



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"ESTUDIO COMPARATIVO DE LA MORFOLOGIA CROMOSOMICA DEL CERDO (*Sus scrofa domesticus*), BAJO TRES DIFERENTES INHIBIDORES MITOTICOS: COLCHICINA, COLCEMID Y VINBLASTINA".

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**B I O L O G A**

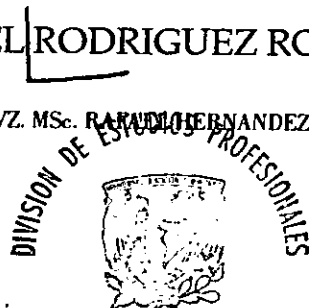
P R E S E N T A:

**MARIA ISABEL RODRIGUEZ ROMERO**

DIRECTOR DE TESIS: MVZ. MSc. RAFAEL HERNANDEZ GONZALEZ



MEXICO, D. F.



2000

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

200582



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

**MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO**  
**Jefa de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"ESTUDIO COMPARATIVO DE LA MORFOLOGIA CROMOSOMICA DEL CERDO (*Sus scrofa domesticus*),  
BAJO TRES DIFERENTES INHIBIDORES MITOTICOS: COLCHICINA, COLCEMID Y VINBLASTINA".

realizado por MARIA ISABEL RODRIGUEZ ROMERO

con número de cuenta 8337787-9 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario

MVZ. MSc. RAFAEL HERNANDEZ GONZALEZ

Propietario

DRA. MARIA ELENA CALDERON SEGURA

Propietario

M. en C. MARIA DE LOURDES JUAREZ MOSQUEDA

Suplente

BIOL. MARCO ANTONIO GONZALEZ JIMENEZ

Suplente

M. en C. SANTIAGO RENE ANZALDUA ARCE

FACULTAD DE CIENCIAS

U. N. A. M.

*Edna H. Suarez D.*

Consejo Departamental de BIOLOGIA

DRA. EDNA SUAREZ DIAZ  
COORDINADORA DE LICENCIATURA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA



DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA

### *Dedicatoria*

A Jehová Dios, porque gracias a ti podemos disfrutar de la naturaleza que nos rodea en todos sus niveles, de la cual también somos parte, y gracias a que existen las células con todos sus componentes es que fue posible la realización del presente trabajo.

A mis padres:

Francisco Rodríguez y Ana Romero, por el apoyo que me han brindado en todos los sentidos a lo largo de mi vida, lo cual me ayudó a alcanzar una de las metas que me he fijado: Mi carrera profesional. Gracias por creer en mí, éste es sólo un pequeño homenaje a todo su esfuerzo.

A mis hermanos:

Roberto, Miguel Angel, Felipe y Pedro, por los años que hemos compartido, durante los cuales me han dado su ayuda cuando la he necesitado. Los quiero mucho.

A mis abuelitos:

Manuel y María, porque siempre han estado pendientes de mi bienestar y por el gran ejemplo que me han dado de salir siempre adelante a pesar de las adversidades que nos presenta la vida.

A Manuel:

Gracias por todo el apoyo y comprensión que me brindas incondicionalmente, porque sé que siempre puedo contar contigo.

A Jaasiel:

Por ser tú quien me impulsa a seguir siempre adelante y por todas las cosas que me has enseñado, a pesar de ser aún pequeño. Eres el regalo más hermoso que Dios me ha dado en la vida.

A todos mis familiares y amigos que de alguna forma han contribuido en mi desarrollo personal y profesional.

Gracias a todos Ustedes

### *Agradecimientos*

Agradezco gratamente al Dr. Rafael Hernández González por proporcionarme el tema de mi tesis, por ser el Director de la misma, así como por todo el apoyo para que yo me iniciara y continúe en mi desarrollo profesional.

Por aceptar formar parte también del jurado calificador agradezco a:

Dra. Ma. Elena Calderón Segura, por apoyarme cuando yo creía que todo este trabajo estaba perdido, por tus consejos siempre atinados y por la ayuda desinteresada que siempre me has mostrado, por compartir conmigo tus conocimientos y por haber ocupado parte de tu tiempo en la realización de esta tesis. Gracias por permitirme gozar de tu amistad.

M. en C. Lourdes Juárez Mosqueda, por permitirme contar con tu amistad sincera en medio de tantas adversidades, por toda la ayuda y los valiosos consejos que siempre me has dado en el momento oportuno, así mismo, por tus aportaciones para mejorar el presente trabajo.

M. en C. Santiago Anzaldúa Arce, por el compañerismo que me has demostrado durante todo este tiempo, así como por tus comentarios y sugerencias que ayudaron en gran manera a mejorar este estudio.

M. en C. Marco Antonio González Jiménez, por tus valiosas observaciones, las cuales permitieron dar mayor calidad profesional a esta tesis.

A la Dra. Rosa Emilia Lavielle, por que siempre ha compartido conmigo sus conocimientos y siempre me ha apoyado cuando he necesitado de su ayuda, pero sobre todo gracias por confiar en mí.

También agradezco a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, especialmente al Departamento de Morfología por todas las facilidades que me ofreció para la realización de este estudio.

A la Granja Porcina "Zapotitlán" por proporcionar las muestras sanguíneas de los cerdos, que fueron analizadas en el presente estudio.

Al Laboratorio de Citogenética Ambiental del Centro de Ciencias de la Atmósfera, especialmente a la Dra. Sandra Gómez Arroyo y a la Dra. Ma. Elena Calderón Segura, por el apoyo y las facilidades prestadas para la conclusión satisfactoria del presente trabajo. Mil Gracias.

## ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	<b>2</b>
<b>Antecedentes</b> .....	<b>3</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>8</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>22</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>22</b>
<b>Materiales y Métodos</b> .....	<b>23</b>
<b>1.- Técnica para el cariotipo</b> .....	<b>23</b>
<b>I. Obtención de la muestra sanguínea</b> .....	<b>23</b>
<b>II. Cultivo de linfocitos</b> .....	<b>23</b>
<b>III. Cosecha de linfocitos</b> .....	<b>24</b>
<b>IV. Fijación de las células</b> .....	<b>24</b>
<b>V. Preparación de los cariotipos</b> .....	<b>24</b>
<b>VI. Tinción de los cromosomas</b> .....	<b>25</b>
<b>2.- Medición de la compactación cromosómica</b> .....	<b>25</b>
<b>3.- Determinación del índice mitótico (IM)</b> .....	<b>25</b>
<b>Resultados</b> .....	<b>26</b>
<b>Tablas</b> .....	<b>28</b>
<b>Discusión</b> .....	<b>33</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>41</b>
<b>Referencias</b> .....	<b>42</b>
<b>Figuras</b> .....	<b>46</b>

## RESUMEN

En el presente estudio se analizó el efecto de tres inhibidores mitóticos, colchicina, colcemid y vinblastina sobre la morfología cromosómica y el índice mitótico (IM) de linfocitos de sangre periférica de cerdo, en cinco concentraciones diferentes (0.1, 0.5, 1.0, 5.0 y 10 µg/ml). La morfología cromosómica se evaluó midiendo la longitud y el diámetro de los cromosomas del par No. 1, mientras que el IM, en los núcleos estimulados por fitohemaglutinina.

En linfocitos de cerdo en cultivo (LCC), la colchicina en las concentraciones de 0.1 y 10.0 µg/ml provoca mayor condensación de los cromosomas, mientras que con el colcemid la mayor compactación se observa a la concentración de 0.5 así como de 5.0 µg/ml obteniendo cromosomas cortos, sin embargo, con 10.0 µg/ml la condensación disminuye significativamente y los cromosomas se observan más elongados, con la vinblastina se nota una relación concentración-efecto sobre la condensación cromosómica, esto indica que los cromosomas más elongados se observan en la concentración más baja (0.1 µg/ml). Respecto al diámetro, no se presentaron diferencias significativas.

El IM de los LCC se ve afectado diferencialmente con los tres inhibidores mitóticos aplicados. Con 10.0 µg/ml de colchicina se encuentra el IM más bajo y se estimula cuando la concentración es de 5.0 µg/ml. Con el colcemid, el IM se aumenta con relación dependiente de la concentración, siendo mayor con 10.0 µg/ml. Por último, con la vinblastina ocurre lo contrario, mientras se aumenta la dosis va disminuyendo el IM, éste parámetro es mayor con 0.1 µg/ml. Estos resultados muestran la concentración adecuada del inhibidor mitótico para obtener cariotipos, con excelente morfología para detectar anomalías cromosómicas en cerdos.

## ANTECEDENTES

A finales de la década de 1870, Strasburger y Fleming iniciaron el estudio del comportamiento de los cromosomas en plantas e invertebrados respectivamente. Gracias a sus investigaciones, en pocos años se llegaron a conocer los fundamentos de la división celular. Dada la espectacularidad de los fenómenos que ocurrían durante la mitosis, como son individualización de los cromosomas, división longitudinal en dos cromátidas y reparto de ellas entre las dos células hijas resultantes, se presentó mayor atención a dicha etapa del ciclo celular y se consideró que la interfase era un periodo de reposo. Sin embargo, es durante este último siglo donde ha habido avances importantes en el conocimiento tanto de la estructura como de la función de los cromosomas (Armendares 1968, Cortés 1984).

Actualmente se sabe que el ciclo celular consiste de un intervalo activo de biosíntesis y de crecimiento durante el cual la célula duplica su masa y su contenido de ADN, seguido por un episodio relativamente breve de división nuclear que suele ir acompañado por la división del citoplasma y la formación de una nueva frontera o límite para separar tanto los núcleos como el citoplasma (cariocinesis y citocinesis respectivamente) en un par de células hijas. Los eventos de la división nuclear o mitosis se conocen desde hace más de 100 años. Sin embargo, la mayoría de las actividades características de la fase de crecimiento entre las divisiones mitóticas, llamada interfase, comenzó a estudiarse a partir de 1950, cuando por medio de estudios autorradiográficos se estableció que el ADN, ARN y las proteínas implicadas eran sintetizadas principalmente durante este intervalo, por lo que fue claro que el período más activo en las células mitóticas era la interfase y no la mitosis misma (Cortés 1984, Avers 1991).



Por otra parte, el descubrimiento de Watson y Crick en 1953 de la estructura en doble hélice del ADN, permitió comprender de qué manera esta molécula almacena la información genética y cómo podían producirse múltiples copias de tal información, se supo entonces que los genes de los organismos superiores se encuentran en los cromosomas (Murray y Szostak 1988).

La materia prima de los cromosomas es una molécula de ADN de dos cadenas con una conformación helicoidal, las cadenas están constituidas por nucleótidos, cada uno de ellos con una de las siguientes bases nitrogenadas: adenina, citocina, guanina y timina. Las bases de una de las cadenas se aparean con las de la cadena opuesta, manteniéndose unidas las dos, así es como las células pueden duplicar sus series cromosómicas antes de la mitosis. Durante la replicación del ADN las dos cadenas de la doble hélice se separan y cada una de ellas actúa como molde o guía de la síntesis de una cadena complementaria, se generan entonces dos cromosomas donde antes sólo había uno (Mezquita 1987).

A partir del momento en que se estableció la estructura molecular de los cromosomas, los estudios cromosómicos y genéticos se han ido desarrollando generando así la Citogenética, que es una rama de la Biología en la que participan la Citología y la Genética, cuyo objetivo principal ha sido el estudio de las bases citológicas que pudieran explicar satisfactoriamente los fenómenos hereditarios (Cortés 1984). Durante sus inicios, los citogenetistas habían estudiado los cromosomas de las plantas y de los invertebrados relacionando las anomalías numéricas y estructurales de los cromosomas con las características que transmiten, estos estudios hicieron posible que dejara de ser motivo de debate el papel de los cromosomas como portadores de los genes.

Por otra parte, aunque se había intentado estudiar los cromosomas humanos desde mucho antes, es posible que fueran observados por primera vez en células tumorales por Arnold en 1879.

Posteriormente, Hansemann en 1891 y Flemming en 1898, trataron de determinar el número normal de cromosomas en el hombre, pero debido a lo rudimentario de sus procedimientos, sólo pudieron sugerir que eran aproximadamente 24. Winiwarter en 1912, usando técnicas más perfeccionadas, encontró 47 cromosomas en material testicular uno de los cuales era el cromosoma sexual X y 48 en tejido ovárico donde dos eran cromosomas X. Nueve años más tarde, Painter demostró la presencia del cromosoma Y en espermatoцитos primarios y concluyó que el número diploide de cromosomas era de 48 en ambos sexos. Pero fue hasta 1956 cuando Joe Tjio y Albert Levan, trabajando con líquido amniótico de bovino, como medio de cultivo, determinaron que el número normal de cromosomas de la especie humana en las células somáticas es de 46, esto es, 22 pares de autosomas además de los cromosomas sexuales X y Y, así la investigación de los cromosomas humanos se extendió rápidamente (Armendares 1968).

Actualmente se sabe que diferentes células del mismo organismo y diferentes organismos de la misma especie tienen, por regla general, el mismo número de cromosomas, con excepción de las células gaméticas, que tienen sólo un juego de los cromosomas de las células somáticas, también por regla general los cromosomas homólogos son uniformes en el número y el orden de los genes que llevan. Cualquier cambio en el número de cromosomas u orden de los genes en los mismos dará lugar a modificaciones en el componente cromosómico del organismo llamadas anormalidades o aberraciones cromosómicas (Warburton 1980, Ayala 1994).

Las aberraciones cromosómicas se clasifican de la siguiente manera:

### 1) Estructurales

Cuando hay cambio en el número de genes de los cromosomas, puede ser Delección, si ocurre la pérdida de un segmento cromosómico, ésta fue la primera aberración cromosómica manifestada por

pruebas genéticas en 1917 y Duplicación, si hay presencia de un segmento cromosómico mas de una vez en un mismo cromosoma.

Cuando hay cambio en la localización de los genes en los cromosomas, puede haber una Inversión o una Translocación. En las inversiones, aunque hay un cambio de sentido de los segmentos afectados, no cambia ni el número de los cromosomas, ni el número de genes en los cromosomas, hay dos tipos de inversiones: pericéntricas, cuando incluyen el centrómero y paracéntricas, cuando no lo incluyen. Las translocaciones también pueden ser de dos tipos: las recíprocas, que son las más comunes, implican el intercambio de bloques de genes entre dos cromosomas y las transposiciones, donde un segmento cromosómico se traslada a un nuevo lugar ya sea dentro del mismo cromosoma o a un cromosoma diferente, sin intercambio recíproco (Ayala 1994).

## 2) Numéricas

Ocurre en el caso de que se altere el número de cromosomas pero no la cantidad total del material hereditario y puede ser Fusión o Fisión. La fusión cromosómica, es cuando dos cromosomas no homólogos se unen y forman uno, con la consecuente pérdida de un centrómero. La fisión ocurre cuando un cromosoma se parte en dos, aquí debe producirse un nuevo centrómero, de otro modo el cromosoma acentromérico se pierde cuando la célula se divide.

Cuando el cambio sí altera la cantidad total del material hereditario, se habla de Aneuploidía, en este caso faltan o se hallan en exceso uno o más cromosomas de una juego normal, siendo resultado de la segregación anormal durante la meiosis, puede ser monosomía, trisomía, tetrasomía, etc. O bien Poliploidía, en el caso de que haya más de dos juegos de cromosomas, como triploide tetraploide, pentaploide, etc. La poliploidía se origina debido a que irregularidades de la mitosis

pueden producir gametos con una dotación cromosómica somática en lugar de la gamética, o por duplicación espontánea de los cromosomas en las células somáticas, es decir, replicación cromosómica sin división celular (Ayala 1994).

Durante la década de 1960 se demostró claramente la importancia del análisis cromosómico sobre todo en pediatría, esto debido a que se producen anomalías cromosómicas en cinco de cada 1000 niños nacidos vivos y tres de cada cinco lactantes afectados tienen anomalías fenotípicas graves. Se descubrió además que sólo aproximadamente el 1% de los fetos anormales desde el punto de vista cromosómico sobreviven al término, ya que la mayor parte se abortan espontáneamente antes de la semana 28 de gestación (Warburton 1980).

Hasta hace poco tiempo el papel de las anomalías cromosómicas en animales domésticos estaba poco explotado, estos estudios principalmente se han relacionado con el fracaso reproductivo, es decir, baja fertilidad e incluso infertilidad. Sólo un número limitado de casos había sido descrito y con pocas excepciones no había información confiable de su incidencia en la población general de los animales domésticos más importantes (Hageltorn y Gustavsson 1973).

## INTRODUCCIÓN

El cerdo forma parte importante en la dieta de los mexicanos desde que lo trajeron a América los españoles. En México su producción ha ocupado, en diferentes décadas, los primeros sitios al aportar entre el 20 y el 49% del consumo de carnes, actualmente la porcicultura aporta cerca del 25% de dicha producción (Trueba 1998).

Existen sistemas de producción asociados a rangos tecnológicos, regionalización, tamaño y niveles de producción y eficiencia, dichos sistemas pueden clasificarse en tres niveles:

**Sistema Tecnificado**, Representa el 50% de la producción nacional y se caracteriza por contar con instalaciones perfectamente diseñadas, con pie de cría de alta calidad genética y productiva, cuenta con asesoría especializada en el campo de la nutrición, genética y sanidad. Este sistema se desarrolla y se practica principalmente en los estados de Sonora, Sinaloa, Jalisco, Querétaro, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (Trueba 1998).

**Sistema Semi-tecnificado**, Desarrolla una porcicultura tradicionalista, puede variar en grado de eficiencia y estar o no asesorados por especialistas, este sistema puede resistir efectos desestabilizadores, aunque genera el 30% de la producción nacional, su flujo de producción no es constante ya que reduce su tamaño en cada crisis (Trueba 1998).

**Sistema de Traspatio**, Representa el 20% de la producción nacional, sus instalaciones y animales son rústicos, son pobres también su manejo y nutrición, no cuentan con asesoría en forma permanente, su producción es baja y se desarrolla en todo el territorio nacional. El Traspatio es en

buena medida un riesgo para la salud pública, sin embargo, prevalece porque es fuente de ingreso y ahorro familiar (Trueba 1998).

Por lo anterior, una corriente que buscó desprestigiar a la carne de cerdo argumentó que ésta es poco saludable y alta tanto en calorías, como en colesterol y grasa, ante dichas opiniones, los porcicultores se dieron a la tarea de crear animales magros ayudándose de la ciencia genética y vigilando estrechamente su nutrición y sanidad. Esta alta tecnificación de la porcicultura comenzó a darse durante los años 70's y 80's en algunos estados de la República, sobre todo en Sonora, Sinaloa y el Noreste del país (Trueba 1998).

Hasta ese tiempo, el papel de las anomalías cromosómicas como causa del fracaso reproductivo en animales domésticos estaba muy poco estudiado, en el cerdo sólo un número limitado de casos había sido descrito y con pocas excepciones no había información confiable de su incidencia en la población general. Esto se debía en gran parte a que el análisis citogenético se encontraba muy restringido por los problemas de la identificación de los cromosomas (Hageltorn y Gustavsson 1973).

Si bien desde los inicios de la citogenética las técnicas utilizadas estaban lo suficientemente desarrolladas para llegar a determinar el cariotipo de cualquier especie animal o vegetal, en la década de 1960 se enfrentaba el siguiente problema: a excepción de algunos casos en que los cromosomas presentaban notables diferencias entre sí, eran muy pocas las características morfológicas con las que se contaba para diferenciar claramente los distintos pares de cromosomas homólogos que constituían el complemento diploide de las células. Únicamente el tamaño, la posición del centrómero y la presencia en determinados cromosomas de constricciones secundarias constituían la ayuda, en ocasiones insuficiente, con que se contaba para construir el cariotipo (Cortés 1984).

En la década de 1970 aumentó notablemente la precisión del diagnóstico citogenético, debido al uso de técnicas de identificación de bandas cromosómicas para el análisis y establecimiento de una relación cariotipo-fenotipo bien detallada, es así que se desarrollan diversas técnicas de marcación de bandas. Todos estos métodos tienen en común la producción de bandas de coloración clara y oscura sobre los cromosomas, el patrón de bandas producido por todas las técnicas es idéntico, con excepción de ciertas regiones heterocromáticas. El patrón básico de bandas es también el mismo en los cromosomas de cada célula y en cada individuo cromosómicamente normal de la especie. Las bandas permiten identificar de manera inequívoca cada cromosoma, de este modo pueden reconocerse anomalías que abarcan añadidura o supresión de material cromosómico, lo mismo que las redistribuciones que no cambian la longitud total de los brazos cromosómicos (Warburton 1980).

Gracias a las técnicas de bandeo, se hizo posible el reconocimiento de los pares cromosómicos de los cerdos, todos ellos están correctamente identificados (Hageltorn y Gustavsson 1973). Los cerdos tienen un número total de 38 cromosomas, de los cuales 36 son autosomas y los dos restantes son los cromosomas sexuales X, Y, y se clasifican de la siguiente forma: a) Submetacéntricos, los pares cromosómicos 1-3 y cromosoma sexual X, b) Metacéntricos, los pares de cromosomas 4-12, c) Telocéntricos, los pares de cromosomas 13-18 y cromosoma sexual Y (Hansen 1970, Somlev y Hansen 1970, Ford y Pollock 1980).

Según la posición del centrómero, se pueden definir los cuatro tipos de cromosomas: Metacéntricos, en los que el centrómero divide a las cromátidas en dos brazos de igual longitud. Submetacéntricos, en los que el centrómero está colocado ligeramente hacia un extremo, éstos

cromosomas tienen un brazo más largo que el otro. Acrocéntricos, en los que el centrómero está muy cerca de un extremo, uno de los dos brazos es muy pequeño, generalmente presenta una constricción secundaria en los brazos cortos, lo que permite ver sus extremos como dos prominencias esféricas separadas del cromosoma denominadas satélites. Telocéntricos, en los que el centrómero se encuentra en el extremo terminal del cromosoma y sólo está definido un brazo (Armendares 1968, Murray y Szostak 1988).

Las aberraciones cromosómicas más estudiadas en los cerdos desde el principio de la década de 1970, son las translocaciones recíprocas que incluyen diferentes pares cromosómicos, se ha visto que dichas aberraciones se relacionan con la reducción de la proliferación. Se han realizado estudios en los que se encontró que la tasa de ovulación no se ve afectada por las translocaciones recíprocas, sin embargo, la supervivencia del embrión decreció de 95% en cerdos normales a 60% aproximadamente en los individuos con aberraciones, sin embargo, la mortalidad del nacimiento al destete no es significativamente afectada (Popescu y Bonneau 1984).

En el ganado bovino es donde se han realizado más estudios citogenéticos, en los últimos años se han descrito un gran número de anomalías cromosómicas tanto numéricas como estructurales, la mayor parte de ellas relacionadas con baja fertilidad e incluso con infertilidad. Así, las inversiones pericéntricas provocan en el ganado baja fertilidad y pueden causar la muerte embrionaria temprana; Si esta aberración se encuentra en el cromosoma 14, la baja fertilidad es hereditaria. Cuando se presentan deleciones, pueden afectar a una o a las dos cromátidas de un mismo cromosoma, se han identificado en el 5% al 100% de las células mitóticas de ganado con baja fertilidad (Lozano 1991).

En lo que respecta a las fusiones céntricas en el ganado bovino, se han identificado



prácticamente en relación con todos los cromosomas, a manera de ejemplo se menciona la aberración 25/27 en toros infértiles y 1/29 en aquellos con baja fertilidad. Por otro lado, el ganado bovino que presenta aberraciones del tipo de las aneuploidías resulta ser infértil, la poliploidia por su parte, en pocas ocasiones se ha relacionado con la reproducción del ganado bovino, pero se sabe que provoca desórdenes reproductivos como hipoplasia testicular y aspermia en los machos, así como ciclos estrales largos en hembras (Lozano 1991).

Por otra parte, con el descubrimiento de la inhibición de la mitosis durante la metafase, por la acción de un alcaloide, fue que se permitió el estudio morfológico preciso de los cromosomas, por esto es importante conocer lo que ocurre en el transcurso de dicho proceso, pero antes de que una célula típica pueda dividirse, debe duplicar su masa y todos los elementos que contiene, esto ocurre durante la fase de síntesis y crecimiento llamada interfase (Alberts et al. 1994).

La interfase comienza con la fase  $G_1$  en la que las células, cuyas actividades biosintéticas se han reducido mucho durante la mitosis anterior, adquieren de nuevo una velocidad elevada de biosíntesis. Después sigue la fase S que es cuando se inicia la síntesis de ADN y termina cuando el contenido en ADN del núcleo se ha duplicado y los cromosomas se han replicado. La célula pasa entonces a la fase  $G_2$ , que termina cuando empieza la mitosis. La fase M comienza con la mitosis y termina con la citocinesis, ésta marca el comienzo de la interfase del ciclo celular siguiente. Para que pueda iniciarse la síntesis (S) del ADN es necesaria la duplicación del centriolo, que durante la interfase está estrechamente asociado con el núcleo y actúa como un componente de cada polo del huso durante la mitosis (Alberts et al. 1994).

Durante la interfase, el tamaño de la molécula de ADN de doble hélice es variable en cuanto

a su número de nucleótidos, puede estar formada hasta por miles de millones de ellos, para acomodar una molécula de estas dimensiones en un volumen limitado como lo es el núcleo celular, es necesario entonces empaquetarla, este proceso es reversible a fin de que en cualquier momento la información genética sea accesible a los mecanismos de copia que conlleva la expresión genética. Dicho empaquetamiento corre a cargo de las histonas, proteínas básicas que junto con proteínas no histonas ácidas o neutras y ADN, forman ciertas unidades denominadas nucleosomas. Cada nucleosoma consta entonces de ocho moléculas de histonas -un par de cada uno de los siguientes tipos: H4, H3, H2A y H2B- así como un segmento de ADN que las envuelve dando un par de vueltas a su alrededor además de la histona H1 (Mezquita 1987).

· La histona H1 es de mayor tamaño que las del octámero antes citado, ésta sella el par de vueltas del ADN y organiza a los nucleosomas en una estructura de orden superior, la cromatina. La fosforilación de las histonas H1, es lo que provoca la condensación del ADN, fenómeno que se ha observado durante el final de la fase G<sub>2</sub> y el comienzo del proceso de división celular, a lo largo del cual un segmento de ADN de cinco centímetros, por ejemplo, se compacta hasta medir cinco micrómetros (Mezquita 1987). La mayoría de las proteínas se sintetizan continuamente durante la interfase, pero las histonas se sintetizan principalmente durante la fase S, estas son proteínas que pueden sobrevivir durante toda la vida de una célula (Alberts et al. 1994).

El sistema de control del ciclo celular está basado en dos familias de proteínas, la primera es la familia de las cinasas dependientes de ciclina (cdc), las cuales inducen los procesos de fosforilación de algunas proteínas. La segunda es una familia de proteínas llamadas ciclinas que se unen a moléculas cdc y controlan su capacidad para fosforilar las proteínas blanco apropiadas. El ensamble de ciclina y cdc, su activación y el desensamble del complejo ciclina-cdc son los eventos que controlan el ciclo

celular. Las ciclinas son llamadas así porque tienen un ciclo de síntesis y degradación en cada división celular. Hay dos clases principales de ciclinas: ciclinas mitóticas, que se unen a moléculas cdc durante  $G_2$  y son requeridas para entrar en mitosis, y ciclinas  $G_1$ , las cuales se unen a moléculas cdc durante  $G_1$  y son requeridas para entrar en la fase S (Alberts et al. 1994).

Se ha sugerido que es una cinasa la responsable de la fosforilación de las proteínas de la lámina nuclear, que a su vez origina la desintegración de la envoltura nuclear que se observa durante la mitosis. También que esta cinasa es la responsable de la extensa fosforilación de las moléculas de histona H1 molécula observada en los cromosomas mitóticos. Puesto que la histona H1 se halla presente en los nucleosomas y se sabe que intervienen en su empaquetamiento, su extensa fosforilación inmediatamente antes de la fase M es una de las causas principales de la condensación cromosómica (Alberts et al. 1994).

Pasando ahora a la fase M, durante la mitosis se lleva a cabo la división nuclear que consiste en una secuencia continua de eventos constituida por cinco etapas: profase, prometafase, metafase, anafase y telofase.

El primer signo visible de la mitosis es la condensación y espiralización de la cromatina, lo cual marca el principio de la profase, en este momento se han formado ya dos pares de centriolos, los cuales se replicaron inmediatamente antes de la fase S, cada par está rodeado por los otros componentes del Centro Organizador de Microtúbulos (COMT), en el citoplasma adyacente al núcleo. El COMT está constituido por el centrosoma, el cual contiene a los dos centriolos y éstos están rodeados por el material pericentriolar. Los microtúbulos del huso se polimerizan entre los dos COMT y el alargamiento de las fibras de éste conduce a la separación de los dos COMT en el perimetro

nuclear. Dichos COMT se sitúan en polos opuestos de la célula con el huso entre ellos, pero permaneciendo fuera del área nuclear. El nucleolo empieza a descondensarse y desaparece progresivamente (Alberts et al. 1994).

La prometafase, se inicia bruscamente con la desintegración de la envoltura nuclear. El huso, que hasta el momento se hallaba fuera del núcleo, ahora puede penetrar en el área nuclear. En las dos caras de los centrómeros se desarrollan los cinetocoros, a éstos quedan unidos los microtúbulos cinetocóricos del huso (Alberts et al. 1994).

En la metafase cada cromosoma se alinea en el ecuador del huso con una orientación tal que los centrómeros de cada par de cromátidas hermanas se colocan opuestos a los polos de la célula, para este momento ciertos microtúbulos del huso ya se han adherido a cada cinetocoro y todo está listo para la separación precisa de las cromátidas hermanas y su emigración a los polos opuestos. Las cromátidas hermanas se mantienen unidas hasta el final de la metafase por el centrómero, el cual corresponde a una porción de ADN que contiene heterocromatina constitutiva, la cual consta de secuencias altamente repetidas y al parecer está desprovisto de genes que codifican proteínas (Alberts et al. 1994, Karp 1998).

La anafase inicia cuando se separan los cinetocoros apareados de cada cromosoma, permitiendo que cada cromátida sea arrastrada lentamente hacia un polo del huso. Durante estos movimientos los microtúbulos cinetocóricos se acortan a medida que las cromátidas se acercan a los polos, al mismo tiempo los microtúbulos polares se alargan y los polos del huso se separan aún más (Alberts et al. 1994, Karp 1998).

En la telofase las dos series de cromátidas hijas se ensamblan en núcleos separados a medida que se forma una envoltura nuclear alrededor de cada serie. Durante la reorganización nuclear en esta etapa final de la mitosis reaparecen los nucleólos, el huso mitótico desaparece poco a poco, las cromátidas se desespiralizan y gradualmente el ADN asume el aspecto de cromatina que tenía en la interfase. Cuando los fragmentos de la envoltura nuclear se ensamblan para formar una frontera completa, termina la mitosis y comienza nuevamente la interfase (Alberts et al. 1994).

Al inicio de la mitosis la cromatina sufre su mayor condensación y forma entonces los cromosomas cuya estructura está diferenciada en tres regiones con funciones y morfología específicas para que se lleve a cabo la replicación y segregación: una de ellas es el origen de replicación, lugar del cromosoma donde comienza la síntesis de nuevo ADN, por ser muy largos los cromosomas y muy lenta la replicación en cada uno hay muchos orígenes. Otro elemento necesario para el buen funcionamiento del cromosoma es el cinetocoro, donde se mantienen unidas las dos cromátidas hermanas y donde se anclan microtúbulos del huso durante la mitosis. Finalmente los telómeros, se encuentran en ambos extremos del cromosoma constituidos por ciertas secuencias de ADN repetitivo cuya función es impedir la degradación de los genes terminales (Murray y Szostak 1988).

Los microtúbulos son cilindros huecos no ramificados, su pared puede separarse en trece protofilamentos dispuestos lado a lado en forma helicoidal, cada protofilamento consiste en una larga cadena de subunidades proteicas, las cuales son heterodímeros (dos unidades diferentes) de una  $\alpha$ -tubulina y una  $\beta$ -tubulina (Wilson et al. 1984).

El aislamiento y el uso de microtúbulos y subunidades de tubulina han permitido el descubrimiento de una serie de proteínas accesorias que se asocian a la superficie de los microtúbulos

después de que los dímeros de tubulina se han ensamblado en las fibras cilíndricas huecas. Los microtúbulos tienen una polaridad estructural, imprescindible para la producción de movimiento direccional organizado, ya que unen y liberan heterodímeros por ambos extremos pero a velocidades muy diferentes, un extremo se alarga tres veces más rápido que el opuesto, en el microtúbulo, el extremo de crecimiento rápido es el extremo (+) y el de crecimiento lento es el extremo (-). El huso mitótico es una estructura transitoria y su naturaleza lábil facilita el estudio de la cinética del ensamblaje y desensamblaje de los microtúbulos, gracias a los efectos de algunos fármacos sobre estos procesos y las estructuras específicas que actúan como sitios organizadores para la formación de dichos microtúbulos (Avers 1991).

Para su separación exacta, un cromosoma debe adherirse por su cinetocoro a una clase de microtúbulos del huso llamados precisamente microtúbulos del cinetocoro o cinetocóricos. Mediante cuidadosas mediciones del huso se ha demostrado que estos se acortan gradualmente y a medida que ejercen tracción sobre los cromosomas hacia los polos, el huso aumenta de longitud al mismo tiempo que las dos cromátidas son atraídas en sentidos opuestos. Pero hay otro tipo de microtúbulos, los microtúbulos polares, que se extienden desde el centriolo hasta la región ecuatorial del huso, donde se forma un arreglo superpuesto, estos se alargan haciendo que los dos polos se separen cada vez más (Olmsted y Borisy 1973).

Shiny Inové (1967), llevó a cabo el primer estudio de birrefringencia sobre el huso mitótico. Al analizar los cambios que ocurrieron durante la mitosis, atribuyó dicha birrefringencia a ciertos componentes fibrosos asociados a los cromosomas, a saber los microtúbulos. Propuso entonces, un mecanismo de ensamblaje-desensamblaje, donde por un lado mencionó que la despolimerización de los microtúbulos cromosómicos dio por resultado microtúbulos más cortos, y por otro lado definió la

fuerza que tiraba de los cromosomas hacia los polos (Olmsted y Borisy 1973).

Inové (1967), estableció también que cuando las células en metafase se tratan bajo condiciones controladas con agentes despolimerizantes, los microtúbulos se desensamblan gradualmente en sus extremos polares y los cromosomas se desplazan con lentitud a los polos conforme sus microtúbulos se acortan. De este modo, el desensamblado puede generar fuerza suficiente para el movimiento cromosómico. Por otra parte, la adición de monómeros de tubulina a los microtúbulos polares explica su alargamiento y tal vez se genera fuerza suficiente para separar las dos mitades del huso (Olmsted y Borisy 1973).

Cuando empieza la mitosis los microtúbulos que irradian en el citoplasma se desensamblan y los microtúbulos del huso empiezan a ensamblarse formando el huso mitótico. El intercambio dinámico entre polímeros de los microtúbulos y el almacén citoplásmico de monómeros de tubulina es particularmente sensible a varios fármacos, entre los que se encuentran la colchicina, el colcemid y la vinblastina (Olmsted y Borisy 1973, Aguilar-Parada 1991, Karp 1998).

La colchicina es un alcaloide que fue aislado de la raíz de la planta *Colchicum autumnale* en 1883 y desde entonces se ha usado con el fin de obtener núcleos metafásicos (Denton 1973). En la actualidad es conocido como un inhibidor mitótico en gran variedad de células de plantas y animales por interferir con los microtúbulos del huso mitótico (Borisy y Taylor 1967, Weisenberg et al. 1968). Dicho fármaco al igual que el colcemid, un derivado bioquímico de la colchicina (diacetil metil-colchicina), se enlaza a los dímeros de tubulina (proteína globular que constituye los microtúbulos del huso mitótico), esta unión se ha estudiado extensamente ya que evita su polimerización y con ello el ensamble de los microtúbulos o causa su despolimerización y desensamble de los mismos (Garland

1978). Así, el principal modo de acción tanto de la colchicina como del colcemid es la degradación de los microtúbulos por su unión a las subunidades de tubulina (Handel 1979).

Farrel y Wilson establecieron que la colchicina inhibe la polimerización de la tubulina por la alteración de su cinética, esto es, la adición y pérdida de dímeros de tubulina en los dos extremos de los microtúbulos son diferencialmente sensibles a la acción de la colchicina, el extremo de ensamble es mucho más sensible a la droga que el extremo de desensamble (Wilson et al. 1984). Schmitt y Atlas (1976) sugieren que el sitio de alta afinidad es la subunidad proteica tubulina. Una vez que se elimina el compuesto se reconstituye la cinética de la tubulina y así el huso en las células mitóticas (Garland 1978).

Se considera que la colchicina es una droga más tóxica que el colcemid, ya que provoca un efecto de condensación en los cromosomas alterando su morfología, lo cual puede conducir a una clasificación y a un análisis erróneos de los cromosomas homólogos (Denton 1973).

Por ello en los últimos años se ha optado por el empleo de otro inhibidor mitótico con menor toxicidad aparente, la vinblastina, que también es un alcaloide pero extraído de otra planta, a saber, *Vinca rosea*. Es ampliamente utilizado en quimioterapia de cáncer, ya que es una droga antimitótica (Na y Timasheff 1982). Este compuesto al igual que la colchicina y el colcemid, también inhibe la formación del huso mitótico deteniendo la división celular en metafase pero actúa en una forma diferente, primero induce el rompimiento de los microtúbulos en subunidades de tubulina, después se une a estas y resultan en un rearrreglo de agregados paracristalinos muy distintos de la estructura molecular normal de los microtúbulos (Olmsted y Borisy 1973).



Fujiwara y Tilney (1975), realizando estudios en microscopía electrónica propusieron que los paracrístales tienen una estructura alargada con forma hexagonal, esto es, contienen gran cantidad de paquetes de protofilamentos colocados en forma paralela unos con otros a lo largo de su eje, cada protofilamento consta de dos moléculas de tubulina entrelazadas helicoidalmente. La inducción de los agregados paracrístalinos de tubulina-vinblastina se deben a la presencia en el medio de dos cationes divalentes, iones de magnesio para el ensamble de los microtúbulos y de calcio para el desensamble de los mismos (Na y Timasheff 1982).

Cualquiera de los tres fármacos antes mencionados intervienen con el ensamblaje ordenado del huso y por tanto inhiben la alineación de los cromosomas en la metafase, así como su movimiento en la anafase, esto demuestra claramente que el huso mitótico es esencial para el movimiento ordenado y dirigido de los cromosomas en la mitosis (Denton 1973, Lenhinger 1993).

Cuando los microtúbulos son despolimerizados experimentalmente, empiezan a reensamblarse a partir de los centros organizadores de microtúbulos (COMT), que contienen al centrosoma, los centriolos y el material pericentriolar. En animales y organismos inferiores el centrosoma es una región relativamente transparente que alberga a un par de centriolos en medio; en husos mitóticos bien desarrollados, los microtúbulos tanto del cinetocoro como polares emanan del centrosoma en cada polo de la célula en división. Cada centriolo es una estructura cilíndrica cuya forma está definida por el arreglo de nueve series de tripletes de microtúbulos que constituyen su pared (Avers 1991).

En organismos como fanerógamas y gimnospermas, aunque carecen de centriolos hay formación del huso mitótico compuesto por microtúbulos, lo cual indica que no necesariamente debe

estar presente un centriolo en la región del centrosoma para la formación del mismo. Un examen detallado de los polos de cada extremo de los husos revela la presencia del COMT, dispuesto en placas en la superficie externa de la envoltura nuclear, también revela que los microtúbulos del cinetocoro y polares del huso mitótico se originan en este material, que representa el verdadero COMT (Karp 1998).

Finalmente, en la presente investigación se utilizó el estudio citogenético, como se mencionó anteriormente tanto la colchicina como el colcemid y la vinblastina interfieren deteniendo el proceso de división celular en metafase, lo que permite la observación adecuada de la morfología de los cromosomas. Con esta finalidad se han utilizado tradicionalmente los dos primeros, sin embargo, la vinblastina se utiliza esporádicamente en los estudios citogenéticos sin que el motivo sea mencionado, siendo que tiene ventajas relacionadas con la morfología cromosómica en comparación con los otros dos fármacos (Aguilar-Parada et al. 1991).

En vista de que en nuestro país son escasas las investigaciones citogenéticas en animales de importancia económica, este estudio pretende aplicar la técnica en el diagnóstico y pronóstico de aberraciones cromosómicas y posteriormente pueda tener beneficios en las granjas porcinas.

## HIPÓTESIS

El uso de la vinblastina en los cultivos de linfocitos producirá un menor efecto sobre la morfología de los cromosomas así como un mayor número de mitosis en metafase, que los obtenidos con la colchicina y el colcemid, debido a que éstos dos últimos alteran más la morfología cromosómica. Así mismo, las dos variables estarán en relación directa con la concentración del inhibidor mitótico.

## OBJETIVOS

- Analizar y comparar el efecto que tienen sobre la morfología de los cromosomas tanto la colchicina, como el colcemid y la vinblastina con cinco diferentes concentraciones para cada uno (0.1, 0.5, 1.0, 5.0 y 10.0µg/ml), a través de la compactación del par cromosómico No. 1, en la metafase de los Linfocitos de Cerdo en Cultivo (LCC).
  
- Determinar la acción de las drogas anteriores sobre el Índice Mitótico (IM) de los LCC a las cinco concentraciones valoradas.
  
- Encontrar la concentración adecuada para cada uno de los inhibidores mitóticos que permita obtener cromosomas metafásicos, sin afectar la proliferación celular y que a su vez facilite su observación y aplicación en el diagnóstico cromosómico en las investigaciones citogenéticas de los cerdos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La recolección de las muestras de sangre periférica para el análisis cromosómico, se llevó a cabo en 5 sementales de la Granja Experimental Porcina "Zapotitlan", perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Mientras que la parte técnica del estudio se realizó en el laboratorio de Histología del Departamento de Morfología de la misma Facultad.

### I- Técnica para el cariotipo

#### I.- Obtención de la muestra sanguínea

Se tomaron muestras de 5 ml de sangre periférica en tubos vacutainer heparinizados provenientes de sementales clínicamente sanos, tomándose todas las precauciones con el fin de evitar posibles contaminaciones por microorganismos en los cultivos de linfocitos y obtener así resultados confiables.

#### II.- Cultivo de linfocitos

En tubos estériles se colocaron 5 ml del medio de cultivo McCoy 5a Modificado (Microlab) complementado con 0.5 ml de fitohemaglutinina (FHA) como estimulante de división mitótica, se adicionaron 8 gotas de sangre, el tubo se tapó perfectamente y se incubó durante 72 horas a 37°C. A las 70 hrs de incubación, se agregó cada inhibidor mitótico: 0.2 ml de colchicina, 0.2 ml de colcemid (Microlab), 0.2 ml de vinblastina (Laboratorio Eli Lilly), a las siguientes concentraciones, las cuales se han aplicado en trabajos anteriores:

- 0.1  $\mu\text{g/ml}$  colcemid  $\rightarrow$  en células de bovino (Lozano 1991)
- 0.5  $\mu\text{g/ml}$  colchicina  $\rightarrow$  en células de aves (Shoffner y Krishan 1965)
- 1.0  $\mu\text{g/ml}$  colchicina y colcemid  $\rightarrow$  en células de aves (Jaffé y Fechheimer 1966)
- 5.0  $\mu\text{g/ml}$  no se encontró referencia.
- 10.0  $\mu\text{g/ml}$  colcemid  $\rightarrow$  en células de humano (Arakaki 1963 y Armendares 1968).

### III.- Cosecha de linfocitos

Después de 72 hrs de incubación, los cultivos fueron centrifugados a 1000 rpm durante cinco minutos. Los sobrenadantes fueron desechados y las células tratadas con una solución hipotónica de cloruro de potasio (KCl) al 0.075 M durante 20 minutos a 37°C. Nuevamente se centrifugaron por cinco minutos a 1000 rpm y se descartaron los sobrenadantes.

### IV.- Fijación de las células

La fijación de la pastilla celular se realizó mediante la adición de solución de Carnoy (metanol-ácido acético, en una proporción de 3:1) y se dejó reposar cinco minutos, después se centrifugó y se decantó, finalmente, con la misma solución se lavó la pastilla dos veces.

### V.- Preparación de los cariotipos

Las pastillas celulares fueron resuspendidas, con una pipeta Pasteur se tomó una muestra y se dejaron caer gotas sobre un portaobjetos a una altura de un metro. Se hicieron cinco laminillas para cada una de las concentraciones de los inhibidores mitóticos ensayados. Las muestras fueron observadas al microscopio de contraste de fases para verificar la presencia de metafases.

## VI.- Tinción de los cromosomas

Las laminillas se tiñeron con Giemsa al 10%, posteriormente se lavaron con agua corriente, las muestras se dejaron secar al aire y se observaron al microscopio fotónico con los objetivos de 10X, 40X y 100X.

### 2- Medición de la condensación cromosómica

La morfología de los cromosomas se valoró por medio de la condensación cromosómica, la cual se determinó midiendo la longitud y el diámetro de los miembros del par cromosómico No. 1 (Andersen y Ronne 1983). Se analizaron cinco metafases para cada concentración de los inhibidores y los datos obtenidos se sometieron a las pruebas estadísticas de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney (Siegel 1986).

### 3-Determinación del Índice Mitótico (IM)

El IM se determinó cuantificando el número de metafases por cada 1000 linfocitos estimulados, cuya fórmula es la siguiente:

$$IM = (\text{No. de metafases} / 1000) \times 100 = \%IM$$

Para el análisis estadístico se aplicó la  $\chi^2$ , a una  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

La compactación cromosómica se evaluó midiendo en cinco muestras para cada tratamiento, la longitud del par cromosómico número 1 (Tabla 1), para cada uno de los tres inhibidores mitóticos en las cinco concentraciones ensayadas. En la tabla 2, se puede observar que para la colchicina la mayor longitud es de 6.21  $\mu\text{m}$  y se encuentra en 0.5  $\mu\text{g/ml}$  y la menor es de 4.71  $\mu\text{m}$  en 10.0  $\mu\text{g/ml}$ ; en el caso del colcemid, se tuvo que este parámetro fue constante, la longitud mayor fue de 5.99  $\mu\text{m}$  en 10.0  $\mu\text{g/ml}$  y la menor fue de 5.24  $\mu\text{m}$  tanto en 0.5  $\mu\text{g/ml}$  como en 5.0  $\mu\text{g/ml}$ ; con la vinblastina la mayor longitud fue de 7.28  $\mu\text{m}$  para 0.1  $\mu\text{g/ml}$  y la menor fue de 4.81  $\mu\text{m}$  para 10.0  $\mu\text{g/ml}$ .

Los resultados de la prueba estadística de Kruskal - Wallis indicaron que sólo las concentraciones 0.1 y 10.0  $\mu\text{g/ml}$  son significativamente diferentes para la longitud cromosómica en los tres inhibidores mitóticos ensayados, mientras que las concentraciones 0.5, 1.0 y 5.0  $\mu\text{g/ml}$  no afectaron este parámetro (Tabla 3). A estos resultados se les aplicó la prueba estadística U de Mann-Whitney (Tabla 4) y se determinó que para 0.1  $\mu\text{g/ml}$  la comparación de colchicina-colcemid no mostró cambios significativos en la longitud; pero al comparar colchicina-vinblastina y colcemid-vinblastina, los cambios fueron significativos ya que la vinblastina aumentó la longitud (Tabla 2). En lo que respecta a la concentración de 10.0  $\mu\text{g/ml}$ , la comparación de colchicina-vinblastina no es estadísticamente significativa, sin embargo, en colchicina-colcemid y colcemid-vinblastina si hay significancia, ya que se observó una mayor longitud al aplicar el colcemid (Tabla 2).

En la tabla 5, se encuentran los valores del diámetro, se midieron cinco metafases para cada muestra de colchicina, colcemid y vinblastina, en las cinco concentraciones diferentes de cada uno de ellos. Se puede observar que no hubo diferencias significativas en cuanto a este parámetro (Tabla 6).

Finalmente, al comparar el efecto de los tres mitógenos sobre el IM, se encontró que con la colchicina y el colcemid se obtiene un IM mayor con 5.0 y 10.0  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente, mientras que con la vinblastina fue a 0.1  $\mu\text{g/ml}$  (Tabla 7).

Por otra parte, el análisis del IM en LCC indicó que con las concentraciones 0.5 y 10.0  $\mu\text{g/ml}$  de colchicina, el IM disminuye significativamente y con 5.0  $\mu\text{g/ml}$  se duplica su valor (Tabla 7). Con 0.5 y 1.0  $\mu\text{g/ml}$  de colcemid desciende el IM y un efecto contrario se obtiene con 5.0 y 10.0  $\mu\text{g/ml}$  (Tabla7). Mientras que con la vinblastina los valores del IM disminuyeron con relación a la concentración (Tabla 7).



TABLA 1. Longitud del par cromosómico No. 1 de linfocitos de cerdo en cultivo, bajo tres diferentes inhibidores mitóticos a cinco concentraciones.

$\mu\text{g/ml}$	Colchicina ( $\mu\text{m}$ )		Colcemid ( $\mu\text{m}$ )		Vinblastina ( $\mu\text{m}$ )	
	1	1'	1	1'	1	1'
0.1	5.35	4.28	5.35	5.35	8.56	7.49
	4.28	4.28	6.42	6.42	6.42	7.49
	4.28	5.35	6.42	6.42	6.42	7.49
	5.35	5.35	5.35	6.42	7.49	7.49
	4.28	5.35	5.35	5.35	7.49	6.42
0.5	5.35	6.42	4.28	5.35	5.35	5.35
	5.35	6.42	6.42	5.35	5.35	5.35
	5.35	5.35	5.35	5.35	5.35	5.35
	6.42	6.42	4.28	5.35	4.28	5.35
	5.35	6.42	5.35	5.35	4.28	4.28
1.0	5.35	6.42	4.28	4.28	6.42	5.35
	5.35	5.35	5.35	5.35	5.35	5.35
	5.35	6.42	6.42	5.35	6.42	5.35
	6.42	5.35	5.35	6.42	5.35	6.42
	5.35	5.35	5.35	5.35	5.35	6.42
5.0	5.35	5.35	5.35	5.35	6.42	6.42
	6.42	6.42	5.35	4.28	5.35	5.35
	6.42	6.42	4.28	5.35	7.49	5.35
	7.49	6.42	5.35	6.42	5.35	5.35
	5.35	6.42	5.35	5.35	6.42	6.42
10.0	4.28	5.35	6.42	6.42	4.28	4.28
	4.28	4.28	6.42	6.42	4.28	5.35
	4.28	5.35	6.42	5.35	5.35	5.35
	4.28	4.28	5.35	5.35	5.35	5.35
	5.35	5.35	6.42	5.35	4.28	4.28

1 y 1' = par cromosómico No. 1 de cada muestra

**TABLA 2. Promedios de la longitud de los cromosomas 1 y 1' sometidos a tres inhibidores mitóticos y a cinco concentraciones diferentes de cada uno.**

$\mu\text{g/ml}$	Colchicina	Colcemid	Vinblastina
0.1	$4.81 \pm 0.53$	$5.88 \pm 0.53$	$7.28 \pm 0.64$
0.5	$5.88 \pm 0.53$	$5.24 \pm 0.58$	$5.03 \pm 0.49$
1.0	$5.67 \pm 0.49$	$5.35 \pm 0.68$	$5.78 \pm 0.52$
5.0	$6.21 \pm 0.64$	$5.24 \pm 0.58$	$5.99 \pm 0.71$
10.0	$4.71 \pm 0.52$	$5.99 \pm 0.52$	$4.81 \pm 0.53$

**TABLA 3. Resultados estadísticos con la prueba de Kruskal-Wallis para la longitud del par cromosómico No. 1 a cinco concentraciones diferentes de cada inhibidor mitótico.**

$\mu\text{g/ml}$	H	p
0.1	19.95	0.001*
0.5	6.79	0.05
1.0	1.64	0.50
5.0	7.17	0.02
10.0	13.11	0.001*

H = Valor de la prueba  
 $\alpha = 0.01$

p = Nivel de probabilidad  
 \* = Diferencias significativas

**TABLA 4.** Resultados estadísticos con la prueba de U de Mann-Whitney para poblaciones diferentes con respecto a la longitud del par cromosómico No. 1 en linfocitos de cerdo en cultivo.

$\mu\text{g/ml}$	CLC-CLM		CLC-VLT		CLM-VLT	
	$U_o$	$U_T$	$U_o$	$U_T$	$U_o$	$U_T$
0.1	45	38	10*	38	34*	38
10.0	34*	38	55	38	20*	38

CLC = Colchicina    CLM = Colcemid    VLT = Vinblastina

$U_o$  = Valor observado

$U_T$  = Valor de tablas

$\alpha = 0.02$

\* = Diferencias significativas

**TABLA 5. Diámetro del par cromosómico No. 1 de linfocitos de cerdo en cultivo, bajo tres diferentes inhibidores mitóticos a cinco concentraciones.**

µg/ml	Colchicina (µm)		Colcemid (µm)		Vinblastina (µm)	
	1	1'	1	1'	1	1'
0.1	2.14	2.14	2.14	2.14	2.14	2.14
	2.14	2.14	2.14	2.14	2.14	1.07
	2.14	1.07	1.07	1.07	1.07	1.07
	2.14	1.07	2.14	2.14	2.14	1.07
	2.14	2.14	2.14	2.14	1.07	1.07
0.5	1.07	1.07	2.14	2.14	2.14	1.07
	2.14	2.14	2.14	2.14	1.07	1.07
	2.14	1.07	1.07	2.14	2.14	2.14
	1.07	1.07	2.14	2.14	2.14	2.14
	2.14	1.07	2.14	2.14	1.07	1.07
1.0	2.14	2.14	2.14	2.14	2.14	2.14
	2.14	2.14	2.14	1.07	2.14	2.14
	1.07	2.14	2.14	2.14	1.07	2.14
	1.07	2.14	2.14	2.14	1.07	2.14
	2.14	2.14	2.14	2.14	2.14	2.14
5.0	2.14	2.14	2.14	2.14	1.07	2.14
	2.14	2.14	2.14	2.14	1.07	2.14
	1.07	1.07	2.14	2.14	2.14	2.14
	1.07	1.07	2.14	2.14	2.14	2.14
	1.07	2.14	2.14	2.14	2.14	2.14
10.0	2.14	2.14	1.07	1.07	2.14	2.14
	2.14	2.14	1.07	1.07	1.07	1.07
	1.07	1.07	2.14	1.07	1.07	1.07
	2.14	2.14	1.07	1.07	2.14	2.14
	1.07	2.14	2.14	1.07	1.07	1.07

1 y 1' = par cromosómico No. 1 de cada muestra

**TABLA 6.** Resultados estadísticos con la prueba de Kruskal-Wallis para el diámetro del par cromosómico No. 1 a cinco concentraciones diferentes de cada inhibidor mitótico.

$\mu\text{g/ml}$	H	p
0.1	3.10	0.20
0.5	4.06	0.10
1.0	0.19	0.90
5.0	3.68	0.20
10.0	3.68	0.20

H = Valor de la prueba  
 $\alpha = 0.01$

p = Nivel de probabilidad  
\* = Diferencias significativas

**TABLA 7.** Índice mitótico en linfocitos de cerdo en cultivo tratados con tres inhibidores mitóticos a cinco concentraciones diferentes.

INHIBIDOR	$\mu\text{g/ml}$	IM <sup>a</sup>	%IM
Colchicina	0.1	38	3.8
	0.5	23	2.3*
	1.0	34	3.4*
	5.0	68	6.8 *
	10.0	11	1.1*
Colcemid	0.1	33	3.3
	0.5	18	1.8*
	1.0	19	1.9*
	5.0	48	4.8*
	10.0	58	5.8 *
Vinblastina	0.1	72	7.2 *
	0.5	37	3.7*
	1.0	35	3.5*
	5.0	39	3.9*
	10.0	18	1.8*

<sup>a</sup> = Índice mitótico

n = 1000 células estimuladas

\* = Diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de cada inhibidor mitótico obtenidas con la prueba de  $\chi^2$  a  $p < 0.05$

## DISCUSION

En la actualidad, los inhibidores mitóticos son ampliamente utilizados tanto en el campo de la medicina como en la investigación científica. La colchicina, el colcemid y la vinblastina, son compuestos alcaloides usados en los tratamientos contra el cáncer, debido a que son drogas antimitóticas, es decir, inhiben la formación de la estructura del huso mitótico.

En este estudio, los resultados evidenciaron que los tres fármacos, (la colchicina, el colcemid y la vinblastina), probados en LCC, alteraron la longitud de los cromosomas metafásicos y bloquearon el ciclo celular en la metafase de la mitosis.

Se observó que la colchicina produjo el mayor efecto sobre la condensación de los cromosomas tanto a la concentración mas baja como a la mas alta (0.1 y 10.0  $\mu\text{g/ml}$ ) siendo estas de 4.81 y 4.71  $\mu\text{m}$  respectivamente (Tabla 2, Fig. 1 y 2). En este caso, la droga podría estar interfiriendo con la fosforilación de la histona H1, lo que estaría ocasionando una mayor condensación de los cromosomas. A concentraciones intermedias, los cromosomas fueron más elongados, incluso por arriba de 5.0  $\mu\text{m}$ , es decir, el efecto de la colchicina sobre la fosforilación de las histonas H1 fue menor (Fig.3, 4 y 5).

En lo que se refiere al colcemid, se observó que a diferencia con la colchicina, a la concentración más baja y a la más alta (0.1 y 10.0  $\mu\text{g/ml}$ ), los cromosomas se encontraron más elongados, es decir, 5.88 y 5.99  $\mu\text{m}$  respectivamente (Fig. 6 y 7), mientras que 0.5 y 5.0  $\mu\text{g/ml}$  causaron un aumento en el grado de condensación del ADN, debido probablemente al mayor el efecto de esta droga sobre la fosforilación de la histona H1, reflejado esto en que los cromosomas son más

cortos, llegando a medir 5.24  $\mu\text{m}$  en ambos casos (Tabla 2, Fig. 8 y 9). Es evidente que, aunque el colcemid es un compuesto muy similar a la colchicina, este actúa de una forma diferente en la célula.

La vinblastina mostró una relación directamente proporcional entre concentración y condensación de los cromosomas. A bajas concentraciones (0.1  $\mu\text{g/ml}$ ) los cromosomas estuvieron más elongados, 7.28  $\mu\text{m}$  (Tabla 2), esto probablemente significa que conforme se va aumentando su concentración, se induce mayor fosforilación de la histona H1 y por tanto, la mayor condensación de los cromosomas (Fig. 10).

Según Aguilar-Parada et al. (1991), trabajando con linfocitos de ser humano, encontraron que lo que ellos llamaron el efecto C (cromosomas compactos) es una alteración que se presenta en cultivos celulares expuestos a concentraciones elevadas de un inhibidor mitótico o a su exposición durante periodos prolongados; además mencionan que este efecto es característico de la colchicina, sin embargo, ellos sólo compararon esta droga a una concentración de 0.2  $\mu\text{g/ml}$ , con colcemid a 0.18  $\mu\text{g/ml}$  y vinblastina a 0.5  $\mu\text{g/ml}$ , así mismo, el tiempo de exposición fue diferente para cada uno. En el presente estudio los LCC fueron tratados con estos tres fármacos a cinco concentraciones diferentes para cada uno de ellos, dando el mismo tiempo de acción a todos. Los resultados obtenidos para la vinblastina concordaron con la propuesta anterior, sin embargo, para la colchicina no sólo a concentraciones elevadas provoca el efecto C, sino que también a concentraciones mínimas (0.1  $\mu\text{g/ml}$ ).

El examen de las metafases, evidenció la morfología adecuada en los cromosomas obtenidos de los cultivos tratados con vinblastina, refiriéndose a la longitud de los cromosomas. Es notable que la vinblastina dio resultados óptimos en cuanto a elongación de los cromosomas cuando se aplicó a 0.1

$\mu\text{g/ml}$  (Tabla 4). Estos datos son importantes, ya que en la práctica del diagnóstico citogenético se incluyen sólo las metafases que tienen cromosomas elongados (Aguilar-Parada et al. 1991).

Es ya conocido que el blanco de acción de los tres inhibidores mitóticos es la proteína tubulina la cual se encarga de formar los microtúbulos del huso durante la mitosis (Wilson et al. 1984, Dustin 1984, Wallin et al. 1988, Avila 1990). Sin embargo, es posible que los inhibidores mitóticos además de tener un efecto claro en la proteína tubulina, afecten de igual forma a proteínas que regulan el ciclo celular, como son *cdc28* y ciclina tipo-B. La proteína *cdc28* es una cinasa cuyos niveles permanecen constantes a través del ciclo celular y tiene una fuerte preferencia por la histona H1 como sustrato. La ciclina B, por su parte, está sujeta a síntesis y degradación periódicas, se acumula durante la interfase y desaparece bruscamente al final de la mitosis, dicha acumulación es la encargada de mantener activa a la proteína *cdc28* durante la mitosis (Murray y Kirschner 1991, Alberts et al. 1994, Dekel 1995, Hutchison et al. 1995).

El mecanismo de condensación progresiva de los cromosomas se inicia con la duplicación del ADN durante la interfase y continúa hasta la metafase de la mitosis, esta condensación es provocada por el incremento del nivel de fosforilación de la histona H1 (Risley 1989, Dekel 1995). Debido a que la histona H1 actúa como sustrato de la proteína *cdc28*, puede decirse que tal vez los inhibidores mitóticos tengan algún efecto en las proteínas *cdc28* y ciclina B, dependiendo de la concentración aplicada de cada uno de ellos.

Los resultados muestran también que en cuanto al diámetro de los cromosomas, parámetro al que se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis (Tabla 6), no hubo diferencias significativas al comparar todos los tratamientos, esto puede ser evidencia de que ninguno de los tres inhibidores tubo efecto



sobre el diámetro, caso contrario a la longitud de los cromosomas.

Por otra parte, el índice mitótico (IM) en LCC es un parámetro que se usa para evaluar el efecto de drogas antineoplásicas o citostáticas, esto se debe a que está directamente relacionado con la inhibición del ciclo celular y/o la proliferación celular.

El análisis del IM evidencia que al igual que en la longitud de los cromosomas, los resultados difieren según el inhibidor y la concentración aplicada. Con colchicina, de 0.1 a 1.0  $\mu\text{g/ml}$  no se afectó el IM, pero a 5.0  $\mu\text{g/ml}$  produjo un aumento significativo del mismo hasta 6.8, al mismo tiempo aumentó la proliferación celular debido a que las células se dividen más rápido y tienen ciclo celular más corto. Sin embargo, cuando se aplica la concentración mas alta (10.0  $\mu\text{g/ml}$ ) hay una disminución muy marcada del IM llegando a 1.1 (Tabla 7), en este caso se ve afectada la proliferación celular ya que se retrasa la división de los linfocitos, posiblemente debido a que la colchicina influye sobre la disposición tanto de nutrientes como de la estimulación de la fitohemaglutinina y quizás sobre algunas proteínas que regulan el ciclo celular (cdc28 y ciclina B) lo que hace un poco citotóxico a este fármaco en dicha concentración (Holmén et al. 1994).

Por otro lado, con la colchicina a altas concentraciones se observa el mayor efecto en el IM de todos los tratamientos, debido a que los microtúbulos tienen mucho mayor número de sitios de unión de alta afinidad a la colchicina que a la vinblastina, además de que la colchicina puede interactuar tanto con los dímeros de tubulina libres en el citoplasma de la célula como con los de los microtúbulos y la vinblastina sólo con éstos últimos (Wilson et al. 1984), esto da como resultado que posiblemente, al unirse a los microtúbulos ya formados, impida que se unan otros dímeros de tubulina y por otro lado, cuando se une a los dímeros de tubulina libres, impide que éstos lleven a cabo la polimerización

de microtúbulos (Waters et al. 1986, Sackett 1995). En ambos casos la colchicina influye de manera directa tanto en la polimerización de los microtúbulos como en los microtúbulos ya formados, así la división celular es detenida en metafase de la mitosis, con la consecuente inhibición del ciclo celular.

El colcemid tiene un efecto parecido al de la colchicina, a partir de 0.5  $\mu\text{g/ml}$ , mientras va aumentando la concentración, va aumentando el IM y así mismo la proliferación celular, a diferencia de la colchicina, con 10  $\mu\text{g/ml}$  es más alto ya que equivale a 5.8, aunque es un compuesto estructural y funcionalmente muy similar a la colchicina se considera menos citotóxico (Waters et al. 1986, Henning et al 1988). Esto se pudo evidenciar ya que la colchicina con 10.0  $\mu\text{g/ml}$  es el más citotóxico mientras que el colcemid, por el contrario, a esta dosis es el que presenta el mayor IM (Tabla 7).

En el caso de la vinblastina ocurre lo contrario, mientras va aumentando la concentración va disminuyendo el IM, es decir, en concentraciones bajas induce mayor proliferación celular, ya que las divisiones son más rápidas, por lo tanto los ciclos celulares son muy cortos. Se observó que a bajas concentraciones (0.1  $\mu\text{g/ml}$ ), el IM es mayor aplicando la vinblastina que con la colchicina y el colcemid (Tabla 7). Esto se debe a que la vinblastina actúa selectivamente sólo en un pequeño número de sitios de unión en ambos extremos de los microtúbulos, que es donde se encuentran los sitios blanco de alta afinidad de la tubulina para vinblastina durante la metafase (Jordan et al. 1986, Jordan y Wilson 1990).

Estos resultados obtenidos en linfocitos de cerdo, concuerdan con los obtenidos por Mary Ann Jordan y Wilson (1990), quienes trabajando únicamente con vinblastina en células de bovino, mostraron que con bajas concentraciones de vinblastina, hay un ligero efecto en la organización de los microtúbulos, lo que indica que en estos casos la vinblastina no causa despolimerización de los

microtúbulos, sino que sólo detiene temporalmente la cinética de polimerización-despolimerización de los mismos, dando como resultado inhibición del ciclo celular en metafase de la mitosis, por lo que el efecto puede ser reversible (Jordan et al. 1986).

Se observa que en concentraciones altas de vinblastina (10.0  $\mu\text{g/ml}$ ), el IM disminuye hasta 1.8, disminuyendo la división celular (Tabla 7), cuando se aplican concentraciones altas de vinblastina, ésta se va enlazando a un mayor número de sitios de unión de alta afinidad en los extremos del microtúbulo causando ahora sí su despolimerización y consecuente inhibición del ciclo celular en metafase (Jordan et al. 1991). En estas concentraciones, al unirse la vinblastina a la proteína tubulina en ambos extremos del microtúbulo da como resultado el desprendimiento de los protofilamentos, formándose quizás agregados de vinblastina-tubulina, los cuales se precipitan y forman estructuras paracristalinas que no se forman con ninguno de los otros dos inhibidores mitóticos lo que hace irreversible el efecto (Himes et al. 1976, Jordan et al. 1986).

Lo anterior indica que la colchicina es menos citotóxica para la célula en 5.0  $\mu\text{g/ml}$  ya que hay mayor proliferación celular pero retrasa el ciclo celular cuando se aplican 10.0  $\mu\text{g/ml}$  por lo que es más factible que lo detenga en metafase. El colcemid es menos citotóxico en 10.0  $\mu\text{g/ml}$  pero es mejor como inhibidor en 0.5  $\mu\text{g/ml}$  y la vinblastina por su parte, es menos citotóxica en 0.1  $\mu\text{g/ml}$  pero la concentración óptima para el ciclo celular es 10.0  $\mu\text{g/ml}$  (Tabla 7).

Los resultados del IM indican la concentración adecuada para obtener mayor número de células metafásicas con cada inhibidor, para el diagnóstico de aberraciones cromosómicas, se pueden aplicar las concentraciones que sean menos citotóxicas y con mayor proliferación celular (mayor IM).

En este caso, realizando estudios citogenéticos en los cerdos, se compararon los datos de longitud de cromosomas con los de IM (Tablas 2 y 7) y se observó que con colchicina a 0.5  $\mu\text{g/ml}$  se obtienen los cromosomas más elongados, pero el IM es muy bajo, con colcemid a 10.0  $\mu\text{g/ml}$  se observan los más elongados y también un IM alto, sin embargo, se puede sugerir que la vinblastina a 0.1  $\mu\text{g/ml}$  es el mejor inhibidor mitótico, ya que es donde se obtienen los cromosomas más elongados y al mismo tiempo el IM más alto de todos los tratamientos (Fig. 10).

En la literatura se encuentran citados diferentes inhibidores mitóticos para la realización de estudios citogenéticos, además de ello, en gran diversidad de concentraciones dependiendo de la especie. En bovinos y aves es donde se han realizado más estudios citogenéticos, en el caso del cerdo así como de algunas otras especies de animales domésticos de importancia económica en México, hay muy poca información, debido a esto, es necesario comparar cual de ellos y en qué concentración da resultados óptimos tanto en la longitud de los cromosomas como en el IM.

Finalmente, el presente estudio resulta de gran importancia para introducir la práctica del diagnóstico citogenético en las granjas de cerdos, que son de gran importancia económica para nuestro país. En muchas granjas, hay pérdidas de ganado sin que los encargados de ellas sepan a qué se deben, en la actualidad se sabe ya que gran parte de las aberraciones cromosómicas, tanto estructurales como numéricas, tienen que ver con problemas como hipoplasia testicular, aspermia, ciclos estrales largos y muerte embrionaria entre otros, esto trae como consecuencia problemas en la reproducción como baja fertilidad e incluso infertilidad.

Debido a que en nuestro país no se lleva a cabo el diagnóstico y pronóstico de aberraciones cromosómicas en animales domésticos, se sugiere entonces que se realicen cariotipos como una

práctica cotidiana en las hembras, ya que de presentar aberraciones estructurales o numéricas en sus cromosomas las heredarían a toda su descendencia, de igual forma en los sementales, debido a que son cruzados con muchas hembras y heredarían las aberraciones a todas las camadas resultantes, y también a las crías para elegir desde pequeños los que pueden servir como sementales sin ningún problema cromosómico y los que presenten alteraciones destinarlos para otras funciones. Esto traería como consecuencia menos pérdida de ganado debida a aberraciones cromosómicas que incluso son hereditarias.

## CONCLUSIONES

La morfología cromosómica, en este caso determinada por el grado de condensación (longitud) de los cromosomas, depende del inhibidor mitótico y de la dosis aplicados: Con la colchicina los cromosomas más elongados se observan a concentraciones de 0.5, 1.0 y 5.0  $\mu\text{g/ml}$ , con el colcemid a 0.1 y 10.0  $\mu\text{g/ml}$  y con la vinblastina cuando se aplica la concentración más baja, es decir, 0.1  $\mu\text{g/ml}$ .

El IM nos indica el nivel de citotoxicidad que provocan en los LCC los tres inhibidores, estos tienen un efecto diferente según la dosis aplicada: Con la colchicina se estimula el IM a 5.0  $\mu\text{g/ml}$  y se vuelve citotóxico a 10.0  $\mu\text{g/ml}$ , con el colcemid el IM se estimula a 10.0  $\mu\text{g/ml}$  y se ve afectado a 0.5 y 1.0  $\mu\text{g/ml}$  aunque no al grado de la colchicina, esto hace al colcemid un inhibidor mitótico menos citotóxico que la colchicina y con la vinblastina el IM se estimula a 0.1  $\mu\text{g/ml}$  y es afectado a 10.0  $\mu\text{g/ml}$ .

De todas las concentraciones para estas tres drogas, se puede sugerir que la vinblastina a 0.1  $\mu\text{g/ml}$  es el mejor inhibidor mitótico para el diagnóstico de aberraciones cromosómicas, ya que es donde se observan los cromosomas más elongados y el IM más alto.

Resulta de gran importancia la introducción del diagnóstico y pronóstico citogenético como una práctica cotidiana primero en las granjas porcinas, que es donde se realizó el presente estudio, extendiéndola después a los demás animales domésticos.

## REFERENCIAS

- Aguilar-Parada, E., Ramos-Avila, R., García-Vela, E. y Rábago-Velasco, M. (1991). Efecto de la Vinblastina sobre la morfología cromosómica. Comparación con la Colchicina y el Colcemid. Patología. 29: 219-221.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. D. (1994). Molecular Biology of The Cell. Ed. Garland Publishing, Inc. United States of America.
- Andersen, O. y Ronne, M. (1983). Quantitation of spindle-inhibiting effects of metal compounds by chromosome length measurements. Hereditas. 98: 215-218.
- Arakaki, D. R. y Sparkes, R. S. (1963). Microtechnique for culturing leucocytes from whole blood. Cytogenetics. 2: 57-60.
- Armendares, S. S. (1968). Citogenética Humana: Normal y Patológica. Ed. Interamericana, México. pp 34-67.
- Avers, C. J. (1991). Biología Celular. Editorial Iberoamérica. México. pp 375-383, 603-621.
- Ayala, F. J. (1994). Mutaciones Cromosómicas. Genética Moderna. Ed. Fondo Educativo Interamericano. México. pp 34-67.
- Avila, J. (1990). Microtubule proteins. Ed. CRC Press, Inc. Florida. pp 122-153.
- Borisy, G. G. y Taylor, E. U. (1967). The mechanism of action of colchicine. J. Cell. Biol. 34: 525-533.
- Cortés, F. (1984). Bando de Cromosomas. Investigación y Ciencia. 97: 20-29.
- Dekel, N. (1995). Molecular Control of Meiosis. TEM. 6: 165-168.
- Denton, T. E. (1973). Fish Chromosome Methodology. Published by Charles C. Thomas Illinois USA. pp 24-31, 60-68.
- Dustin, P. (1984). Microtubules. Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp 171-201.

- Ford, C. E. y Pollock, D. L. (1980). Proceedings of the First International Conference for the Standardisation of Banded Karyotypes of Domestic Animals. Hereditas. 92: 145-161.
- Fujiwara, K. y Tilney, L. G. (1975). Substructural analysis of the microtubule and its polymorphic forms. Ann. N. Y. Acad. Sci. 253: 27-50.
- Garland, D. L. (1978). Kinetics and Mechanism of Colchicine binding to tubulin: Evidence for ligand-induced Conformational Change. Biochemistry. 17: 4266-4272.
- Hageltorn, M. y Gustavsson, I. (1973). The Q- and G- banding patterns of a t(11p, 15q) in the domestic pig. Hereditas 75: 147-151.
- Handel, M. A. (1979). Effects of colchicine on spermiogenesis in the mouse. J. Embriol. Exp. Morph. 51: 73-83.
- Hansen, M. E. (1970). Mosaicism for translocation heterozygosity in a malformed pig. Hereditas 64: 199-202.
- Henning, V. G. G., Rudd, N. L. y Hoar, D. I. (1988). Kinetochores immunofluorescence in micronuclei: A rapid method for the *in situ* detection of aneuploidy and chromosome breakage in human fibroblasts. Mutation Research. 203: 405-414.
- Himes, R. H., Kersey, R. N., Heller-Bettinger, I. y Samson, F. E. (1976). Action of the Vinca Alkaloids Vincristine, Vinblastine and Desacetyl Vinblastine Amide on Microtubules *in Vitro*. Cancer Research. 167: 171-188.
- Holmén, A., Karlsson, A. y Bratt, I. (1994). Hogstedt, B. Micronuclei and mitotic index in B-, T4- and T8- cells treated with mitomycin C and  $\gamma$ -irradiation. Mutation Research. 309: 93-99.
- Hutchison, C. y Glover, D. M. (1995). Cell Cycle Control. Oxford University Press, Inc. New York. pp 106-143.
- Jaffe, W. P. y Fechheimer, N. S. (1966). Identification of somatic avian chromosomes and their use in



development studies. XIII Congr. Mund. Avic., Moscú.

- Jordan, M. A., Margolis, R. L., Himes, R. H. y Wilson, L. (1986). Identification of a Distinct Class of Vinblastine Binding Sites on Microtubules. J. Mol. Biol. **187**: 61-73.
- Jordan, M. A. y Wilson, L. (1990). Kinetic Analysis of Tubulin Exchange at Microtubule Ends at Low Vinblastine Concentrations. Biochemistry. **29**: 2730-2739.
- Jordan, M. A., Thrower, D. y Wilson, L. (1991). Mechanism of Inhibition of Cell Proliferation by Vinca Alkaloids. Cancer Research. **51**: 2212-2222.
- Lehninger, L. A. (1985). Bioquímica. Ed. Omega. Barcelona. pp 41-46.
- Lozano, C. B. (1991). Caracterización del cariotipo del ganado bovino fértil, infértil y de fertilidad limitada. Tesis de doctorado. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Mezquita, P. J. (1987). El gen de la Histona H1. Investigación y Ciencia. **129**: 92-101.
- Murray, A. W., Szostak, W.J. (1988) Cromosomas Artificiales. Investigación y Ciencia. **136**: 26-31.
- Murray, A. W. y Kirschner, M. W. (1991). Control del ciclo celular. Investigación y Ciencia **176**: 26-33.
- Na, G. C. y Timasheff, S. N. (1982). In vitro vinblastine-induced tubulin paracrystals. J. Biol. Chem. **257**: 10387-10391.
- Olmsted, J. B. y Borisy, G. G. (1973). Microtubules. Ann. Rev. Biochem. **42**: 507-540.
- Popescu, C. P. y Bonneau, M. (1984). Reciprocal translocations in pigs. J. Hered. **75**: 448-452.
- Risley, M. S. (1989). Chromosome Structure and function. Ed. Van Nostrand Reinhold Company. New York. pp 92-102.
- Sackett, D. L. (1995). Vinca Site Agents Induce Structural Changes in Tubulin Different from and Antagonistic to Changes Induced by Colchicine Site Agents. Biochemistry. **34**: 7010-7019.
- Schmitt, H. Y Atlas, S. D. (1976). Specific Affinity Labelling of Tubulin with Bromocolchicine. J.

Mol. Biol. 102: 743-758.

- Shoffner, R. N. y Krishan, A. (1965). The karyotype of *Gallus domesticus* with evidence for a W chromosome. Genetics. 52: 474.
- Siegel, S. (1986). Estadística no Paramétrica Trillas. México. pp 143 y 215
- Somlev, B. y Hansen, M. (1970). XX/XY chimerism in leucocytes of two intersexual pigs. Hereditas. 64: 203-210.
- Trueba, R. S. (1998). Situación actual y proyecciones de la porcicultura. Rev. Desarrollo Porcícola. 48.
- Wallin, M., Friden, B. y Billger, M. (1988). Studies of the interaction of chemicals with microtubule assembly *in vitro* can be used as an assay for detection of cytotoxic chemicals and possible inducers of aneuploidy. Mutation Research. 201: 303-311.
- Waters, M., Stack, H. F., Mavourmin, K. H. y Dellarco, L. V. (1986). Genetic Activity profiles of chemicals selected from the Aneuploidy Data Base. Mutation Research. 167: 171-188.
- Warburton, D. (1980). Técnicas actuales de análisis cromosómico. Clínicas Pediátricas de Norteamérica. Ed. Interamericana. pp 777-794.
- Weisenberg, R. C., Borisy, G. G. y Taylor, E. W. (1968). The colchicine-binding protein of mammalian brain and its relation to microtubules. Biochemistry. 7 (12): 4466-4479.
- Wilson, L., Miller, H. P. y Pfeffer, T. A. (1984). Colchicine-binding activity distinguished sea urchin egg and outer doublet tubulins. J. Cell. Biol. 99: 37-41.