Xq4.1, Xp1.2.2, Xp2.3). Significant difference ($p < 0.001$) was observed in fragility expression in heifers with a higher rate of services per conception.

Key words: cattle, fragile sites, sexual X chromosome.

INTRODUCCION

En bovinos de producción lechera un buen manejo reproductivo se manifiesta en una mejora a nivel de la producción. A nivel genético, en bovinos se han reportado alteraciones en los cromosomas sexuales, asociadas con problemas reproductivos (Halnan, 1989). El mapeo comparativo del cromosoma sexual X bovino (BTAX) confirma la conservación de sus genes con el humano, roedor, ovino, cabras, búfalos (Robinson et al., 1998). El BTAX es un cromosoma de morfología submetacéntrica (con un brazo largo llamado brazo q y un brazo corto o brazo p). En humanos dicho cromosoma presenta genes asociados con alteraciones reproductivas (fallos prematuros de ovario) (Davison et al., 1999). Los sitios frágiles se pueden definir como regiones de ruptura de la integridad de la cromatina que aparecen en sitios concretos del cromosoma. Estos pueden observarse «in vitro» en metafases de cultivos linfocitarios obtenidos bajo determinadas condiciones (utilización de sustancias químicas inductoras). Uno de los inductores químicos más utilizados para el estudio de fragilidad cromosómica ha sido la afidicolina (APC, inhibidor de la replicación del ADN

(Sutherland et al., 1998). En el cromosoma BTAX existen reportes en distintas razas bovinas de presencia de fragilidad, relacionada con alteraciones de la fertilidad (abortos, repetición de servicio, intervalo alargado entre primer y segunda preñez) (Rincón et al., 1997, Slota et al., 2000). El objetivo del presente trabajo preliminar ha sido realizar el control citogenético (estudio de fragilidad de BTAX) en una muestra de vaquillonas de la raza Holando controladas reproductivamente y que presentan variaciones en el número de servicios por preñez.

MATERIALES Y METODOS

La muestra en estudio consistió en 6 vaquillonas de la raza Holando procedentes de la Estación experimental INIA-La Estanzuela. El manejo de éstos se realiza en forma tradicional en praderas convencionales. Se observó la condición corporal de los animales no registrándose pérdida de la misma (se asume que los animales en estudio no se encuentran en condiciones de restricción alimenticia). Dichos animales se encuentran controlados reproductivamente (sincronización de celos, I.A, detección de preñez) (Tabla 1).

Para el estudio de fragilidad del BTAX, se realizó un total de 12 macrocultivos linfocitarios (6 cultivos controles sin APC y 6 cultivos inducidos con una concentración final de 0.3 μ M de APC) a partir de sangre entera extraída con heparina. Los macrocultivos linfocitarios se realizaron en medio de cultivo RPMI-1640 completo y el tiempo de incubación fue de 72 horas a 38.5°C (Halnan, 1989). A las 48 horas de iniciada la incubación se realizó la inducción con APC. Para detener los cultivos celulares en etapa de metafase se utilizó colchicina (4 μ g/ml) durante 2 horas. Las células se fijaron en metanol-ácido acético y las extensiones celulares se tiñeron con el colorante Giemsa al 3% durante 15 minutos. Las observaciones se realizaron en microscopio óptico Olympus BX60 con cámara digital y software para captura de imágenes. La identificación de los sitios de fragilidad del BTAX, se realizó de acuerdo al idiograma bovino establecido por Rodríguez et al, 2002. Se realizó el test de Chi cuadrado para estimar las fragilidades de BTAX en las vaquillonas preñadas con 4 o más servicios frente a las de 3 o menos servicios. Para el test estadístico se utilizó el programa informático SPSS 10.0.

RESULTADOS Y CONCLUSION

Se analizó un total de 600 placas metafásicas (50 metafases por animal y por cultivo). En las 6 vaquillonas estudiadas citogenéticamente se encontró una fórmula cariotípica normal (2n=60, XX). Se identificaron un total de 75 sitios frágiles del BTAX localizados en la regiones Xq1.2, Xq3.1, Xq4.1, Xp1.2.2, Xp2.3 descritos previamente por Llambí, 2002 (Tabla 2, Fig. 1). En los cultivos controles la manifestación espontánea de fragilidad del BTAX se observó en un rango del 2% al 6% siendo en el 89% de los casos el sitio Xq3.1 el de mayor frecuencia. En los cultivos inducidos se observó un rango de fragilidad del 6% al 48% siendo la región comprendida entre las bandas Xq1.2-Xq3.1 la de mayor inestabilidad. En humanos se ha observado una región del X (Xq13-Xq26) denominada «crítica» por su inestabilidad asociada con alteraciones reproductivas (Sala et al. 1997). Al conside-



rar los sitios frágiles encontrados en los cultivos inducidos en las vaquillonas preñadas con 4 o más servicios (N°48, N°77, N°27) y en las vaquillonas preñadas con 3 o menos servicios (N°2013, N°1060) se encuentran diferencias significativas $\chi^2 = 15,1$, $p < 0.001$). Debemos tener en cuenta que nuestra muestra poblacional, el animal N°77 muestra un gran inestabilidad del BTAX con 44% de fragilidad. Estos datos estarían de acuerdo a lo observado por Rodríguez et al, 2002 sobre la existencia de un efecto propio del animal para la manifestación de fragilidad inducida por APC. En la muestra analizada se observa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$) de inestabilidad del cromosoma BTAX en vaquillonas con un mayor número de servicio por preñez aunque debemos tener en cuenta el tamaño reducido de animales estudiados. El aumento de la muestra poblacional permitirá aportar nuevos conocimientos sobre el significado biológico de los sitios frágiles del BTAX.

AGRADECIMIENTOS

A la Sra. Iris Hernández, preparadora del Laboratorio de Genética de Animales Domésticos de la Facultad de Veterinaria.

BIBLIOGRAFIA

Davinson, R; Davis, C; Conway, G. (1999). The X

chromosome and ovarian failure. Clinica. Endocrinology. 51:673-679.

Hainan, C. (1989). Cytogenetics of animals. Ed. University of Sydney. 1-570.

Llambí, S. (2002). Estudios citogenéticos -moleculares de la fragilidad del cromosoma sexual X y enfermedades hereditarias monogénicas en bovinos de la raza Holando Uruguayo (*Bos taurus*). Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. España. 1-142.

Rincón, G.; Llambí, S; Postiglioni, A. (1997). Expression of X chromosome fragility in Holstein-Friesian cattle: a preliminary study. Genet. Sel. Evol. 29: 395-401.

Rodríguez, V; Llambí, S; Postiglioni, A; Guevara, K; Rincón, G; Fernández, G; Memies, B, Arruga, M.V. (2002). Localisation of aphidicolin induced break points in Holstein-Friesian cattle (*Bos taurus*) using RBG-banding. Genet. Sel. Evol. 34:649-656.

Sala, C; Arrigo, G; Torri, G; Martinnazzi, F; Riva, P; Larissa, L; Philippe, C; Jonveaux, P, Sloan, F; Labella, T; Toniolo, D. (1997). Eleven X chromosome breakpoints associated with premature ovarian failure (POF) map to a 15-Mb YAC contig spanning Xq21. Genomics. 40:123-131.(1996).

Slota, E; Danielak-Czech, B; Pietrasszewska, J; Kozubaska, A. (2000). Preliminary identification of the fragile X in two crossbred cows. Veterinarni medicina. 45 (19):308-310.

Sutherland, G; Baker E; Richards, R. (1998). Fragile sites still breaking. TIG. 14 (12):501-506.

Tabla 1: Datos reproductivos de la vaquillonas de la raza Holando estudiadas citogenéticamente.

N°Animal	1er Servicio	2do Servicio	3er Servicio	Diagnóstico Año I	N° Servicio Año II	Diagnóstico Año II	N° Total de Servicios
27	17/05	30/08	—	Vacía	2	preñada	4
48	17/05	16/06	30/08	Vacía	4	preñada	7
56	17/05	30/08	—	Vacía	1	Vacía	3
77	16/05	21/06	30/08	Vacía	2	preñada	5
101	30/05	—	—	Vacía	2	vacía	3
1060	24/04	26/06		Preñada	—		2
2013	24/04	5/06	30/07	Preñada	—		3

Figura 1: Placas metafásicas parciales donde se observa fragilidad del cromosoma BTAX.





Tabla 2: Resultados de los sitios frágiles localizados en el BTAX en cultivos controles e inducidos con APC.

N°Animal	Concentración APC (μ M)	N°Placas Metafásicas Estudiadas	FRAX Xq1.2	FRAX Xq3.1	FRAX Xq4.1	FRAX Xp1.2.2	FRAX Xp2.3	FRAX Total(%)
48	Control	50	0	2	0	0	0	2 (4%)
48	0.3	50	2	3	2	1	0	8(16%)
77	Control	50	0	3	0	0	0	3 (6%)
77	0.3	50	11	5	3	3	0	22 (48%)
27	Control	50	0	2	0	0	0	2(4%)
27	0.3	50	1	0	2	0	2	5(10%)
56	Control	50	0	0	0	0	0	0
56	0.3	50	5	1	6	2	2	16 (32%)
101	Control	50	0	1	0	0	0	1 (2%)
101	0.3	50	3	4	1	3	1	12 (24%)
2013	Control	50	0	0	0	0	0	0
2013	0.3	50	0	0	0	0	0	0
1060	Control	50	0	0	0	0	1	1 (2%)
1060	0.3	50	1	1	0	0	1	3 (6%)
totales			23	22	14	9	7	75