

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
POSGRADO CONJUNTO AGRONOMÍA - VETERINARIA**



**DIFERENCIACIÓN CROMOSÓMICA MEDIANTE CARIOTIPOS ENTRE CABALLO  
MINIATURA Y CABALLO CUARTO DE MILLA.**

**TESIS**

**QUE PRESENTA**

**MARISSA LOERA LÓPEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL GRADO DE:**

**MAESTRIA EN CIENCIA ANIMAL**

**ESCOBEDO, N.L., MÉXICO**

**SEPTIEMBRE DE 2013**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
POSGRADO CONJUNTO AGRONOMÍA - VETERINARIA**



**DIFERENCIACIÓN CROMOSÓMICA MEDIANTE CARIOTIPOS ENTRE CABALLO  
MINIATURA Y CABALLO CUARTO DE MILLA**

**TESIS**

**QUE PRESENTA**

**MARISSA LOERA LÓPEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL GRADO DE:**

**MAESTRIA EN CIENCIA ANIMAL**

**ESCOBEDO, N.L., MÉXICO**

**SEPTIEMBRE DE 2013**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
POSGRADO CONJUNTO AGRONOMÍA - VETERINARIA



DIFERENCIACIÓN CROMOSÓMICA MEDIANTE CARIOTIPOS ENTRE CABALLO  
MINIATURA Y CABALLO CUARTO DE MILLA

Aprobación de tesis por el comité particular de

Marissa Loera López

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Dávalos", written over a light blue rectangular stamp.

---

Dr. Guillermo Dávalos Aranda  
Director principal

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Zamora", written over a light blue rectangular stamp.

---

Dra. Diana Elisa Zamora Ávila  
Co-Director

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Del Roble", written over a light blue rectangular stamp.

---

Dr. C. Ma. Del Roble Velasco Campos  
Co-Director  
Externo

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Luz", written over a light blue rectangular stamp.

---

Q.B.C Luz Rojas Patlán  
Co-Director  
Externo

ESCOBEDO, N.L., MÉXICO

SEPTIEMBRE 2013

**Este trabajo fue realizado en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León en conjunto con el Laboratorio de Toxicogenética del Departamento de Genética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.**

## DEDICATORIA

A mis Padres Dora Elia y Leonel por haberme apoyado en cada momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante y las ganas de seguir siempre adelante, por ser mi pilar fundamental porque sin ustedes yo no sería quien soy en estos momentos, pero más que nada, por su amor.

A mis hermanos Juan, Leonel y Mona por estar conmigo y apoyarme siempre, los quiero mucho.

A Alfonso mi amado esposo, por acompañarme durante todo este arduo camino y compartir conmigo alegrías y fracasos.

A mi Abuela que desde niña solo me dio alegría y dicha, cuyos cálidos abrazos llenaban de amor todo mi ser, sus besos eran un respiro de felicidad y sus palabras siempre las más atinadas. Sé que desde el cielo estas cuidándome y vas junto a mí en cada paso que doy. Te amo Viejita chula.

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente le agradezco a Dios por estar conmigo a lo largo de mis estudios, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad, por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y por regalarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

A la Fac. de Medicina de la UANL en especial al departamento de Toxicogenética que sin su apoyo brindado no hubiera sido posible realizar este trabajo.

Al Dr. Guillermo Dávalos que porque gracias a su tenacidad, conocimientos y motivación hemos podido terminar este trabajo y gracias por su paciencia en los momentos difíciles, sus comentarios, consejos y sobre todo creer en mi para que esto sea una realidad.

A la Dra. Diana Zamora por su apoyo en el tiempo para la terminación de este trabajo y por su incansable paciencia y apoyo en momentos de confusión.

A la Dr. C. Ma. Del Roble por abrirme las puertas de su laboratorio, por brindarme sus conocimientos, por su empeño, paciencia y su amistad. Por ayudarme a retomar el camino cuando parecía perdido.

A la Q.C.B. Luz por su aporte y su participación activa en este trabajo, por su disponibilidad y paciencia y sobre todo por escucharme y aconsejarme cuando más lo necesite.

A los demás profesores en conjunto de la Fac. de Medicina Veterinaria y Zootecnia y la Fac. de Agronomía de la UANL, porque sin sus palabras de aliento y apoyo nunca hubiera podido realizar esta tesis Dr. Gustavo Vidal, Dr. Víctor Riojas, Dr. José Luis Lazcano, Dra. Aimé Garza, Dr. Emilio Olivares, Dr. Hugo Bernal y las secretarias de la FMVZ que hacían mis estancias más amenas Reyna, Claudia Guajardo, Claudia Barrera, Yolanda Castillo y Luisa Salazar.

A mis hermanos por apoyarme en los momentos de necesidad, Juan gracias por ser un ejemplo laboral, Leonel gracias por ser un ejemplo de estudio y Mona gracias por ser mi hermana. A todos ustedes por llenar mi vida de grandes momentos.

A Mimi por todo el tiempo que pasamos juntas compartiendo risas y llanto, por ser mi apoyo emocional, por sacar una sonrisa de mis labios cada que hubo momentos difíciles, por estar ahí cada que lo necesite, gracias por ser más mi hermana que mi amiga, te quiero nena.

Gracias a los amigos y compañeros a los que he robado horas de compañía, nombrar a todos sería más extenso y podría cometer algún olvido injusto, y ustedes saben quiénes son, por ello, gracias a todos por estar ahí!

A mi amado compañero de vida, mi esposo Alfonso García Juárez gracias por estar a mi lado en este proceso, por tu comprensión, paciencia, pero sobre todo por tu amor. Contigo aprendo constantemente, amo vivir y ser contigo. Te amo mi amor porque eres mi cómplice y mi todo. SIEMPRE JUNTOS.



## ABREVIATURAS

2n	Número cromosómico diploide.
ADN	Ácido desoxiribonucleico.
Ba(OH) <sub>2</sub>	Hidróxido de Bario.
Bandas G	Bandas cromosómicas horizontales teñidas con Giemsa.
Bandas C	Técnica para generar regiones teñidas alrededor de centrómeros.
°C	Grados Centígrados.
CBG	Bandas C por hidróxido de bario utilizando Giemsa.
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono.
GTG	Bandas G por tratamiento enzimático con tripsina utilizando Giemsa.
HCl	Ácido Clorhídrico.
hr	Horas.
ISCN	International System for Humans
KCl	Cloruro de potasio.
Min	Minutos.
ml	Mililitro.
μl	Microlitro.
NORs	Región Organizadora del Nucléolo.
pH	Potencial de hidrógeno.
PHA	Fitohemaglutinina.

rpm	Revoluciones por minuto.
RPMI 1640	Medio Roswell Park Memorial Institute.
SSC	Solución Salina y Citrato de Sodio.

## INDICE DE CONTENIDO

<b>DEDICATORIA</b>	<b>ii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>iii</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>vi</b>
<b>INDICE DE CONTENIDO</b>	<b>viii</b>
<b>INDICE DE FIGURAS Y TABLA</b>	<b>x</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>xii</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
OBJETIVOS GENERALES	2
OBJETIVOS ESPECIFICOS	2
HIPÓTESIS	2
JUSTIFICACIÓN	2
<b>LITERATURA REVISADA</b>	<b>3</b>
2.1 Generalidades	3
2.2 <i>Equus Caballus</i>	3
2.3 Citogenética	4
2.4 ADN y Proteínas	5

2.5 Cromosomas	7
2.6 Bandas Cromosómicas	9
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>13</b>
3.1 Población	13
3.2 Cultivo	13
3.3 Cosecha	14
3.4 Fijación	14
3.5 Preparación de Laminillas	14
3.6 Técnica de Bando G	15
3.7 Técnica de Bando C	15
3.8 Técnica de Bando NOR's	15
<b>RESULTADOS</b>	<b>17</b>
<b>4.1 Bandas G</b>	<b>17</b>
<b>4.2 Bandas C</b>	<b>29</b>
<b>4.3 Bandas NOR's</b>	<b>30</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>32</b>
<b>CONCLUSIÓN</b>	<b>34</b>
<b>LITERATURA REVISADA</b>	<b>35</b>

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

### TABLA

1. Población de estudio	13
-------------------------	----

### Figuras

1. Composición de la cromatina	5
2. Composición del cromosoma con sus compuestos	7
3. Esquema de cromosomas por su tamaño	8
4. Proceso para obtención del cariotipo	16
5. Dibujo esquemático de bandas G en cromosomas equino tal como se describe en el último cariotipo del caballo estándar	17
6. Caballo miniatura. Individuo I	18
7. Caballo miniatura. Individuo II	19
8. Caballo miniatura. Individuo III	20
9. Caballo miniatura. Individuo IV	21
10. Caballo miniatura. Individuo V	22
11. Caballo miniatura. Individuo VI	23

12. Caballo miniatura. Individuo VII	24
13. Caballo miniatura. Individuo VIII	25
14. Caballo miniatura. Individuo IX	26
15. Caballo miniatura. Individuo X	27.
16. Comparación de Cariotipo, A) Caballo Miniatura, Individuo VI;  B) Caballo Cuarto de milla, Individuo IX.	28
17. Metafases de hembras Miniatura mostrando la banda  teñida en el cromosoma X en tinción de Bandas C.	29
18. Bandas NOR's marcadas en Caballo miniatura en  los cromosomas 1, 16, 25, y 31.	30

## RESUMEN

El objetivo de este estudio fue hacer una diferenciación en el cariotipo del Caballo Miniatura contra el Caballo Cuarto de milla mediante bandeos cromosómicos en las diferentes técnicas de tinción. Se tomó muestra de sangre venosa periférica de 8 Caballos Miniatura (4 hembras y 4 machos) y 2 Caballos Cuarto de milla, se realizó una valoración cromosómica mediante diferentes técnicas de bandedo, como Bandas G, C y NOR's, tanto en Caballos miniatura y Caballos Cuartos de milla, para realizar la diferenciación. Se encontró que para todas las muestras analizadas el número cromosómico es  $2n=64$ , sin alteraciones cromosómicas, hallando similitud en las Bandas C de algunos estudios reportados, lo que permite sugerir un modelo cariológico para el Caballo miniatura. Tomando en cuenta que para el Caballo Miniatura aún no se ha estudiado profundamente su cariotipo, se aporta una caracterización citogenética completa para la especie siendo éste el primero para la literatura.

La medición de los cromosomas concede demostrar que las regiones NOR para el Caballo miniatura se encuentran presentes en los cromosomas 1, 16, 25 y 31.

## INTRODUCCIÓN

Los cromosomas son fundamentales en la existencia de cada especie, ya que son los portadores del Ácido Desoxirribonucleico (ADN), el cual transmite la herencia de padres a hijos. En realidad no tiene mucho desde que se comenzó con el estudio de los genes, hace aproximadamente 140 años (Vera, 2003).

El género *Equus* está compuesto por diferentes especies, que entre ellas comparten un número similar que va desde  $2n=32$  a  $2n=66$  y depende mucho de la información que contengan los genes en sus cromosomas para diferenciar el tamaño, sexo, color de piel y pelaje en cada uno de ellos. Tomando en cuenta los avances en citogenética, la diferenciación cromosómica ha sido de gran ayuda para determinar el cariotipo de cada especie, así como anomalías que cada uno de los individuos presente.

Henao (2002) y Moncaleno (2007) entre otros, han demostrado que hay anomalías en los cromosomas de los caballos, por ejemplo, ausencias, trisomías, deleciones o translocaciones de cromosoma en algún cariotipo de caballos que afectan su fenotipo, movilidad y reproducción.

La importancia del presente estudio empieza por el fenotipo del Caballo miniatura, relacionando alguna anomalía en su cariotipo en relación con el del Caballo doméstico.



## **OBJETIVOS GENERAL**

Determinar si existe diferencia cromosómica entre un caballo miniatura y un caballo cuarto de milla mediante el análisis de los cariotipos.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- 1.- Realizar el cultivo de sangre periférica del Caballo miniatura y el Cuarto de milla.
- 2.- Comparar mediante las técnicas de GTG, CBG y NOR's los cariotipos del Caballo miniatura y Caballo Cuarto de milla.

## **HIPÓTESIS**

El número cromosómico del caballo miniatura es similar al caballo cuarto de milla ( $2n=64$ ), pero debe haber diferencia en el patrón de Bandas G, Bandas C o Región Organizadora del Nucléolo que explique la diferencia de tamaños.

## **JUSTIFICACIÓN**

Debido a que existe poca información del cariotipo del *E. caballus* miniatura, este estudio aportará conocimiento sobre la citogenética de esta raza.

## LITERATURA REVISADA

### 2.1 Generalidades

El orden Perissodactyla, del griego perissós (impar) y dáktylos (dedo), agrupa a aquellos mamíferos con un número impar de dedos y un mayor desarrollo de aquel situado en posición central (Garrido, 2008). Dentro de los perisodáctilos existen tres familias: los tapíridos, rinoceróntidos y los équidos; estos últimos a su vez se dividen en subórdenes, donde los caballos quedan dentro de los hipomorfos, (Wood,1937).

Los caballos han avanzado en su desarrollo durante los últimos millones de años, y durante ese tiempo han llegado a ser un acompañante y amigo del género humano.

La familia Equus se forma por las siguientes especies: *E. Caballus* (caballo doméstico); *E. przewalskii*(caballo salvaje); *E. hemionusonager*(onager); *E.hemionuskulan* (kulan,); *E. africanussomaliensis*(somali salvaje,); *E. Asinus*(burro domestico); *E. zebrahartmannae*(zebra de montaña); *E. Burchelli*(zebraburchelli,), y *E. Grevyi*(zebragrevy). (Trifonov V. A., 2007).

### 2.2 *Equus caballus*

El proceso evolutivo permitió dar lugar al animal que ahora conocemos como *Equus caballus*, que es diferente en muy poco del *Equus* de hace un millón de años. De acuerdo a su constitución y uso, en general los caballos se pueden clasificar en caballos livianos, pesados y ponies (Puentes, 2000). Además podemos encontrar un tipo de caballo llamado

“Caballo miniatura” los cuales son considerados muy escasos hasta la actualidad. Presentan una alzada entre 0.80 a 0.90 metros. Son utilizados principalmente como animales de compañía y en circos (Evans *et. al.*, 1979); debido a la escasa información sobre la especie.

### **2.3 Citogenética**

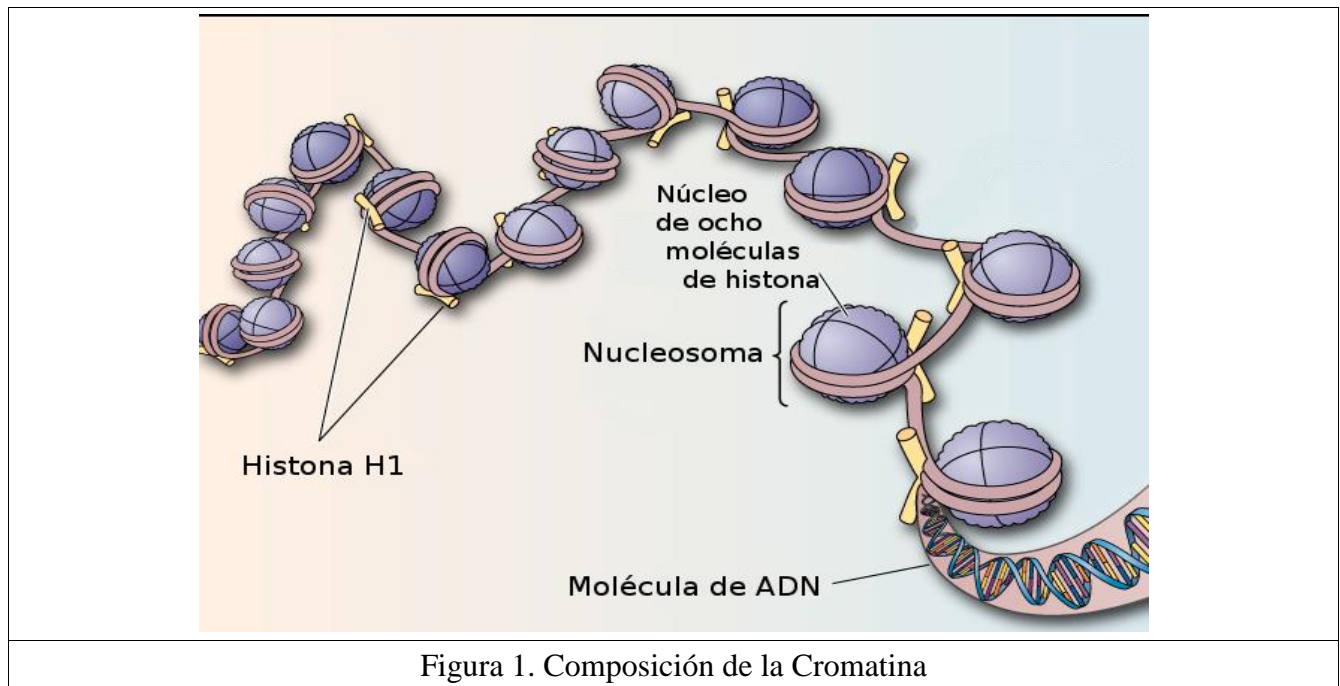
En los últimos años se han utilizado diferentes técnicas diagnósticas para problemas patológicos. Debido al avance de la biología, la genética y de la citología, se crea una nueva ciencia, llamada citogenética. La cual tiene como objetivo el estudio de los cromosomas y sus modificaciones, así como también el análisis de la relación de estas alteraciones y la signología que muestran. Los estudios citogenéticos realizados en caballos han sido de beneficio ya que pueden identificar aberraciones cromosómicas las cuales pueden causar anormalidades congénitas, pérdida embrionaria e infertilidad, (T.L. Lear, 2008).

El conocimiento que se tiene de citogenética en caballos continúa en estudio. Algunos de los tipos de anormalidades que se han observado en caballos se relacionan con el fenotipo (Halnan, 2006). Lo que se ha descrito, igual que en el humano, son trisomías de los cromosomas pequeños, mosaicismos, deleciones y translocaciones. La visualización de los cromosomas, el poder realizar el bandedo en cada uno de los mismos y adaptar el ideograma para la identificación de cada especie hace que la citogenética ayude a ampliar los aspectos en la medicina veterinaria, (T.L. Lear 2008).

## 2.4 ADN y proteínas

Los genes son las unidades orgánicas que controlan la herencia y se encuentran arreglados linealmente en los cromosomas, ocupando cada gen un sitio o locus específico

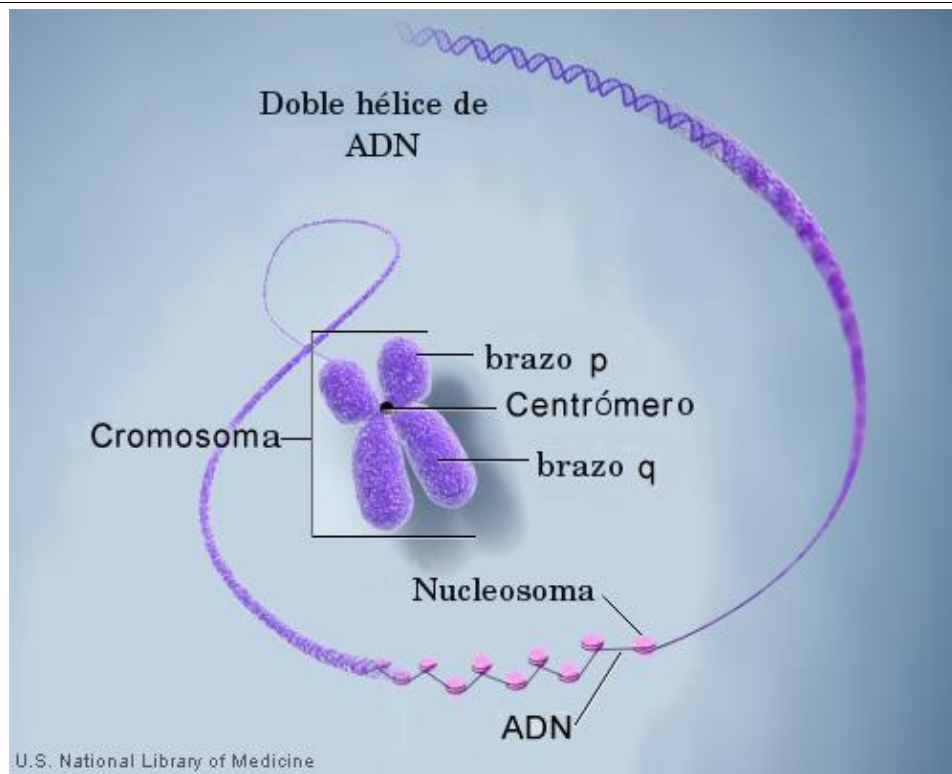
La estructura del ADN se ha estudiado por científicos como Mendel, Lehninger, Avery, Crick y muchos más, aportando cada uno de ellos nueva información, refutando o confirmando estudios anteriores; pero queda claro que el ADN se asocia con proteínas histónicas que constituyen la cromatina (Figura1). Los ácidos nucleicos son polímeros formados por nucleótidos, que, a su vez están constituidos por una pentosa-desoxirribosa, una base nitrogenada y un fosfato. (Franco Vera, 2003).



Los principales componentes que se tienen cuando se aísla la cromatina son el ADN, las histonas, las proteínas no histónicas y el Ácido Ribonucleico (ARN). Las histonas

son proteínas básicas ricas en residuos de lisina y arginina, que interaccionan con el ADN formando una subunidad que se repite a lo largo de la cromatina denominada nucleosoma. En todos los eucariontes sólo existen cinco clases de histonas denominadas H1, H2A, H2B, H3 y H4 (Franco Vera, 2003).

Alrededor de la médula se enrolla el ADN, dando una vuelta y tres cuartos, el resto de ADN (60 pb) forma parte del ligador (linker) y tiene interacción con la H1. La cantidad de ADN asociado con un nucleosoma varía según la especie, de 154 pares de bases (pb) a 241 pb, esta variación se debe a la cantidad de ADN asociada al ligador. Los nucleosomas se enrollan helicoidalmente para formar un solenoide, una especie de muelle, que constituye las fibras de cromatina de los núcleos interfásicos. Los solenoides pueden volverse a enrollar para dar lugar a un supersolenoide con que constituirán las fibras de los cromosomas metafásicos (Figura 2).

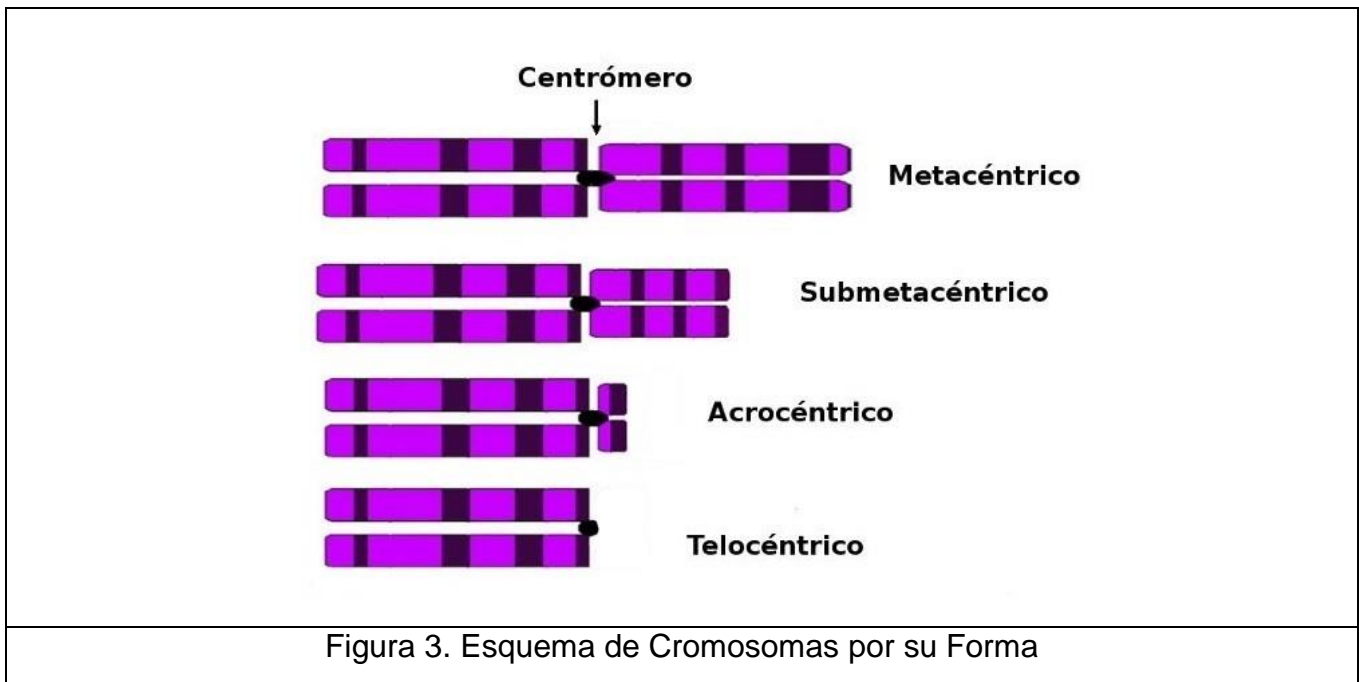


U.S. National Library of Medicine

Figura 2. Composición de cromosoma con sus compuestos.

## 2.5 Cromosomas

Los cromosomas se hallan en el núcleo de la célula y pueden observarse como estructuras intensamente teñidas en forma de bastón o de J durante la división celular. Cuando el cromosoma está en metafase se puede distinguir la forma que se conoce como el brazo corto p y el brazo largo q, separados por el centrómero (Figura 2), por lo que se clasifican como cromosomas metacéntricos, submetacéntricos, subtelocéntricos o acrocéntricos y telocéntricos (Figura 3).



Dentro de los cariotipos de las especies equinas se encuentra una diferencia considerada en los pares de cromosomas que va desde los 32 hasta los 66, en el *Equus caballus* (*E. Caballus*)  $2n = 64$  (Bowling, 1996), donde se encuentran 31 pares de autosomas, de los cuales 13 pares son metacéntricos/ submetacéntricos y 18 pares de acrocéntricos, el último par es complementado por los cromosomas sexuales X y Y (Bowling, 1997).

En todas las especies, tanto en hembras como en machos existen diferencias en cariotipo. Cada especie tiene su propio cariotipo característico. Las diferencias numéricas y morfológicas entre los cariotipos de las especies dentro de los équidos son amplias, que van desde  $2n=32$  de cebra a  $2n=66$  en el caballo de Przewalski (Bowling, 1996). A pesar de las diferencias, todos los équidos pueden cruzarse libremente y tener crías, aunque por lo general la descendencia es estéril (Allen, 1997).

Los cromosomas de los équidos han evolucionado rápidamente y tienen una notable diversificación como variación en números diploides (Yang, F., 2003), sin embargo, a causa de las diferentes anomalías debe de seguirse estudiando.

## **2.6 BANDAS CROMOSOMICAS**

En Citogenética se utilizan diferentes métodos de tinción para observar bandas como el Bando G, Bando C y NOR'S.

La mayoría de los métodos de bandedo cromosómico se basan en la cosecha de cromosomas de sangre periférica, donde se permite que lleguen hasta la mitosis. Esto se consigue por medio de procesos que inhiben a la tubulina, que es la subunidad proteica de los microtúbulos (Salamanca, 2001), tales como colchicina o demecolcina (colcemid), que despolimerizan el huso mitótico (Bickmore, WA, 2001), logrando así que las células continúen en la misma etapa sin seguir con su ciclo celular. Las bandas son secuencias de porciones claras y oscuras, o fluorescentes y no fluorescentes, que se observan a lo largo de los cromosomas con los distintos métodos de tinción que son utilizados.

Las bandas oscuras se conocen como positivas y las bandas claras como negativas ya que tiñen una baja tinción. Sin embargo, el patrón de coloración no son blanco y negro,



sino, diferentes bandas teñidas a diferentes intensidades. Los métodos más comunes de tinte del cromosoma basado en bandas son G (Giemsa), R(revés), C(centrómero) y Q (quinacrina) (Bickmore, 2001).

La historia comienza en 1912 cuando se estudió por primera vez a los equinos desde el punto de vista citogenético por Kirillov (Bowling, 1996), después se determinó el cariotipo del caballo doméstico  $2n = 64$ , de los cuales 13 pares de autosomas son metacéntricos o submetacéntricos y los 18 pares restantes son acrocéntricos (Richeret *al*, 1990). El cromosoma sexual X es el segundo submetacéntrico más grande y el cromosoma sexual Y es muy parecido en tamaño al acrocéntrico más pequeño (Bowling, 1996).

Entre los años 70's y los 80's se hicieron numerosos estudios sobre el cariotipo de los caballos, Bowling comenta que los análisis basados en estudios de bandeo Q, G, C, R y NOR de los equinos demostraron diversos arreglos. Diferentes publicaciones, han reportado algunas anormalidades en autosomas equinos, como trisomías en los cromosomas 23, 26, 28, 30 y 31 (Lear, 2009); no obstante más del 90% de las anormalidades cromosómicas reportadas en caballo doméstico involucran los cromosomas sexuales, dentro de estos se presenta con mayor frecuencia el síndrome del X0 (Henaó F, 2002); las yeguas portadoras de esta anomalía son normalmente pequeñas e infértiles, sus extremidades traseras son muy anguladas y presentan hipoplasia ovárica combinada con hiperplasia del clítoris (Breen, 1997). Así mismo se han reportado yeguas con mosaicismo en el complemento cromosómico 63, X / 64, XX (Moncaleano, 2007) el cual afecta el desarrollo del aparato reproductivo, observándose ovarios muy pequeños y/o quísticos, cuerpos lúteos persistentes, atrofia

endometrial y/o flacidez cervical; la aberración más importante en el equino es la monosomía del cromosoma X, por los efectos que causa en el fenotipo de la especie y en su reproducción (Henaó F., 2002).

También se han reportado cariotipos 65, XXX (Bowling et al, 1989) y 65, XXY; este último asociado a hipoplasia testicular y criptorquidia. Recientemente se encontró en un primer estudio, que una pequeña deleción en el brazo corto del cromosoma 1, podría ser la causante de una malformación conocida como hipospadias en equinos (De Lorenzi et al, 2010). Estas anomalías cromosómicas al parecer son más frecuentes en algunas razas de caballos, (Brito, 2008).

En una yegua mestiza estéril se reportó mosaicismo en el complemento cromosómico 63, X /64, XX con 46% de células anormales y 54% de células 64, XX. Este ejemplar tenía fenotipo y genitales externos normales, pero el análisis ecográfico mostró útero y ovarios pequeños y funcionales (Henaó, 2002).

Los reportes anteriores muestran que la citogenética ha sido útil en diagnósticos en reproducción animal y en la comprensión de algunos tipos de infertilidad, muertes embrionarias y fetales, desarrollos somáticos o sexuales anormales y determinación prenatal del sexo (Brito, 2008), no obstante, la técnica no ha sido muy empleada en la caracterización de razas equinas.

La elaboración de cariotipos mediante diferentes técnicas de bandeo y su respectivo análisis permite descartar como reproductores a aquellos individuos portadores de anomalías cromosómicas que puedan presentar problemas de fertilidad o desempeño favoreciendo al establecimiento de un plan de conservación y mejoramiento genético de este grupo poblacional. De igual manera la citogenética actual está encaminada a determinar la pureza de la raza mediante la detección y reconocimiento de polimorfismos específicos de la población que acompañada de la evaluación del patrón de duplicación del genoma permite la caracterización de la raza como tal (López et al, 2002).

Análisis de metafases teñidas por bandas NOR muestran que el tamaño de las bandas NOR es muy variable, siendo casi siempre imperceptible en algunos casos y largas en otros, con la banda proyectándose fuera de la cromátide. Siendo los más comunes el 1, 25 y 31. ( Loginova, *et al*, 1996), (Lui *et al*, 1990).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Muestras de población

Se incluyeron individuos designados como Caballos miniatura, de acuerdo a los registros de la Asociación Americana de Caballos miniatura (AMHA) y Caballos cuarto de milla según las especificaciones de la raza para realizar la comparación (Tabla 1).

Individuo	Sexo	Raza
I	Hembra	Miniatura
II	Hembra	Miniatura
III	Hembra	Miniatura
IV	Hembra	Miniatura
V	Macho	Miniatura
VI	Macho	Miniatura
VII	Macho	Miniatura
VIII	Macho	Miniatura
IX	Macho	Cuarto de milla
X	Macho	Cuarto de milla

### 3.2 Cultivo

Se obtuvieron de manera aséptica 5ml. de sangre venosa periférica con jeringa plástica heparinizada de cada uno de los caballos. Se le agregó 0.5 ml. de sangre completa a

un tubo cónico estéril que contenía: 5 ml. de medio de cultivo RPMI 1640, 0.5 ml de suero fetal bovino, 200 µl de PHA y 100µl de antibiótico. Los cultivos se incubaron a 37°C por 72 hr. Los tubos se colocaron en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5%, ligeramente desenroscados y en posición inclinada.

### **3.3 Cosecha**

Se detuvo la división celular agregando 300 µl de colcemid a las 72 horas, se mezcló por inversión y se incubaron por 2hr más a 37°C. Se centrifugó a 1200 rpm por 10 min, y se extrajo el sobrenadante. Se agregaron 6 ml de KCl a los tubos, se resuspendió el botón celular utilizando un agitador mecánico, posteriormente se incubaron a 37°C por 30min.

### **3.4 Fijación**

A los tubos se les añadió 500 µl de Solución Carnoy, resuspendiendo con un agitador mecánico, se centrifugaron por 10 min y se decantó el sobrenadante. Se repitió el lavado con la Solución Carnoy hasta obtener el botón celular de color blanco.

### **3.5 Preparación de Laminillas**

El botón celular se resuspendió en 0.5 ml de Solución de Carnoy y se goteó sobre las laminillas previamente sumergidas en alcohol etílico. Las preparaciones se mantuvieron por 3 días (envejecer) para luego realizar el bandeo.

### **3.6 Técnica de Bando G**

Las laminillas se colocaron en una jarra de Coplin que contenía 2 x SSC (5 ml de 20 x SSC y 45 ml de aguadestilada) por 60 min a 60°C.

Se enjuagaron en agua desionizada. Se colocaron en una solución de tripsina al 1% en agua desionizada a temperatura ambiente, de 20 a 30 seg, se realizó la tinción con Giemsa al 5% en buffer pH 6.8 durante 7min. Se enjuagaron en agua desionizada y posterior al secado, se montaron con resina para finalmente observar al microscopio óptico.

### **3.7 Técnica de Bando C**

Las laminillas se colocaron en una solución de HCl a temperatura ambiente por 30 min. Se colocaron en una solución de  $Ba(OH)_2$  al 5% por 30 min a 40 °C después se colocaron en una solución 2xSSC 2 horas a 60°C y finalmente se realizó la tinción con Giemsa al 2% por 15 min. Con esta técnica se observan los centrómeros de los cromosomas, la región distal del brazo largo del cromosoma Y y además una banda localizada en los brazos largos del cromosoma X (Figura 4).

### **3.8 Técnica de Bando NOR's**

Laminilla preparada 24 horas antes, se le agrega  $AgNO_3$  al 50% (preparada con agua desionizada), se le pone un cubreobjetos y se lleva a la incubadora a 37°C, en cámara húmeda y protegida de la luz, por 72 horas. Sacar de la incubadora, quitar el cubreobjetos,

enjuagar con agua de la llave, dejar secar y montar con entellan.

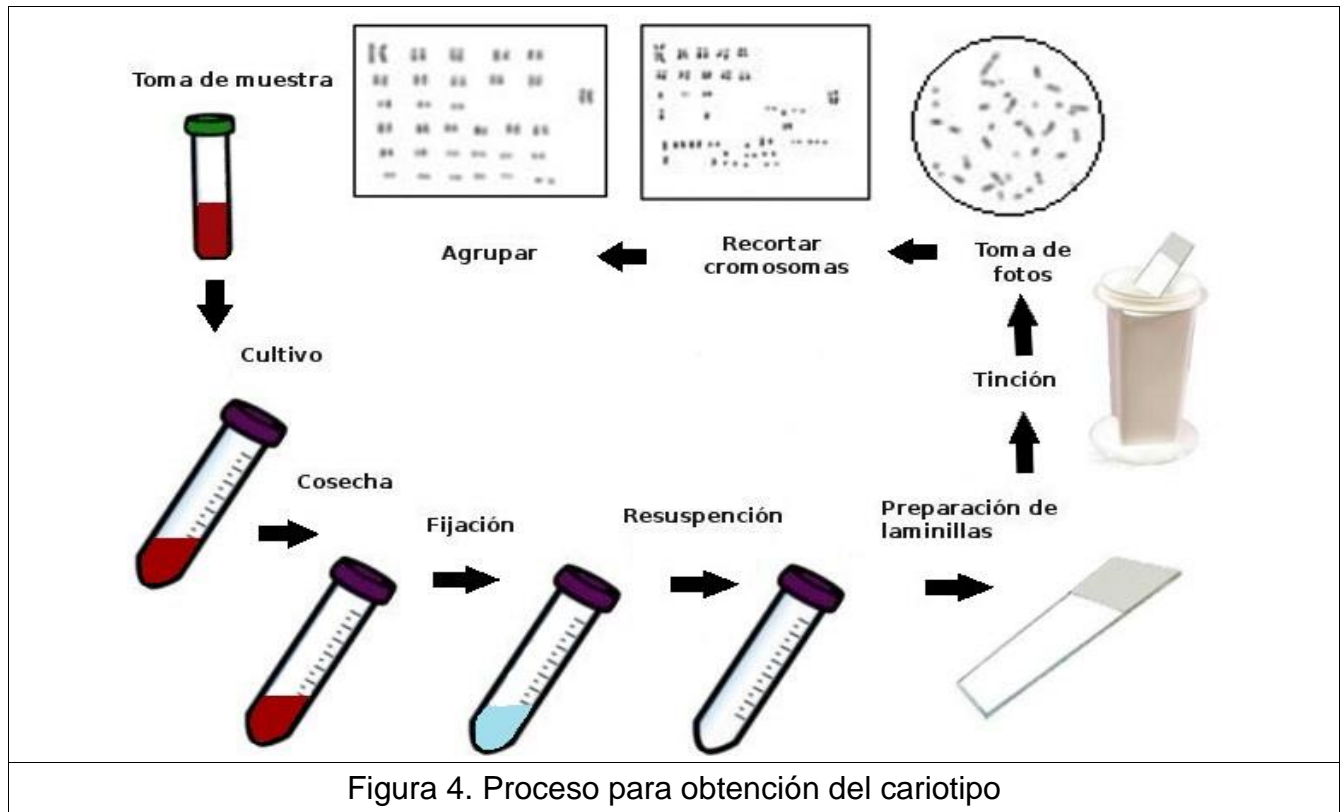


Figura 4. Proceso para obtención del cariotipo

## RESULTADOS

### 4.1 Bandas G

Se utilizó un cariotograma de caballo estándar con 13 pares submetacéntricos y metacéntricos y 18 pares acrocéntricos, (Figura 5).

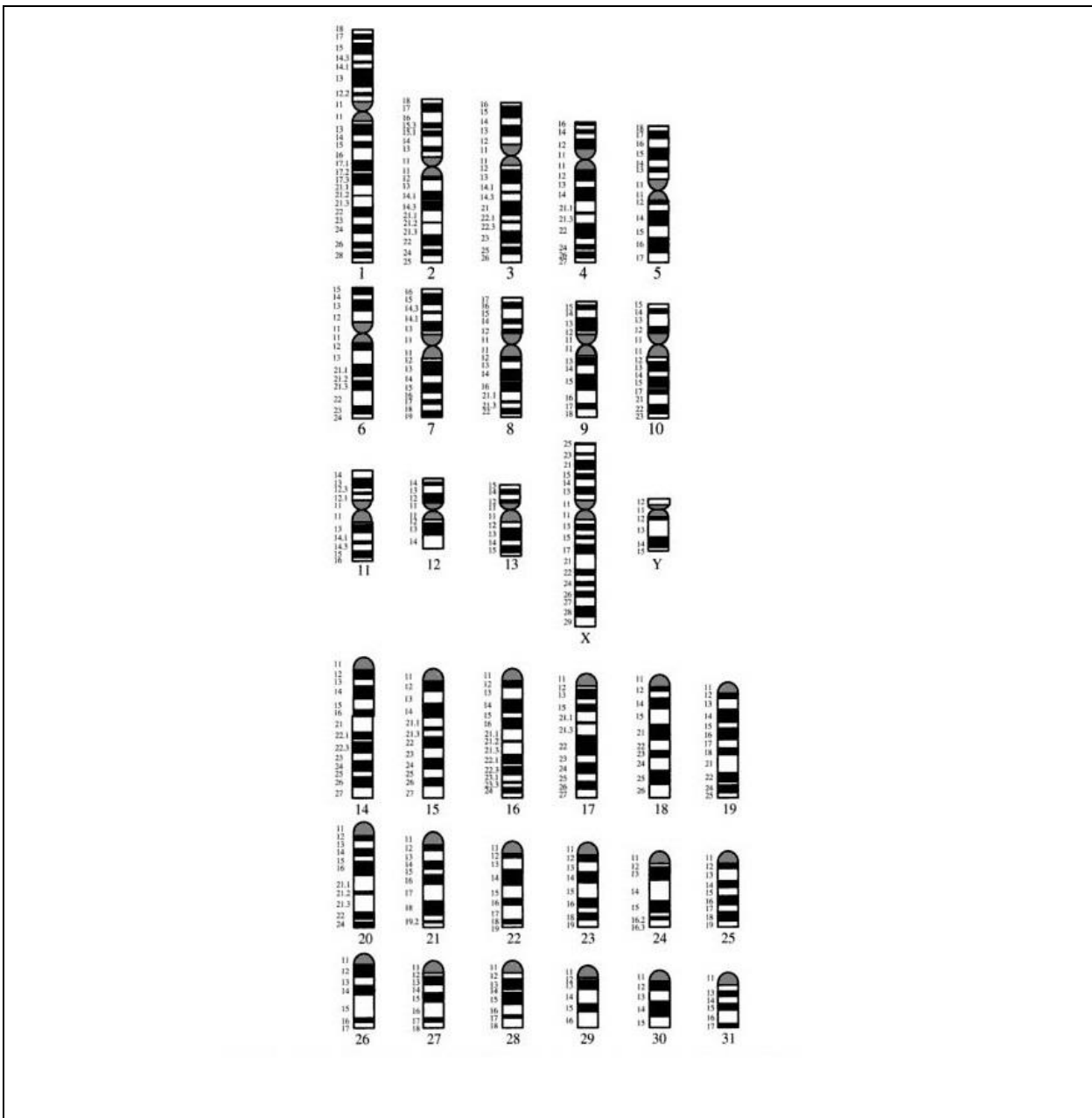


Figura 5. Cariograma mostrando bandas G en cromosomas equino tal como se describe en el último cariotipo del caballo estándar (ISCN, 1997).



Se obtuvieron las metafases deseadas y después se realizaron los ideogramas de los Caballos Miniatura al igual que el Caballo Cuarto de milla obteniendo  $2n = 64$  (Figuras de la 6 a la 15). Lado A) la metafase seleccionada de cada uno de los individuos y en el lado B) el cariotograma ya elaborado.

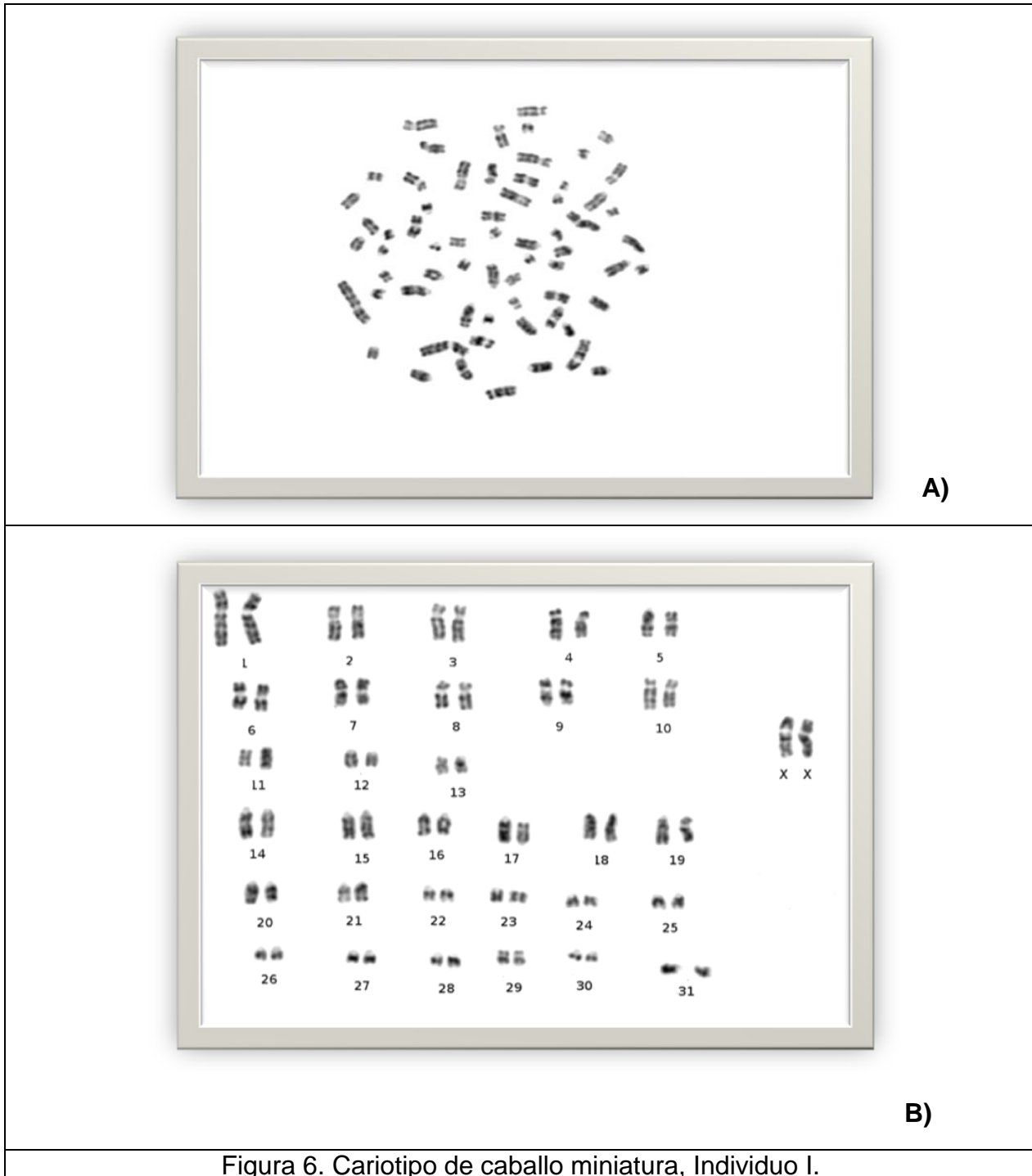
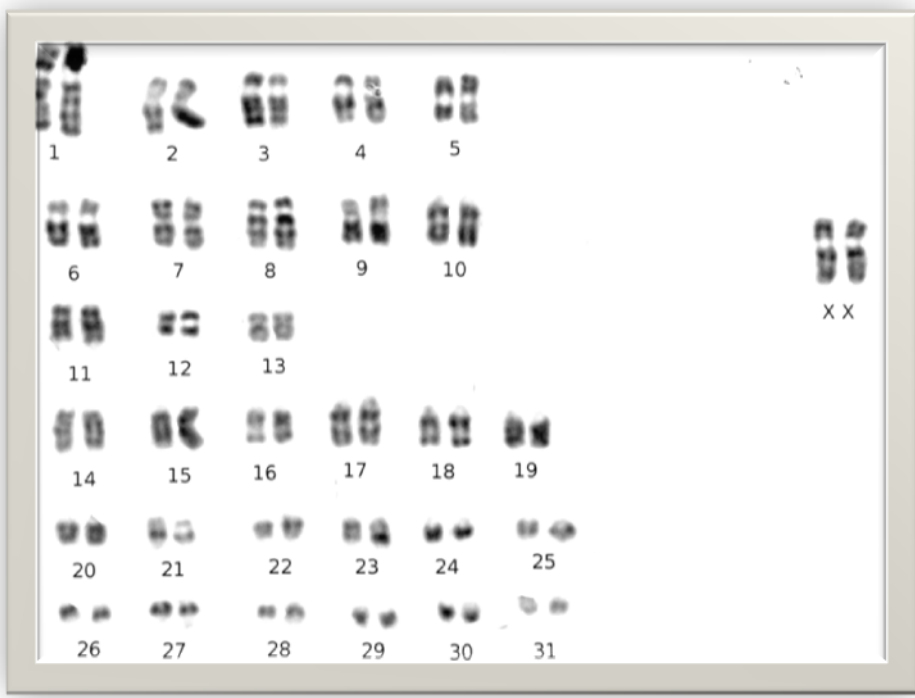


Figura 6. Cariotipo de caballo miniatura, Individuo I.

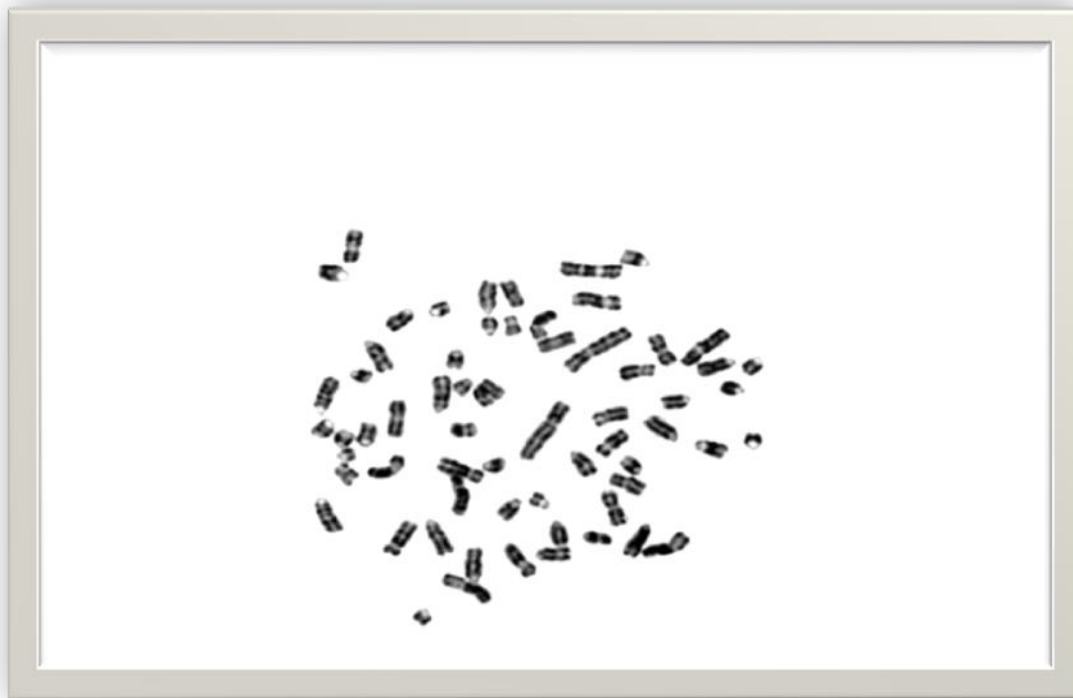


A)

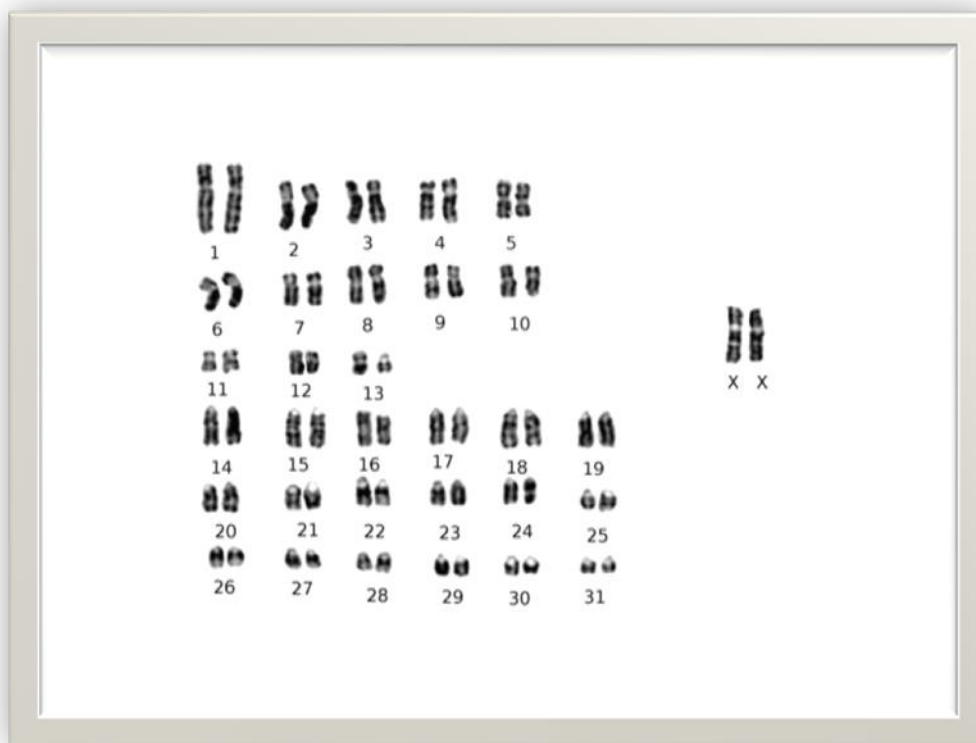


B)

Figura 7. Cariotipo de caballo miniatura, Individuo II.



A)

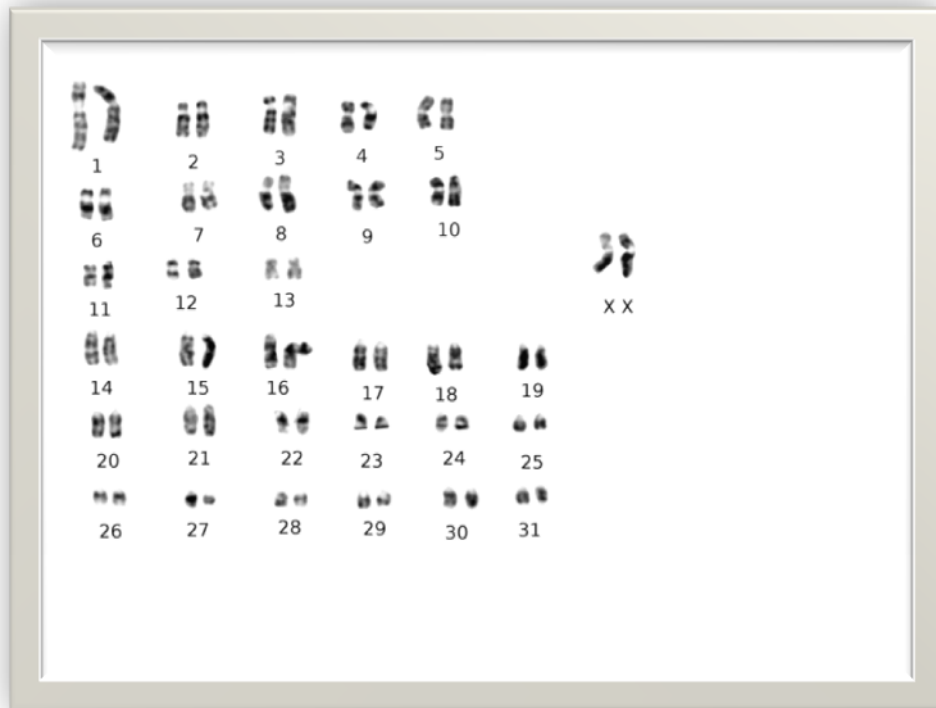


B)

Figura 8. Cariotipo de caballo miniatura, Individuo III.



A)

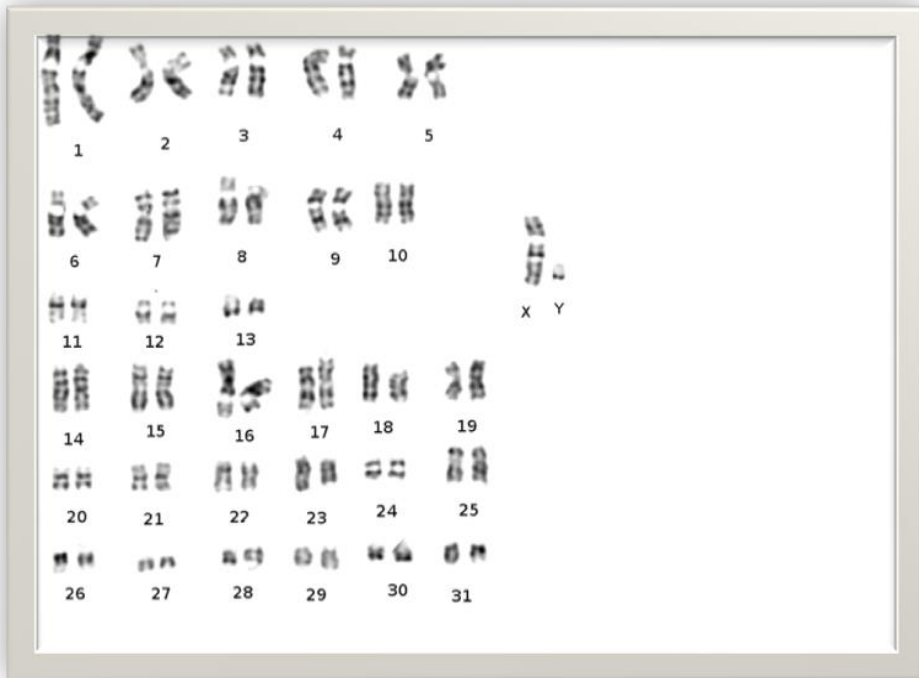


B)

Figura 9. Cariotipo de caballo miniatura, Individuo IV.



A)

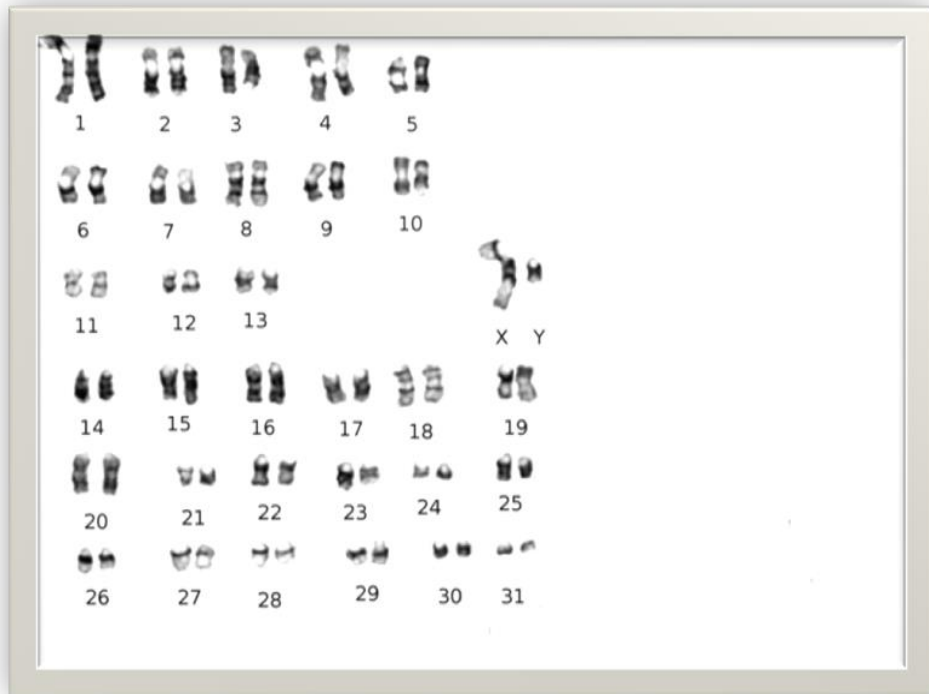


B)

Figura 10. Cariotipo de caballo miniatura, Individuo V.



A)

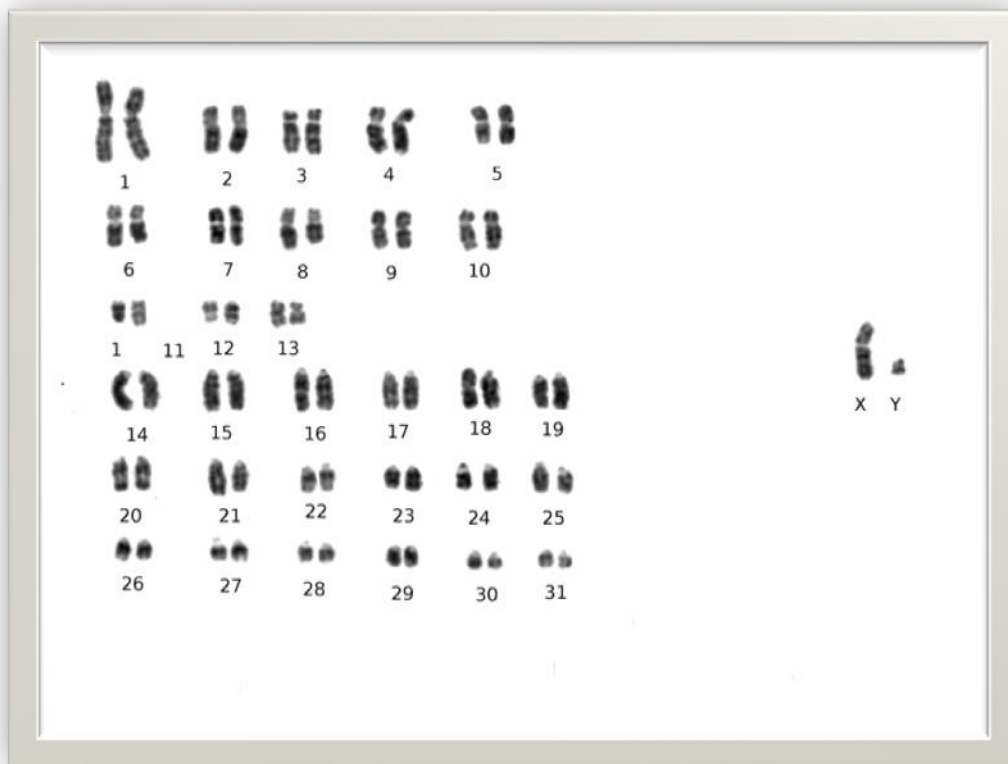


B)

Figura 11. Cariotipo de caballo miniatura, Individuo VI.

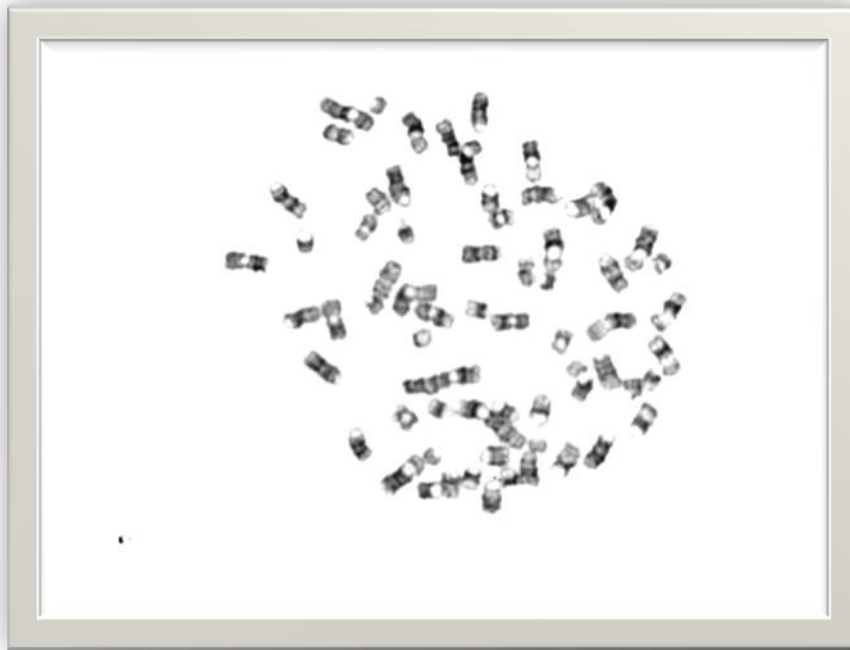


A)

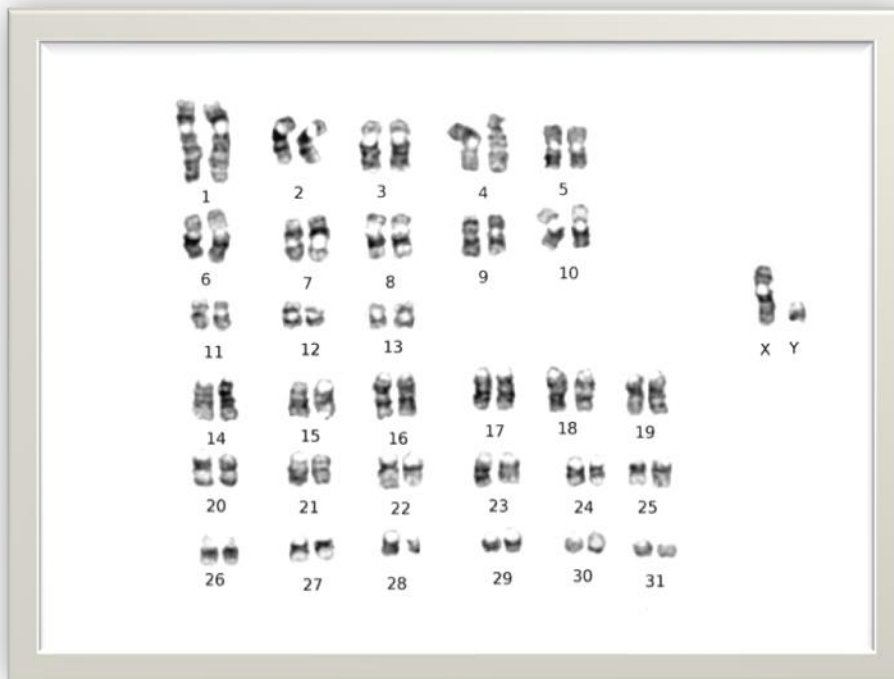


B)

Figura 12. Cariotipo de caballo miniatura, Individuo VII.



A)



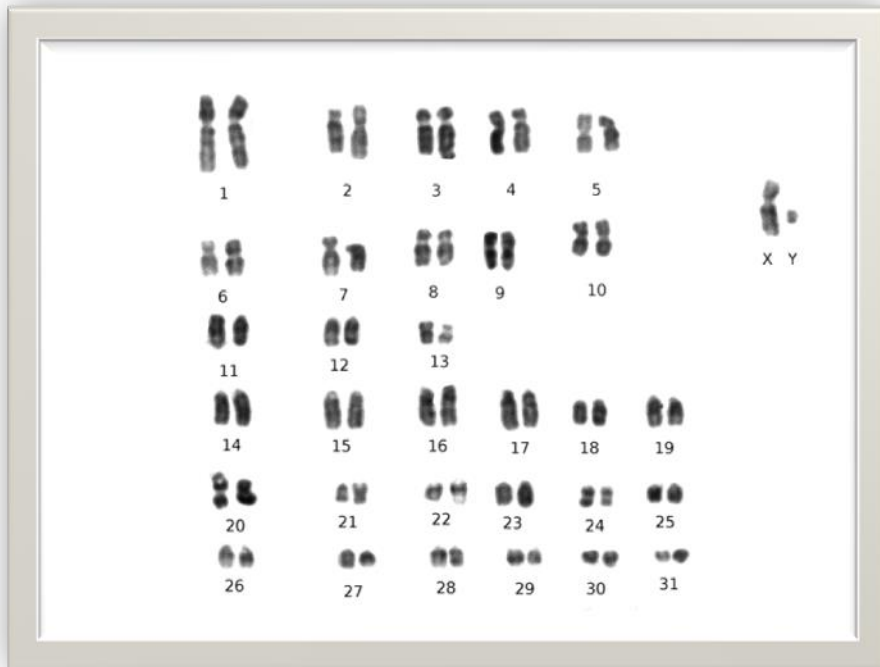
B)

Figura 13. Cariotipo de caballo miniatura, Individuo VII.



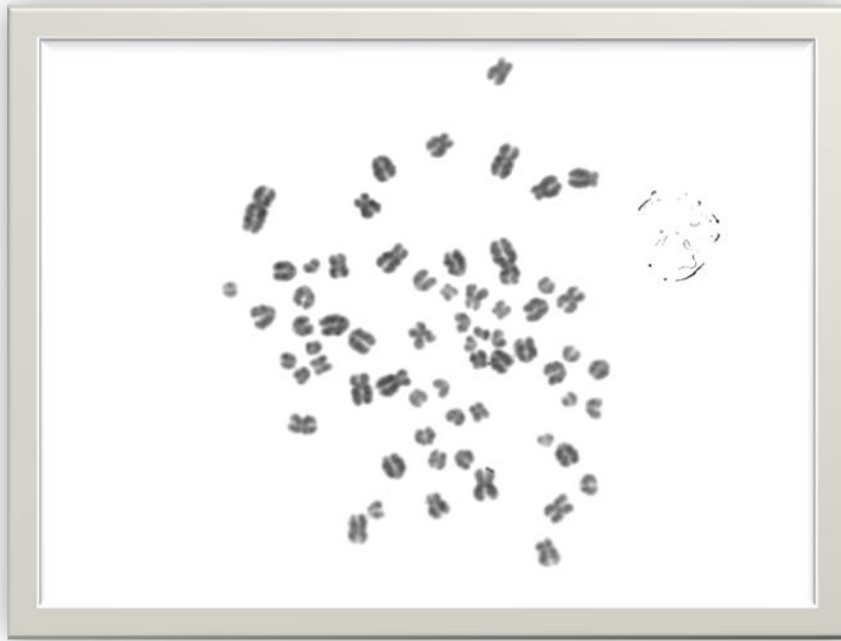


A)

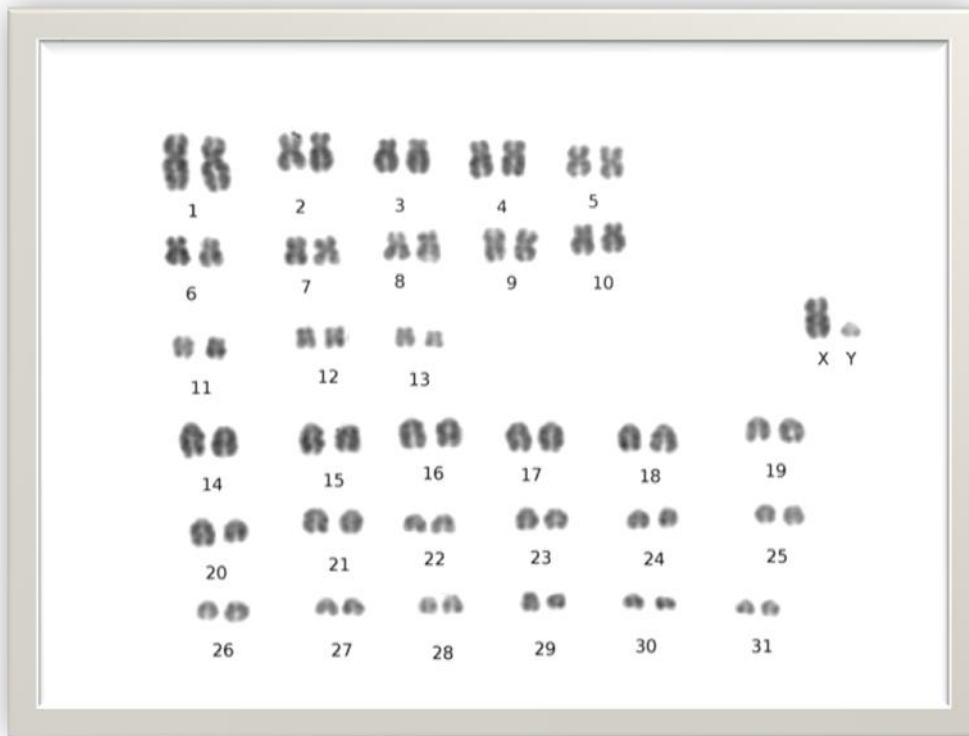


B)

Figura 14. Cariotipo de caballo miniatura, Individuo IX.



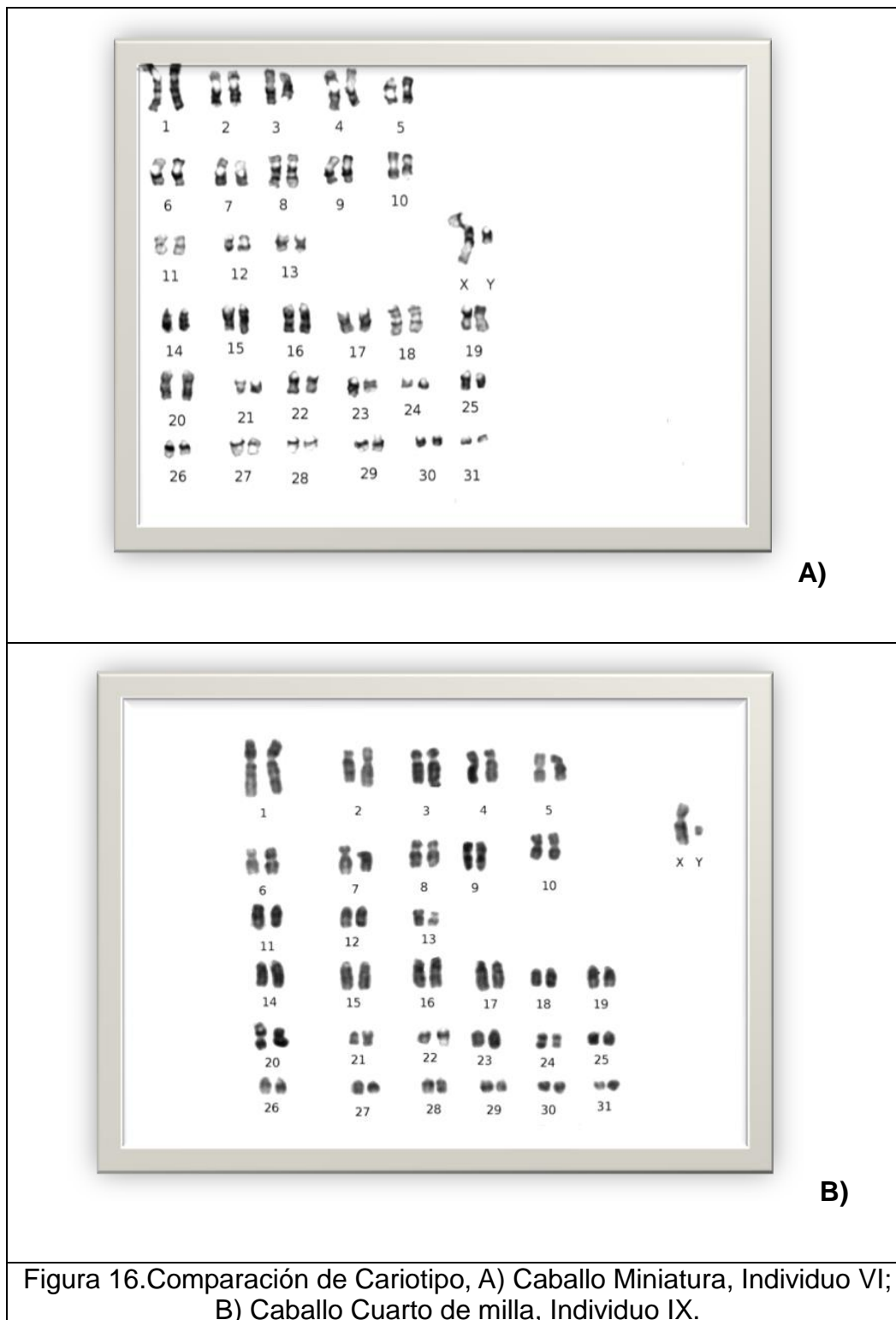
A)



B)

Figura 15. Cariotipo de caballo miniatura, Individuo X.

Obteniendo las bandas G de todos los individuos se pudo hacer una comparación que confirma el mismo número de pares 13 submetacéntricos y metacéntricos y 18 pares acrocéntricos en ambas especies. (Figura 16)



## 4.2 Bandas C

Las bandas C de los individuos analizados muestran bandas en la parte centromérica y se puede localizar una banda negra por debajo del metacentro de los cromosomas X, observadas en la Figura 17.

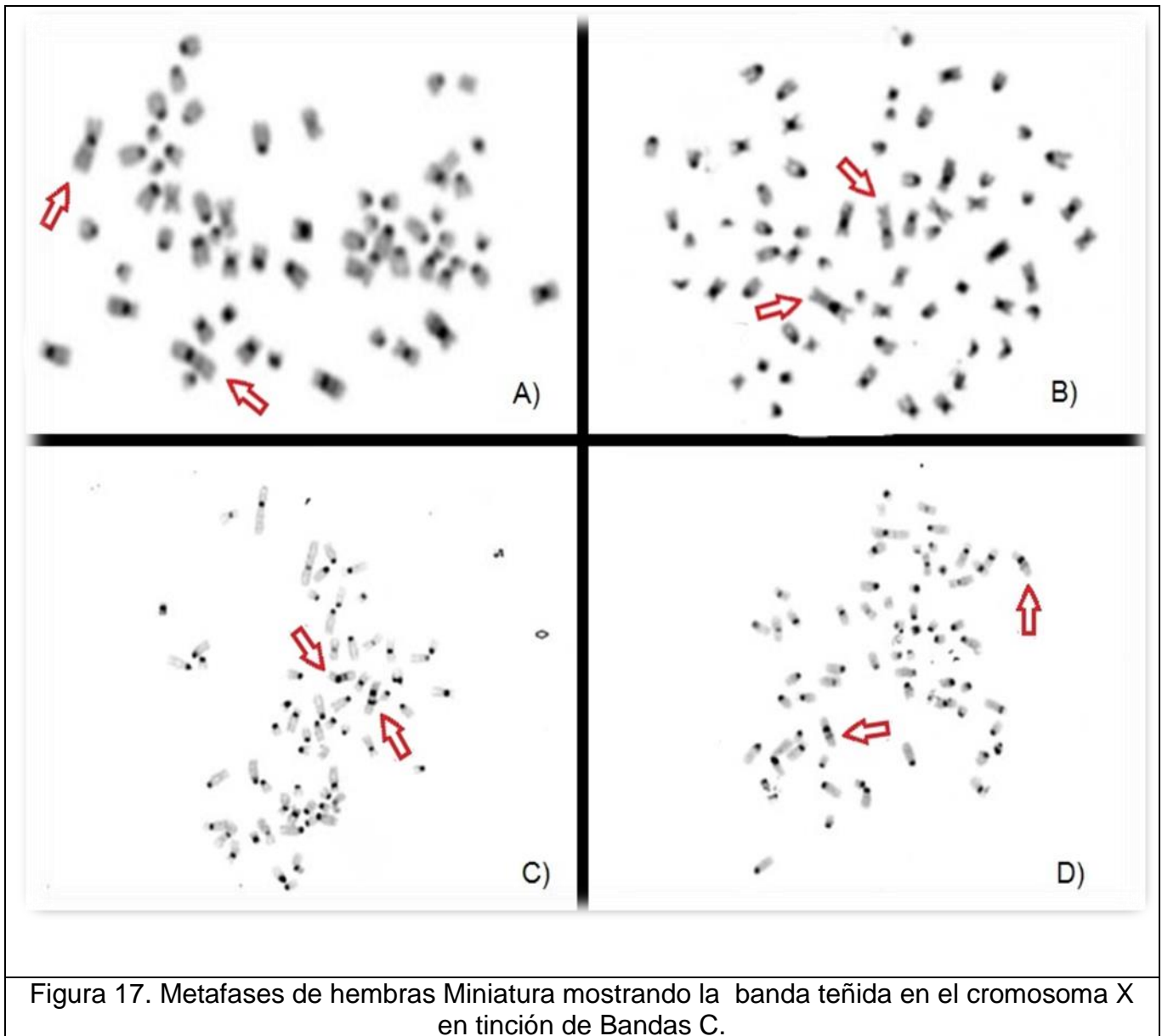


Figura 17. Metafasas de hembras Miniatura mostrando la banda teñida en el cromosoma X en tinción de Bandas C.

### 4.3 BANDAS NOR

Las bandas NOR se presentan solamente algunos de los cromosomas donde se encuentra la Región Organizadora del Nucléolo, en el caballo miniatura se encontraron en cromosoma 1, 16, 25 y 31. (Figura 18).

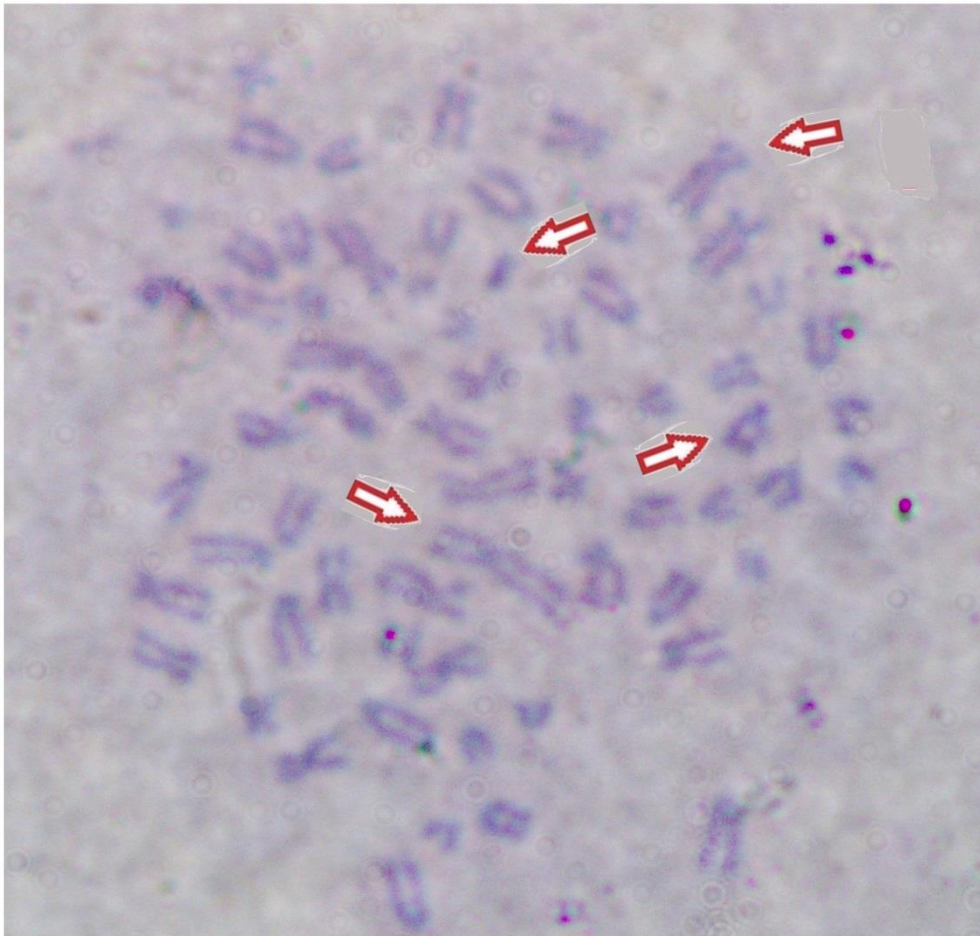


Figura 18. Bandas NOR's son marcadas con una flecha en el Caballo miniatura en los cromosomas 1, 16, 25 y 31.

Los Resultados en las bandas G y C no muestran diferencias en el patrón de Bandas entre el Caballo miniatura y el Cuarto de milla; a diferencia con las NOR's, que se también presenta en el caballo miniatura en el cromosoma 16.

## DISCUSIÓN

Estudios anteriores en el caballo doméstico (Bowling *et al*, 1996; Yang L. *et al*, 2003, Richer, *et al*, 1990), presentan un cariotipo de  $2n=64$ , distribuidos en 13 pares metacéntricos o submetacéntricos, siendo el cromosoma X el segundo más grande y 18 cromosomas acrocéntricos. Los cariotipos son suplementados con cariogramas de referencia y números de bandas en los cromosomas dependiendo del estudio que se desea realizar como Raudsepp, *et al*, 1999; Bowling, *et al*, 1996. De acuerdo con los antecedentes, el cariotipo del caballo sólo se categorizaba en dos grupos: los metacéntricos y submetacéntricos, siendo Richer *et al*, 1990 quien sugirió la nueva estandarización del cariotipo para caballos.

En nuestro caso, basándonos en la estandarización efectuada por Richer. *et al*. 1990, no obtuvimos diferencia a la  $2n=64$  descrita por Bowling (1997) en los cariotipos analizados de los caballos miniatura, ni diferencia alguna en tamaño y forma.

Las bandas G mostraron que la heterocromatina constitutiva se localiza en los centrómeros de los cromosomas y en la región terminal del brazo corto de los cromosomas. Además de observar que el cromosoma X submetacéntrico presenta dos bandas positivas, una indicada en la región del centrómero, para lo que es utilizada esta técnica y otra en su brazo q, pudiendo observar que nuestros resultados coinciden con los observados por

Bucklan (1976).

Nuestros resultados difieren de los publicado por Henao (2002) ya que su estudio se basó en un ejemplar hembra que presentaba problemas reproductivos y ciclos estrales irregulares, encontrando mosaismo parcial del cromosoma sexual X, en nuestro caso todos los ejemplares utilizados (4 hembras miniatura, cuatro machos miniatura, así como dos machos Cuarto de Milla), presentaban una conducta sexual normal, así como sus características fenotípicas, presentando cariotipos normales, similares a los descritos por Bucklan (1976) y Yang, F., (2003).

Los resultados adquiridos hasta el momento no proporcionan diferencias entre los cariotipos de los diferentes individuos miniatura y el caballo cuarto de milla. Esto podría de alguna forma animarnos a seguir investigando para determinar específicamente en los genes que se expresan diferentemente en cada uno de los individuos. Para esto se necesita utilizar técnicas moleculares precisas, con el fin de diferenciar con otras poblaciones.

La medición de los cromosomas concede demostrar que las regiones NOR para el Caballo miniatura se encuentran presentes en los cromosomas 1, 16, 25 y 31, mientras que Loginova *et al*, 1996 los ubica en el cromosoma 1, 25 y 31 al igual que Lui *et al*, 1990.

En estos momentos es poca la frecuencia con la que escuchamos hablar del caballo miniatura, sin embargo cada vez va creciendo más, y esperamos que este trabajo pueda ser de utilidad para estudios posteriores y se siga abriendo el camino para nuevos hallazgos.



## CONCLUSIONES

En este trabajo se presenta por primera vez los cariotipos utilizando bandeos G, C y NORs para el Caballo miniatura; empleando cultivo RPMI 1640 logrando un número satisfactorio de metafases y morfología en los Caballos miniatura, sin embargo, en el Caballo cuarto de milla no se logró una estimulación celular conveniente. Por lo que se añadió heparina al 1% al cultivo, lo que disminuyó la aglutinación y permitió una mejor estimulación.

Se presenta por primera vez el cariotipo junto con el ideograma utilizando el Bando G y Bando C para el Caballo Miniatura, mostrando que cuenta con el número y clasificación cromosómica de la especie *Equus caballus*, 64 XX ó 64 XY, según sea el caso; contando con sus 13 pares de metacéntricos y 18 pares de acrocéntricos y sus cromosomas sexuales.

La medición de los cromosomas concede demostrar que las regiones NOR para el Caballo miniatura se encuentran presentes en los cromosomas 1, 16, 25 y 31. Demostrando que en el caballo miniatura existe una región NOR's en el cromosoma 16.

Por último los resultados observados contribuyen a la caracterización del Caballo miniatura y a la vez facilita un instrumento de diagnóstico que puede ser utilizado para problemas reproductivos en procesos de selección, conservación y de utilidad en pruebas de paternidad.

## LITERATURA REVISADA

**Bickmore Wendy, et al,** Karyotype analysis and chromosome banding. Encyclopedia of life science/ Nature publish group/ [www.els.net](http://www.els.net). (2001)

**Bowling A.T.,et al,** International system for cytogenetic nomenclature of the domestic horse. Chromosome Reserch, Vol 5. 433-443. (1997)

**Bowling AT et al.,** International system for cytogenetic nomenclature of the domestic horse. Davis, CA, USA. (1996)

**Brito, Leonardo F. C. et al.,** Autosomic 27 Trisomy in a Standardbred Colt. Journal of Equine Veterinary Science. Vol 28, No 7 (2008)

**Buckland R.A., et al,** Characterization of the Domestic Horse (*Equus caballus*) Karyotype Using G- and C-Banding Techniques. Specialia, Experientia. 32/9. 1146-1148. (1979)

**De Lorenzi, et al,** Cytogenetic and genetic studies in a hipospadic horse (*Equus caballus*, 2n=64). Sex Dev; 4:352-357. (2010)

**Halnan C.R.E,** Clinical cytogenetics in equine stud practice: consideration of the present situation and future application. Equine veterinary science. Vol 4, No 6.

**Henao F. et al,** Estudio clínico y citogenético de una yegua mestiza estéril. Revista MVZ, Vol. 4(1) (2002)

**Lear T.L., et al,** Equine clinical cytogenetics: the past and the future. Cytogenet Genom Res120:42-49 (2008)

**Loginova et al.,** Some cases of NOR instability un horse chromosomes. Arch. Zootec 45: 275-279. (1996)

**Lui Jeffrey F et al**, Characteristics of NOR-BANDED Chromosomes of Mangalarga Horses. Rev. Brasil. Genet. 13, 2, 269-281 (1990)

**Moncaleno J.S, et al**, Mosaicismo leucocitario asociado a infertilidad en cuatro yeguas. Revista Orinoquia, Vol. 11, No. 1, (2007)

**P.A. Been and M.A. Perle**, Chromosome staining and banding techniques. Human Cytogenetics A Practical Approach. Volume I Constitutional Analysis. Second Edition. Edited by. D.E. ROONEY and B.H. CZEPULKOWSKI. Editado por IRL PRESS. Capítulo 4, pág 104-105

**Puentes, et al.**, Citogenética de la Biodiversidad Animal, Universidad Nacional de Bogota, (2000). <http://es.scribd.com/doc/19913545/Citogenetica-de-La-Bio-Diversidad-animal>

**Ritcher C.L., et al**, Standar karyotype of the domestic horse (*Equus caballus*). Hereditas 112: 289-293 (1990)

**Trifonov V.A., et al**, Multidirectional cross-species painting illuminates the history of karyotypic evolution in Perissodactyla. Chromosome Research 16:89-107. (2008)

**Vera L.F.**, Doble hélice, genes y cromosomas. Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fis Nat. Vol. 97, No. 2, pp203-222. (2003)

**Wood H.E.**, Perissodactyl suborders. J Mammal 18: 106. (1937).

**Yang F, et al**, Karyotypic relationships of horses and zebras:results of cross-species chromosome painting. Cytogenet Genome Res 102:235–243. (2003)