

Jorge Eduardo Gallo Bohorquez

CARACTERIZACION CITOGENETICA DEL OVINO COLOMBIANO DE PELO

Citogenética es la ciencia híbrida que trata de correlacionar los procesos celulares, especialmente aquellos de los cromosomas, con fenómenos genéticos. Una definición más estricta es la referencia por MC Feely, quien indica a la citogenética como el estudio de la morfología y funcionamiento de los cromosomas.

Esta ciencia se ha convertido en una disciplina moderna en los últimos treinta años; sin embargo vale la pena recordar que los primeros cromosomas fueron visualizados por Virchow en 1857, y que solo hasta 1903 y gracias al avance de la citología fue posible relacionar y entender con exactitud los descubrimientos de Mendel en 1866.

UTILIDAD DE LA CITOGENETICA

Los campos científicos que se han beneficiado de los avances en la citogenética son muchos y variados, sin embargo podemos agruparlos en: Transferencia de los embriones, fertilización In Vitro, conservación del germoplasma, la determinación temprana del sexo, transgenia celular, estudio de fertilidad en híbridos, mejoramiento animal y vegetal, estudios de paternidad, fitogenética. En casos patológicos, la citogenética ha permitido adelantar estudios de

las transformaciones en células neoplásicas, realizar diagnósticos de rutina en muerte embrionaria, anomalías congénitas y reducción de la eficiencia reproductiva.

LA CITOGENETICA Y EL OVINO COLOMBIANO DE PELO

Para lograr dilucidar la aplicación de la citogenética en el manejo, cría y mejora del ovino colombiano de pelo es necesario reconocer los aspectos filogenéticos, los taxonómicos y los conceptos básicos del mejoramiento animal y la citogenética aplicada.

Origen de los ovinos

Fitzhugh y Bradford consideran que los seis tipos de ovinos reportados en América provienen de un mismo tipo genético, con excepción del Persa cabeza negra.

Bouilev, Pegarev, Potokin y colaboradores conceptúan que el camero Crinero africano fue el progenitor de las ovejas Crineras africanas.

En Colombia contamos en general con tres tipos de ovinos de pelo: Las Africanas (Sudán y Etiope), la Barbados, Black belly y el Persa de cabeza negra. La ubicación del

origen de este último tipo en la zona oriental de Africa o en Asia suroccidental conduciría a un origen genético probable en el Argalí, al cual Kuleshov considera como el antecesor más probable de las ovejas domésticas.

Otra hipótesis explicaría el origen de estos tipos de ovinos en el grupo del Bharal, que cuenta con el carnero Barbary (*Ovis tragelaphu*) como el pariente salvaje más cercano de los ovinos del norte de Africa.

Taxonomía animal

El género *Ovis* ha sido clasificado en la clase de los mamíferos, el orden de los Artiodáctilos, el suborden de los rumiantes, la familia Bovidae, la subfamilia Caprinae. Para Bovilev en la subfamilia existen tres géneros: el de los carneros, los caprinos y los carneros crineros. El género de los carneros presenta especies salvajes como el Muflón, el Arcar y el Argalí, considerados como antecesores de las ovejas domésticas.

Para el género del carnero Crinero no ofrece descripción de especies ni variedades; sin embargo, se pueden enmarcar allí a los animales del grupo del Bharal con el carnero Barbary.

Antecedentes zootécnicos de la explotación ovina

La introducción de razas africanas se remontan a los siglos XVII y XVIII, con un refrescamiento de genes ocurrido en 1940, y posteriormente esporádicas introducciones de genes

de animales traídos de las Antillas, Centroamérica y Venezuela.

En general los ovinos colombianos de pelo se han desarrollado bajo una presión preponderante de la selección natural; la introducción de genes nuevos no ha sido notoria, ya que al parecer los núcleos de ovinos Persa cabeza negra se han desarrollado aislados con un alto grado de consaguinidad. Si a lo anterior se agrega la observación general de tasas de mutación naturales y la meiosis normal, se podría aducir un estado de equilibrio de la población solamente controvertido por la explotación bajo forma de pequeños núcleos que han podido conducir a los mismos a un estado de aislamiento geográfico, conllevando a procesos de diferenciación específica o inicialmente al desarrollo de una deriva genética en la población.

Estos dos cuestionamientos pueden tener una respuesta con base en la implementación de aquellas técnicas citogenéticas que indiquen de manera relativa la distancia genética entre grupos de animales.

Otra respuesta que se podría hallar en las técnicas citogenéticas, se relaciona con la posibilidad de enmarcar dentro de los procesos de selección y los marcadores de producción, que serán aclarados más adelante.

TÉCNICAS CITOGENÉTICAS DISPONIBLES

Actualmente es factible examinar los cromosomas de los animales domésticos por un número variado de

vías, cuya escogencia depende de los objetivos generales y específicos del estudio a realizar. Estas técnicas permiten inferir no solo las variaciones estructurales de los cromosomas, sino que además permiten dilucidar dinámicas propias de la división cromosómica.

En general es posible obtener material para estudio a partir de tres estados celulares: células interfásicas, células mitóticas en metafase y de células meióticas. Los materiales obtenidos de estas fuentes pueden ser analizadas por métodos de observación directa y de citofotometría (a partir de los contenidos de DNA). En nuestro caso, la factibilidad técnica de los proyectos exigen el uso de métodos directos a través de microscopios ópticos.

A partir de células interfásicas

Cromatina sexual (Corpúsculos de Barr)

Esta técnica permite, a partir de células originadas en el ectodermo (tejido nervioso, piel) detectar cerca al núcleo de la célula, masas de cromatina que corresponden al cromosoma X inactivo; su presencia

indica el diagnóstico del sexo femenino (hembra).

Lóbulos Nucleares Accesorios - Palillos o bastones nucleares

El cromosoma X inactivo, también puede ser observado como un pequeño fragmento, en forma de palillo, en los núcleos de las células polimorfonucleares en extensiones sanguíneas de rutina.

El recuento de seis palillos en 500 células es suficiente para el diagnóstico de hembra en perro, gato, oveja, cabra y caballo. En cerdos se recomienda el recuento de 500 células libres para determinar un macho. Esta técnica es de poca utilidad en bovinos, dada la morfología de los núcleos celulares.

Células mitóticas en metafase

Es la forma más común de efectuar estudios citogenéticos. En mitosis, la cromatina se encuentra condensada y es posible la visualización individual de los cromosomas en un microscopio óptico. En este estado, se observan las dos cromátides unidos por el centrómero, que ha permitido la clasificación de los cromosomas de la siguiente manera:



1

Metacéntrico



2

Submetacéntrico



3

Acrocéntrico



4

Telocéntrico

Las células pueden ser obtenidas de tejidos con altos índices de división, (médula ósea), biopsias, necropsias, o más comúnmente a partir de cultivos *in vitro*.

El objetivo en general es obtener un gran número de células, deteniendo la división de células en metafase, lográndose determinar el número cromosómico, la morfología y la presencia de anomalías.

Cultivo de linfocitos

Técnica implementada por Moorhead en 1960 y adaptada para animales domésticos por Basbrur en 1964. Es el método más utilizado para el análisis rutinario de cromosomas, por la facilidad de obtención de la muestra (sangre con anticoagulante), la facilidad de cultivo y la calidad de imágenes obtenidas. El cultivo se efectúa de manera aséptica, estimulando la división agregando un mitogeno. El cultivo se incuba por 48 - 72 horas a 36 - 38°C en condiciones estériles. El proceso de división se detiene por la adición de colchicina y las células son cosechadas, fijadas, extendidas y coloreadas para su estudio.

Técnica de médula ósea

Permite un procedimiento directo, o cultivo a corto plazo. Es útil en los casos de leucemia, cuando permite determinar la línea celular afectada.

Cultivo de fibroblastos

A partir de la piel; es simple pero un poco más dispendioso; útil en caso de

estudios en especies en vía de extinción y confirmación de cariotipos.

Cultivo de células de líquido amniótico

Obtenidas por vía transvaginal o sacrociática; es importante en la detección temprana del cariotipo fetal (sexo o anomalía cromosómica).

Células meióticas

Obtenidas a partir del material proveniente de las gónadas en cualquier estado de la vida animal del macho. Otra técnica exige la recuperación de oocitos en casos de fertilización *in vitro*, con cultivo por 24 horas.

Requisitos del cultivo

Cada metodología tiene las exigencias, pero en general debe tenerse especial cuidado con la asepsia en la toma de la muestra y el proceso de cultivo. Los materiales deben ser esterilizados de manera conveniente (calor seco 175°C por 2 horas o húmedo 121°C por 21 minutos).

Proceso General

Cultivo de linfocitos. Se resume así:

- Esterilización del material.
- Preparación y filtración del medio de cultivo.
- Heparinización de jeringa o tubo.
- Toma de muestra sanguínea.
- Siembra aséptica.

- Incubación.
- Detención de división celular.
- Aplicación de solución hipnótica.
- Fijación.
- Extendido.
- Tinción.
- Estudio preliminar.
- Bando.

Reactivos

Medio de Cultivo. Son una mezcla de nutrientes básicos, esterilizados por filtración a pH 7.2-7.4.

Suero Fetal Bovino. Sueros fetales o neonatales filtrados por membrana, inactivados por calor y que favorecen la multiplicación celular.

Mitógeno. Proteínas vegetales del tipo lectina que propician la división celular. Las más usadas son la fitohemaglutinina P, M, el pokeweed y la concanavalina.

Antimicrobianos. Se usa la adición de antibióticos como la penicilina y la estreptomina y de antimicóticos como la anfotericina.

Colchicina. Encargada de detener la división celular por inhibición de la formación del huso mitótico.

Solución Hipotónica. Promueven la expansión celular, la dispersión cromosómica y la eritrolisis. Se utiliza cloruro de potasio 0,07 M.

Fijadores. Penetran la célula y preservan la estructura cromosómica por precipitación o coagulación de las proteínas. Se utilizan soluciones frescas de una parte de ácido acético

glacial por tres de alcohol metílico absoluto.

Identificación de los cromosomas

Los cromosomas fijados y tratados especialmente tiñen diferencialmente áreas internas produciendo patrones de bando de intensidad, tamaño y localización específica.

Este patrón de bandas permite la individualización de los cromosomas, la detección de arreglos estructurales, la caracterización de síndromes y la asignación de genes en sitios específicos. Las técnicas más usuales son:

- **Bandas G:** Producidas por desnaturalización de las proteínas.
- **Bandas Q:** Por tinción con quinacrina de las áreas de heterocromatina dando un patrón semejante a G y fluorescente.
- **Banda C:** Tiñen la heterocromatina constitutiva (Centrómeros).
- **Bandas R:** Por desnaturalización proteica, ofrece un patrón inverso a las Bandas G y Q.
- **Bandas NOR:** Detecta las regiones organizadoras del nucleolo.

Está plenamente demostrada la relación que existe entre las regiones organizadoras del nucléolo (NORS) y el nucléolo mismo, y entre la estructura y la fisiología de este organelo y la formación de los ribosomas. Además se conoce que estos últimos son piezas claves en la síntesis de proteína, que es

fundamental en los procesos de crecimiento y producción animal.

Otras bandas son: las bandas Brdu que permiten inferir la dinámica celular, las Bandas T, que tiñen los telómeros y la técnica de capacidad de intercambio de las cromátidas hermanas que muestra la capacidad de recombinación que poseen de los cromosomas.

Los cromosomas de los ovinos

El número diploide de los ovinos (*Ovis aries*) es de 54; en tanto el de los bovinos y caprinos es de 60.

La diferencia radica en que los 60 cromosomas de la cabra son acrocéntricos, y en los de los bovinos, solo el cromosoma X y Y los submetacéntricos (*Bos taurus*).

En la oveja existen tres pares de cromosomas submetacéntricos, originados aparentemente en la translocación recíproca de los cromosomas 3 y 1; 8 y 2 y 11 y 5 de los semejantes a los cromosomas bovinos.

Anomalías Cromosómicas

Los efectos directos de las anomalías cromosómicas se traducen por lo general en mortalidad embrionaria, neonatal, infertilidad, subfertilidad y subletalidad.

En ovinos se han detectado anomalías que pueden clasificarse como estructurales, y son:

- Fusión Céntrica o Translocación robertsoniana. Se han identificado 4 tipos: Massey I(t_1); Massey II(t_2) y Massey III(t_3). Massey IV(t_4) que explican la unión de los cromosomas 6/26; 8/11; 7/25 y 11/17 respectivamente.
- Translocación Recíproca. Se han detectado 2 tipos. La primera relacionada con la reducción de la prolificidad de razas germanas y la segunda relacionada con el incremento de la talla y disminución de la fertilidad de ovinos islandeses.
- Delecciones. Algunos asociados con braquignatia o agnatia y en la mayoría no se asociaron con ninguna anomalía fenotípica.

Anomalías Numéricas

- Síndrome de Turner (XO). Asociado con fallas de la fertilidad, displasia y disgenesia de órganos de la reproducción.
- Síndrome de Klinefelter (XXY). Asociado con hipoplasia testicular, ausencia de espermatogénesis y bajos niveles de testosterona.
- Supermacho (XYY). No asociado con aspectos fenotípicos.
- Intersexos.
 1. Freemartins. El término "freemartins" se refiere a una quimera resultante de la presencia de 2 líneas celulares diferentes XX y YY en un mismo individuo. En ovinos es menos frecuente que en

bovinos debido a la conformación de las placentas y su relativo aislamiento en uso de gestaciones múltiples. El fremartinismo en ovinos ocurre entre el 1, 2 y el 5% de las gestaciones gemelares, mostrando la misma variación que en los bovinos.

2. Feminización testicular. De rara presentación, en la que los órganos sexuales en formación no responden a la secreción de las hormonas, imposibilitando la diferenciación fenotípica al sexo.

Cabe destacar que si bien estas situaciones han sido detectados en ovinos diferentes a los tipos africanos, no indica la inexistencia en estos animales, cuyos aspectos citogenéticos han sido poco estudiados.

- Híbridos interespecíficos. Si un macho cabrío monta una oveja, es común que la fertilización del óvulo falle; en contraste, si un carnero monta una cabra, generalmente se desarrolla un embrión que es abortado antes de los dos meses; al parecer la razón del aborto se halla en el campo en los antígenos maternos, la incompatibilidad materna fetal, la sensibilidad a espermias heterólogos y el volumen de líquidos fetales. Ningún estudio ha dado explicación satisfactoria a la pérdida del feto.

Existen casos documentados y con análisis citogenéticos de los híbridos visibles; entre ellos están los trabajos de Roca y Rodero, Bunch y Eldridge.

Importancia de la caracterización citogenética

A la luz de lo expuesto surge la necesidad de aclarar aspectos básicos sobre la explotación del ovino colombiano de pelo.

La caracterización citogenética brinda herramientas conducentes a la detección de la distancia genética entre los grupos raciales explotados en nuestra región (uso de bandeos G y C) y la determinación de un posible marcador citogenético de producción con base en las bandas NORS.

A la fecha se ha logrado la normalización de la técnica de cultivo de sangre completa en donde se recomienda el uso de 4 cc de medio RPMI 1640, adicionado de 1 cc de suero fetal bovino y 0,3 cc de fitohemaglutinina P. (0,7 microgramos por mililitro) en cultivo a 38°C por 66 horas. El tiempo de colchicina se fijó en una hora y con 0,1 centímetros de colchicina solución, uso diario.

Los bandeos han resultado satisfactorios con las técnicas de rutina.

BIBLIOGRAFÍA

- ABADÍA, Daniel; GAST, Patricia. 1991. Introducción a la Citogenética de Bovinos. Postgrado Universidad Nacional. FAC MVZ.
- BOBILEV Y; PIGAREV N, POTOKIN V y otros, 1979. Ganadería; Editorial MIR, Moscú. p. 12, 14, 294 - 194.
- COLE H. H., 1973 Producción animal. 3ª Edición. Editorial Acribia.
- ELDRIDGE, Franklim E, 1985 Citogenética of Livestock; Avi Plubishing Company.
- JARAMILLO HENAO, Patricia; OCHOA HENAO, Juan Pablo, 1991. Sistemas de Producción de Oveja Africana en el Departamento del Tolima. Universidad de Caldas, Facultad de M.V.Z.
- KRONACHER, C., 1937 Elementos de Zootecnia. Editor Gustavo Gili.
- MCFEELY, Richard, 1985 Domestic Animal Cytogenetics; Avi Plubishing Company.
- STANSFIELD, William, 1971. Teoría y Problemas de Genética. Libros McGraw Hill.
- WARWICH and LESATES, 1989. Breeding and Improving of farm animals. McGraw Hill. 3a Edición.
- YUNIS, Jorge J., 1974 Human Cromosome Methodology. Second Edition Academia Press.