# AVANCES EN EL ESTUDIO DE LA HETEROCROMATINA EN ROB 1;29. UN REORDENAMIENTO CROMOSOMICO QUE PRODUCE MORTALIDAD EMBRIONARIA TEMPRANA

**Tellechea, B., Llambí,S., De Bethencourt, M., Rincón,G., Postiglioni,A.**

Laboratorio de Análisis Genéticos en Animales Domésticos. Area Genética. Facultad de Veterinaria. UDELAR. Email: alipos@adinet.com.uy

## RESUMEN

La translocación Robertsoniana heterocigota 1;29 es un reordenamiento cromosómico heredable considerada como causa endógena de pérdida embrionaria. Embriones portadores presentan un desarrollo más lento que los normales, infiriéndose una dependencia con la reorganización de su cromatina. Se caracteriza por ser monocéntrica, con pérdida de ADN alfoide (DNA (1) y probables reordenamientos en su heterocromatina. Se plantea heterocigosis en sitios específicos de los cromosomas homólogos BTA1, BTA29 y BTA1;29, como posibles polimorfismos. Se basa en la expresión de sitios de inestabilidad de la cromatina, potenciados por la acción del inductor afidicolina (0.3uM). Se optimizan bandeos de restricción (RE) para posterior identificación de sitios específicos ricos en secuencias CG y AT. Se procesa muestra de sangre heparinizada (5U/ml) de un bovino Criollo Uruguayo portador de rob1;29 por cultivo linfocitario completo. Se establecen tubos control y con inducción. Se muestrean 100 metafases para 3 lugares de inestabilidad de la cromatina, encontrándose una probabilidad de 85% de metafases heterocigotas para la expresión de fragilidad. Se estudia bandeos RE previa incorporación de RNAasa (10mg/ml), durante 4, 5, 6 y 8hrs, optimizándose el bandeo en 4 hrs. Se estiman las discrepancias en 3 pares de sitios de fragilidad: A= BTA1;29 y B= BTA1 ($\chi^2_{AB13/21}$=3,24 P>0.05; $\chi^2_{AB\ 31}$= 9,35 P< 0.01; $\chi^2_{AB\ 43}$= 9,26 P<0.01). Las diferencias significativas apoyan la existencia de polimorfismos entre los sitios de fragilidad de la cromatina.

## SUMMARY

The Robertsonian translocation rob1;29, is a heritable chromosome rearrangement. It is considered as an endogenous cause of embryonic loss, when it is presented in heterozygous condition. It is suggested a dependence between the delay development of the embryos and chromatin reorganization. This aberration is presented as monocentric, with loss of DNA$\alpha$1 and possible rearrangements of heterochromatin. Heterozygosis in specific sites of homologous chromosomes (BTA1, BTA29 y BTA1;29) is suggested due to the expression of inestability sites of chromatin, potenciated with aphidicolin inductor (0.3uM). Restriction bands techniques was optimized to identify specific sites rich in AT and CG sequences. Heparinized blood samples(5U/ml) of a carrier Uruguayan Creole cow was processed to complete lymphocytes culture. Control and induction tubes were identified and 100 metaphases for 3 sites of inestability of chromatin were proccesed. A probability of 85% was found of heterozygous metaphases to fragility expression. Restriction bands techniques was optimized at 4hrs. of incubation, with a previous incorporation of RNAsa (10mg/ml). The differences in 3 pairs of fragility: A= BTA1;29 y B= BTA1 $\chi^2_{AB13/21}$=3,24 P>0.05; $\chi^2$AB 31= 9,35 P< 0.01; $\chi^2$AB 43= 9,26 P<0.01) were high significant so the existence of polymorphisms between fragilitiy sites of chromatin is substained.

## INTRODUCCIÓN

En bovinos, la translocación Robertsoniana 1;29 es un reordenamiento cromosómico identificado en más de 40 razas comerciales y en reservas genéticas. Kawarsky y King (2003) reportan una frecuencia de 0,5-5% en razas de carne y de 0 -11% en razas de leche. En la reserva genética de bovinos Criollos uruguayos, se presenta en un 4% (Postiglioni y col., 1996), similar a la población de Criollos venezolanos puros con frecuencia de 4.8% (Muñoz y col., 1995).

Se caracteriza por ser heredable, con actividad reproductiva normal en sus portadores, excepto en la segregación cromosómica de su meiosis. Se manifiesta un aumento de la tasa de retorno al servicio debida a mortalidad embrionaria temprana, siendo causa de refugo en rodeos comerciales (Gustavsson, 1969). Se identificó en razas lecheras suecas (Swedish Red-White) con incidencias de 14% en heterocigosis y 0.34% en homocigosis (Gustavsson, 1969). Es monocéntrica, con pérdida de un tipo de ADN alfoide (DNA (1), rico en secuencias CG y translocación recíproca de heterocromatina entre los cromosomas BTA29 y BTA1 (Iannuzzi y col., 1987; Chaves y col., 2000, Postiglioni y col.,2003). Es considerada una causa endógena de pérdida embrionaria (Kastelic y Mapletoft, 2003). Embriones producto de esta anomalía tendrían un índice mitótico bajo perdiéndose durante las primeras etapas de gestación debido a un retardo en su desarrollo; postulándose una relación entre la composición cromosómica (cromatina: heterocromatina y eucromatina) y el desarrollo embrionario (King,1991; Kawarsky and King, 2003).

Un desvío de la relación teórica esperada de embriones balanceados (2 normales: 1 portador), sugieren un retardo en el desarrollo del embrión portador de la rob1:29 (Kawarsky and King, 2003). El encuentro de polimofismos en regiones homólogas del trivalente, permitiría profundizar en la dinámica de la heterocromatina que involucra los cromosomas de la translocación.

La afidicolina (APC) es un inhibidor específico de la ADN polimerasa ( (función específica en la replicación del ADN) que potencia sitios de inestabilidad del genoma más predispuestos a sufrir aberraciones cromosómicas. Se utiliza como marcador para estudios de homología cromosómica en regiones dinámicas de la cromatina (Sutherland y Hecht, 1985), mientras que bandeos de restricción (RE), utilizando enzimas específicas, permiten identificar regiones ricas en CG y AT del genoma bovino.

En esta nota se presenta el estudio de la heterocromatina correspondiente a los cromosomas involucrados en la translocación Robertsoniana rob1;29, en un bovino Criollo. Este estudio se basa en la expresión de sitios de inestabilidad de la heterocromatina y la optimización de bandeos de restricción, lo que permitirá profundizar en sitios específicos del genoma.

## MATERIALES Y METODOS.

Se seleccionó una hembra adulta portadora de rob1;29 perteneciente a la reserva de bovinos Criollos del Parque Nacional de San Miguel (Depto. de Rocha), cuya progenie presentó cariotipos normales(2n=60) y portadores (2n=59;rob1;29).

**Estudios citogenéticos.**

**a) Inducción de cultivos linfocitarios con afidicolina.**
Se extrajo 5ml. de sangre heparinizada (5 U/ml) en condiciones asépticas, manteniéndose refrigerada hasta su procesamiento. Se procedió a realizar el siguiente experimento, basado en cultivos linfocitarios:
Se sembraron 80ul. de sangre entera en 4 tubos de medio RPMI 1640 completo (suero fetal:10%, fitohemaglutinina M;GIBCO, antibióticos: (estreptomicina y penicilina;10.000IU). Se incubó durante 72 hrs. en baño María (Memmert) a 38ºC, con incorporación de colchicina (0.004ug/ml), 1hr. Se identificaron tubos controles de la inducción (N° 1 y 2) y tubos con inducción (N° 3 y 4) de APC (0.3 uM) durante12 hr (Rodríguez y col., 2003). Se sacrificó el cultivo de acuerdo a protocolo de Laboratorio. Se observaron y registraron metafases en microscopio Olympus (BX60) anexado a software para digitalización de imágenes (Kodak Digital Science 1D). Para el análisis de estructura se utilizó el cariotipo bovino: ISCNDB (Di Berardino y col., 2001) .

**b) Optimización de técnica para estudios de sitios de restricción: MspI (C▼CGG).**
Se realizaron preparaciones en frío de la suspensión celular de tubos control. Se estableció el siguiente diseño:
-a) dos gotas equidistantes para control de la acción de la RNAasa (10mg/ml).
-b) dos gotas equidistantes para control de la acción enzimática (con y sin buffer específico) realizándose incubaciones a temperatura y humedad constante (37°C), durante 4, 5, 6 y 8 hrs.

**Análisis estadístico**
Se cuantificaron 100 metafases para analizar la expresión diferencial de sitios frágiles comunes (cFS) entre los cromosomas: BTA1;29, BTA1, BTA29, en metafases inducidas (APC, 0.3 uM) y controles. Se realizó un estudio probabilístico, de acuerdo a la metodología de Sutherland y Hecht (1985).
Se llamó: A = BTA 1;29 ; B = BTA 1, siendo:
a= probabilidad de expresión de sitio frágil en BTA 1;29.
b= probabilidad de expresión de sitio frágil en BTA1.
a x b =probabilidad de expresión simultánea en ambos homólogos.
Se realizó la prueba de $\chi^2$ para dos clases fenotípicas. a los efectos de valorar las discrepancias entre los datos fenotípicos obtenidos en el reordenamiento.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se valora la inducción espontánea (control) en un 4%. Se procedió a la cuantificación y registro de datos del trivalente, de acuerdo a Tabla 1.

En un total de 68 sitios de fragilidad, 55 correspondieron a BTA1;29, 13 a BTA1 y 0 a BTA29, obteniéndose los siguientes datos; a=55/68=0.80; b=13/68=0.19; a x b =0.80 x 019 =0.15. Este análisis inter-cromosómico indica que el 15% de las metafases expresan sitios de fragilidad en ambos homólogos, mientras que el 85% de las metafases presentan heterocigosis para este lugar de expresión de inestabilidad del genoma. Los análisis estadísticos realizados entre cada uno de los 3 sitios de fragilidad encontrados a lo largo de los cromosomas BTA1, evidencian los siguientes resultados: $\chi^2_{AB13/21}$= 3,24:P<0.05; $\chi^2_{AB31}$=9,35 P<0.01; $\chi^2_{AB43}$=9,26:P<0.01. Se deducen diferencias significativas en aquellos sitios proximales al telómero y el límite de significación para aquellos próximos al centrómero. Se asume heterocigosis en estos sitios específicos, ya identificados en el mapa de APC (Rodriguez y col., 2003). Se ha reportado una heterocigosis para el fra10q25 humano (Sutherland y Hecht, 1987) sugiriendo inestabilidad de la cromatina en estas regiones del trivalente para la rob1;29.
Dimitri y Junakovic (1999) expresan que la dinámica del genoma se debe a reestructuras en regiones de heterocromatina cuyas variantes actuarían como barreras de fertilidad con sus consecuentes divergencias evolutivas y de especiación. El encuentro de polimorfismos en sitios de restricción en bovinos portadores de la rob1;29, aportarán mayores evidencias de estos lugares dinámicos de la heterocromatina, que podrían estar involucrados en la expresión génica.

**AGRADECIMIENTOS:** Se agradece a la Dra. MV. Marcela Silveira por el envío de la muestra y a la Sra. Iris Hernández por las condiciones adecuadas de trabajo del Laboratorio. El trabajo se realizó dentro del Convenio de F. Veterinaria con SE.PA.E y financiación PEDECIBA, proventos, UdeLAR y C.I.D.E.C.

## BIBLIOGRAFIA

Chaves,R.,Heslop-Harrison,J.S.,Guedes-Pinto,H.2000. Centromeric heterochromatin in the cattle rob(1;29) translocation:( -satellite I sequences, in situ MspI digestion patterns, chromomycin staining and C-bands. Chromosome Research. 8:621-626.

Di Berardino,D., Di Meo,GP, Gallagher,DS, Hayes,H., Iannuzzi,L. 2002 ISCNDB.: International System for

**TABLA 1:** Frecuencias absolutas de cFS en metafases de cultivos linfocitarios espontáneos(control) e inducidos(APC: 0.3uM) de un bovinos Criollo (rob1;29).

| | Metafases (nº=50) | | BTA 1;29 | | | | BTA 1 | | | BTA2 9 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Control | C/FRA. | S/FRA | SF1;29 q13/21 | SF1;29 q31 | SF1;29 q43 | SF1;29 p | 1q13/21 | 1q31 | 1q43 | - |
| | 2 | 48 | - | 1 | 1 | - | - | - | - | - |
| Inducida | 47 | 3 | 8 (14%) | 18 (32%) | 27 (49%) | 2 (13.6%) | 2 (15%) | 3 (23%) | 8 (61%) | - (0%) |

chromosome nomenclature of domestic bovids. Cytogenet Cell Genet. 92,283-299.

Gustavsson, I.1969.Cytogenetics, distribution and phenotypic effects of a translocation in Swedish cattle. Hereditas 63:68-169.

Iannuzzi, L., Di Berardino,D., Gustavsson,I., Ferrrara,L., Di Meo,G. 1987. Centromeric loss in translocations of centric fusion type in cattle and water buffalo. Hereditas 106: 73-81.

Kastelic, JK. and Mapletoft, RJ. 2003 Causas no infecciosas de muerte embrionaria en ganado bovino. Quinto Simposio Internacional de Reproducción Animal .IRAC.149-159. King W.A.1991 Embryo-mediated pregnancy failure in cattle.Can.Vet. J. 32:99-103.

Kawarsky, SJ., King,W.A. 2003. Developmental potential of embryos with chromosomal abnormalities. Ontario Beef Research. 1-7.

King,W.A.1991.Embryo-mediated pregnancy failure in cattle. Can Vet. J. 32 :99-103.

Muñoz,M.G., Ocanto,D., Medina,R.,Duraes.M.I.1995 Incidence of 1/29 translocation in Venezuelan Creole pure and crossbreed cows used in reproductive programs. Theriogenology 43:1055-1060.

Postiglioni,A., Llambí,S.,Gagliardi, R. and De Bethencourt,M. 1996. Genetic characterization of uruguayan Creole cattle. I.Cytogenetic Characterization of a sample of uruguayan Creole cattle. Archivos de Zootecnia.vol.45,N°170-171.209-213.

Postiglioni,A., Llambí,S., Arruga,MV. 2003. Common fragile sites expression in rob(1;29)andtheir relations with chromosome rearrangements.15thECACGM P8.

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

Sutherland,G.R. and Hecht,F. 1985. Fragile sites on Human chromosomes. Oxford University Press.