

Identificación de Secuencias Genómicas (CCGG) en Bovinos Criollos del Uruguay

Postiglioni, A.¹; Rincón, G.¹; Llambí, S.¹; Armstrong, E.¹; Arruga, M.V.²

RESUMEN

Los bovinos Criollos Uruguayos se consideran descendientes directos de razas introducidas en América durante la época colonial (Siglo XVI), hoy naturalizadas. Su caracterización citogenética ha determinado: a) ausencia de cromosoma Y acrocéntrico de origen afroasiático, apoyando la no introgresión de razas cebuinas; b) presencia (4%) de la translocación robertsoniana (rob1;29), destacado reordenamiento en la evolución cromosómica de la familia *Bovidae*, presente en posibles razas ancestrales. Se ha descrito pérdida de secuencias de ADN alfoides (1) rico en CG durante su evolución como translocación monocéntrica. En esta comunicación se plantea la búsqueda a nivel cito-molecular y genómico de secuencias CCGG en bovinos criollos normales y portadores de la rob1;29 con el propósito de profundizar en el estudio de su cromatina. Se utiliza la enzima de restricción ER MspI (0.3U/ul) para digerir el ADN cromosómico. Se aplica bandeo CBG y contra-coloración con yoduro de propidio obteniéndose una tinción diferencial de la cromatina centromérica del cromosoma 1;29, frente a sus homólogos y resto del cariotipo. Se plantea una configuración particular de esta cromatina. Los 30 pares de brazos cromosómicos se expresan con fluorescencia pálida luego del tratamiento. Se utiliza la misma enzima MspI, para digerir el ADN genómico de una hembra portadora de la rob1;29 y un "pool" de 15 ADN's seleccionados por su alta variabilidad y cariotipo normal. El producto se corre en gel de poliacrilamida no desnaturante (6%) teñido con nitrato de plata observándose un patrón de bandeo diferencial. La hembra portadora expresa un 43% de similitud con la muestra poblacional, no presentando bandas propias. Se plantean posibles reorganizaciones de la cromatina con probable implicancia en divergencias evolutivas.

Palabras clave: rob1;29, bovinos criollos, secuencias CG.

SUMMARY

Uruguayan Creole cattle is taking down to breeds introduced in the American continent around the XVI century. The cytogenetic characterization has showed: a) absence of Y acrocentric chromosome of afroasiatic origin, so there was no introgresion of cebuine breeds; b) robertsonian translocation (rob1;29) with an incidence of 4%. It is considered an important rearrangement in chromosome evolution of the *Bovidae* family, that it is presented in ancestral breeds. Loss of a determinate DNA aliphoid sequences (1) rich in CG was found during the evolution of the monocentric translocation. It is proposed to search CCGG sequences among cyto-molecular and genomic level in Creole normal and heterozygous from 1;29, to advance in the study of its chromatin. The restriction enzyme RE MspI (0.3U/ul) was used to digest the chromosome DNA. After this, CBG banding and staining with propidium iodide were used to take a differential stain of the centromeric chromatin of the 1;29 in front of its homologous and the rest of the chromosomes. A particular chromatin configuration is showed. A light fluorescence is also shown in the 30 pairs of chromosome. The same restriction enzyme is used to digest the genomic DNA of a female heterozygous of rob1;29 and a pool of fifteen DNA selected to their high variability and normal karyotype. The samples are run in polyacrilamide desnaturated gel (6%), and differential bands were stained with silver nitrate. The heterozygous female expressed 43% of alike bands with the population sample, but not own bands is shown. Possible reorganization of chromatin connected with evolutive divergents is proposed.

Keywords: rob1;29, Creole cattle, CG sequences.

INTRODUCCIÓN

El cariotipo del bovino se caracteriza por poseer todos sus cromosomas mono braquiados excepto los cromosomas sexuales (XY) de morfología sub o metacéntrica. A nivel de evolución cariotípica dentro de la familia *Bovidae* se ha ampliamente demostrado que los procesos fusión/fisión, juegan un papel fundamental en la especiación cromosómica (16), estableciéndose un número fundamental

(NF) entre 56 y 58, en relación a los brazos cromosómicos.

En bovinos, se han descrito asociaciones entre dos cromosomas no-homólogos (autosomas; X-autosoma) configurando reordenamientos cromosómicos conocidos como fusiones céntricas o translocaciones robertsonianas (1/29, 1/21, 7/21; 19/21; 13/21; 1/26; 14/28) (1, 6, 7), asociaciones X-autosomas (X;1)(4.2;1.3); (Xp18; Xp23) teniendo ambas repercu-

siones en la disminución de la fertilidad (2, 10). Estas aberraciones cromosómicas corresponden a asociaciones terminales con rupturas a nivel centromérico, o telomérico de ambos cromosomas, donde pérdida o reordenamiento a nivel de la heterocromatina constitutiva (secuencias repetidas, ricas en ADN alfoides, secuencias teloméricas, ADN satélite) jugarían un papel fundamental en la dinámica de la cromatina (8, 9, 3, 4).

¹ Area Genética. Laboratorio de Análisis Genéticos en Animales Domésticos. Facultad de Veterinaria (UDELAR). Uruguay. Avda. A. Lasplacas 1550. E-mails: alipos@adinet.com.uy

² Dpto. Genética. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. España.

La rob1;29, es considerada un polimorfismo cromosómico, habiéndose descrito en diversas razas ibéricas como la Retinta, Barrosa, Sayaguesa, y hatos americanos, como los venezolanos, bolivianos, argentinos, uruguayos (11, 12, 17). Su amplia distribución se explicaría por la introducción a América de múltiples razas de origen ibérico durante el siglo XVI portadoras de este reordenamiento cromosómico (21).

Chaves y col., (2000) analizan regiones centroméricas de bovinos de la raza Barrosa, portadores y homocigotas de la rob1;29, encontrando pérdida de un tipo de ADN satélite (1), rico en secuencias CG, en los cromosomas bibráquidos: rob1;29, X e Y, con cierto polimorfismo entre los homólogos rob1;29.

En la reserva genética de bovinos Criollos, se ha documentado una incidencia de esta translocación heterocigota. rob1;29 de un 4% (12). En esta comunicación se realiza un estudio de la región pericentromérica de la rob1;29 y una búsqueda de secuencias ricas en CG en su ADN genómico. Se pretende mostrar una conformación diferencial de la heterocromatina centromérica (HC) y pericentromérica considerándose a esta translocación robertsoniana un reordenamiento genómico asociado a posibles remodelaciones que llevarían a aislamientos reproductivos y especiación.

MATERIALES Y MÉTODOS

La reserva genética de bovinos Criollos del Uruguay con sus 620 animales (toros, madres, crías) coexisten en 650 hectáreas del Parque Nacional de San Miguel, ubicado al noreste del país, en zona fronteriza con Brasil (Depto. Rocha).

Se extrajo sangre de vena yugular heparinizada a 15 bovinos seleccionados por alta heterocigosidad para determinados marcadores moleculares, cariotipo normal (2n=60) y una hembra portadora de la rob1; 29.

Análisis citogenético

Las preparaciones cromosómicas se obtuvieron de cultivos linfocitarios estándar. Los linfocitos se cultivaron en baño Memmert a 38° C, durante 72 hrs. procesándose éste de acuerdo a protocolo de Laboratorio. La cromatina se dejó en-

vejecer 48 hrs. adquiriendo mayor resistencia a la acción enzimática (20).

Material celular con y sin digestión de ER MspI (0,3U/ul) (BioLabs) se incubaron en cámara húmeda con buffer específico a 37°C en estufa de cultivo (Memmert). La digestión se realizó de 12 a 16 hrs, de acuerdo a protocolo de Chaves y col.

(2). Estos se tiñeron directamente o se sometieron a bandeado CBG (18) usando yoduro de propidio como contra-coloración a los efectos de controlar la acción enzimática sobre la cromatina intercalar y pericentromérica. Se observó la acción del Ba(OH)₂ sobre la estructura cromosómica en material con o sin digestión enzimática. Las preparaciones se analizaron bajo microscopio fluorescente (Olympus DBX, filtro WB) y las imágenes se capturaron con el software de Kodak Digital Science 1D.

Análisis molecular

El ADN genómico se aisló de sangre entera de acuerdo al método de John y col., (9). Se realizó un "pool" de ADN siguiendo la metodología de Rincón y col., (15). Esta se encuentra constituido por 15 muestras de bovinos Criollos con cariotipo normal y altamente variable. El "pool" de ADN genómico y el ADN de la madre portadora rob1;29 se digirieron con enzima de restricción (MspI:5'CCGG3') (0,3U/ul), a 37° C, entre 12 a 16 hrs. con posterior tinción de nitrato de plata (Q4162/PROMEGA). La cuantificación del bandeado se realizó con un software analizador de imágenes (Kodak Digital Science 1D) y el peso molecular de los fragmentos de restricción se analizaron en base al marcador 100bp DNA ladder (GIBCO).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1 se observa fluorescencia brillante en toda la heterocromatina centromérica (HC) de los autosomas, que contrasta con la fluorescencia pálida de la región centromérica de la rob1;29. Los bloques de fluorescencia brillante se obtienen también en aquellas metafases tratadas para bandeado CBG sin previa digestión de regiones ricas en CG. De esta experiencia se desprende que los ADN alfoides ricos en CG no se digieren fren-

te a la acción enzimática. En contraposición, la débil fluorescencia en la HC. de la rob1;29 puede interpretarse sea por la pérdida de ADN (1), demostrado por hibridización "in situ" con sondas de ADN satélite (3,4) y/o por la presencia de secuencias cortas de alrededor de 200pb que son rápidamente digeridas por la enzima y eliminadas (20). Además, el violento tratamiento de digestión "overnight" ha permitido identificar una HC específica en los brazos p y q de la rob1; 29 lo que apoya la existencia de complejos reordenamientos en regiones proximales al centrómero (19), la existencia de polimorfismos a nivel de expresión de fragilidad (13, 22) y la existencia de una conformación particular de la cromatina centromérica de esta translocación monocéntrica.

Por otro lado, también se observó una débil fluorescencia a nivel de la cromatina en los 30 brazos cromosómicos a diferencia de lo encontrado en la raza Barrosa frente al mismo tratamiento enzimático (3). Se propone ajustar el tiempo de digestión de la enzima para el genoma del ganado criollo Uruguayo a los efectos de reconocer polimorfismos a nivel de la heterocromatina intercalar y proximal al centrómero. Dado que esta enzima reconoce y corta secuencias específi-

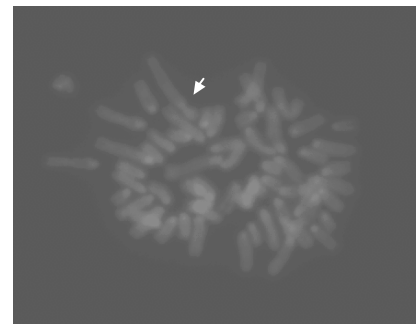


Figura 1. Metafase somática de un individuo con cariotipo anormal, rob1;29. Digestión de la cromatina con la ER MspI, bandeado-CBG, contratinción con yoduro de propidio. Se observa fluorescencia brillante en la región centromérica de los autosomas y fluorescencia tenue en la región centromérica del cromosoma bibráquido rob 1; 29.

cas 5'CC GG3, independiente de su estado de metilación se utilizó en forma preliminar para digerir ADN genómico de los bovinos Criollos de la reserva genética. Se experimentó con ADN de una hembra portadora de la rob1;29 frente a un "pool" de 15 ADNs seleccionados por su alta variabilidad y cariotipo normal. Se observa un bandeo diferencial sobre un gel de poliacrilamida no desnaturalizante (6%), donde la hembra portadora expresa un 43% de similitud con la muestra poblacional, no presentando ningún fragmento original en el genoma de este animal (Fig. 2). Se propone realizar una identificación individual de secuencias CCGG en la población (animales normales y portadores de la rob1;29) a los efectos de conocer y evaluar su distribución ya que genomas de animales rob1;29 han demostrado ser más inestables que los normales (14). De comprobarse la implicancia de estas secuencias en la inestabilidad de la cromatina, se podrán éstas asociar a remodelaciones genómicas que ocurren en la evolución y que podrían llevar a aislamientos reproductivos y especiación (5).

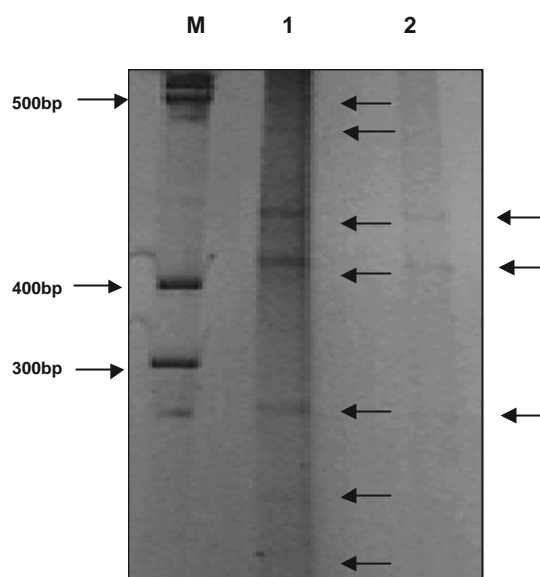


Figura 2. Digestión de ADN genómico con la ER: MspI. (CC⁻GG). M: marcador de peso molecular (100bp Ladder); 1. "pool" de ADNs de bovinos con cariotipo normal; 2. ADN de vaca heterocigota rob 1;29.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Sra. Iris Hernández por el servicio técnico en el Laboratorio, a la Dra. MV. Marcela Silveira y personal del Servicios de Parques del

Ejército (SEPAE) por su constante apoyo en el trabajo realizado, y a las Instituciones de PEDECIBA, CSIC, Universidad de la República, CIDEA (Facultad de Veterinaria) por el apoyo financiero.

Referencias bibliográficas

- Arruga, M. V.; Zarazaga, I.** (1987). La translocación Robertsoniana 1/29 en el ganado vacuno. Su incidencia en las razas vacunas españolas. *Genética Ibérica*, 39 (1-2): 61-75.
- Basrur, P.K.; Reyes, E.R.; Farazmand, A.; King, W.A.; Popescu, P.C.** (2001). X-autosome translocation and low fertility in a family of crossbred cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 67.
- 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.
- Chaves, R.; Atega, F.; Wienberg, J.; Guedes-Pinto, H.; Heslop-Harrison, H.** (2003). Molecular cytogenetic analysis and centromeric satellite organization of a novel 8;11 translocation in sheep: a possible intermediate in biarmed chromosome evolution. *Mammalian Genome*. 14:706-710.
- Dimitri, P.; Junakovic, N.** (1999). Revising the selfish DNA hipótesis. New evidence on accumulation of transposable elements in heterochromatin. *TIG*, 15 (4): 123-124.
- Eldridge, F.** (1985). *Cytogenetics of Livestock*. AVI, INC. 297.
- Gustavsson, I.** (1969). Cytogenetics, distribution and phenotypic effects of a translocation in Swedish cattle. *Hereditas* 63:68-169.
- Iannuzzi, L.; Di Bernardino, 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.
- John, S.; Weitzner, G.; Rozen, R.; Sriver, C.** (1991). A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. *Nucleic Acids Research*:19(2), 408. -16
- Mayr, B.; Korb, H.; Kiendler, S.; Brem, G.** (1998). Reciprocal X;1 translocation in a calf. *Genet. Sel. Evol.* 30: 305-308.

- 11. Muñoz, M.G.; Ocanto, D.; Madriz, M.L.; Medina, R.; Vera, O.** (1994). Incidence of 1/29 translocation in Venezuelan Creole Bulls. *Theriogenology* 41: 379-382.
- 12. Postiglioni, A.; Llambí, S.; Gagliardi, R.; 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.
- 13. Postiglioni, A.; Llambí, S.; Guevara, K.; Rincón, G.; Armstrong, E.; Arruga, M.V.** (2002). Sitios frágiles comunes en marcadores cromosómicos polimórficos. Su identificación en bovinos Criollos del Uruguay. *SERGA El Arca* 5(1): 113 (enviado).
- 14. Rangel-Figueroa, M.T.; Di Meo, G.P.; Iannuzzi, I.** (1995). Sister chromatid exchange (SCE) in cattle: a comparison between normal and rob /1;29 carrying karyotypes. *Hereditas* (23): 25-29.
- 15. Rincón, G.; D'Angelo, M.; Gagliardi, R.; Kelly, L.; Llambí, S.; Postiglioni, A.** (2000). Genomic polymorphism in Uruguayan Creole cattle using RAPD and microsatellite markers" *Research in Veterinary Science* 69, 171-174.
- 16. Robertson, W.R.B.** (1916). Chromosome studies. I. Taxonomic relationships shown in the chromosomes of Tettigidae and Acrididae, V-shaped chromosomes and their significance in Acrididae, Locustidae and Gryllidae: chromosomes and variation. *J. Morphol.* 27: 179-331.
- 17. Schifferli, C.A.; Bonelli, A.M.; Wevar, C.; Scilingo, A.M.; Arruga, M.V.** (2003). Presumptive 1/29 Robertsonian translocation observed in the Argentinean Creole cattle breed. *Anim. Res.* 52 119-123.
- 18. Sumner, A.T.** (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin *Exp. Cell Res.* 75:304-306.
- 19. Tellechea, B.; Llambí, S.; De Bethencourt, M.; Rincón, G.; Postiglioni, A.** Avances en el estudio de la heterocromatina en rob1 ;29. Un reordenamiento cromosómico que produce mortalidad embrionaria temprana. XXXII Jornadas Uruguayas de Buiatría 229-231.
- 20. Vaiman, D.; Schibler, L.** (1997). A cytogenetically anchored genetic map of bovine chromosome 1 obtained by integration flow-sorted chromosome derived microsatellite markers into the international bovine map. *Cytogenet Cell Genet* 79:204-207.
- 21. Verma, R.; Babu, A.** (1995). Human chromosomes. Principles and techniques. McGraw Hill.
- 22. Wilkins, J.V.; Martínez, L.; Rojas, F.** (1989). El ganado vacuno Criollo. *Diálogo XXXVI*. Conservación y mejoramiento del ganado bovino Criollo IICA. *PROCISUR*: 69-82.