

ESTANDARIZACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE CULTIVO DE LINFOCITOS Y BANDEO CROMOSÓMICO EN VENADO COLA BLANCA (*OODOCOILEUS VIRGINIANUS*)

Barragán K¹, Jiménez L² y Sánchez C

Laboratorio de Citogenética
Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia
Universidad Nacional de Colombia

RESUMEN

La variación de las técnicas de cultivo de linfocitos y de bandeo cromosómico, según las especies y condiciones de laboratorio, hace que sea indispensable estandarizarlas para la especie objeto de estudio, con el fin de obtener mejores resultados. Se realizaron 71 cultivos de linfocitos de 10 venados cola blanca en cautiverio con diferentes variables para realizar la estandarización del cultivo de linfocitos (siembra y cosecha) a partir de la técnica de Morehead *et al.* (1960), adaptada a linfocitos bovinos, para la estandarización de las técnicas de bandeo cromosómico. La valoración de los protocolos se realizó mediante la evaluación del índice mitótico (IM), la eficiencia del mitógeno (EM) y la morfología más adecuada de las metafases. Se estableció que los mejores resultados se obtuvieron con un período de incubación de 70 horas, temperatura de 37,5°C y tiempo de hipotónica de 38 minutos. El resto de condiciones fueron similares a las del bovino. Con los protocolos para bandas G, C, R y NOR adaptados en el Laboratorio de Citogenética se obtuvieron buenos resultados, con algunas modificaciones.

Palabras claves: bandeo cromosómico, cultivo de linfocitos, venado cola blanca, *Odocoileus virginianus*.

STANDARDIZATION OF TECHNIQUES OF LYMPHOCYTES CULTURE AND CHROMOSOMAL BANDING IN WHITE TAILED DEER

ABSTRACT

Variations on techniques of lymphocytes cultures and chromosomal banding between different species and laboratory conditions requires that these techniques should be standardized for the species under study to obtain better results. Seventy one lymphocytes cultures obtained from ten captive white tailed deer were carried out under different variables, in order to standardize lymphocytes culture according to the methodology of Morehead *et al.* (1960) adapted to bovine lymphocytes, and to standardize the techniques of chromosomal banding according to different protocols adapted in the Cytogenetics Laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine – National University of Colombia. Validation of different protocols was made by means of evaluation of mitotic index (MI), mytogen efficacy (ME) and the

¹ Kbbarraganf@unal.edu.co

² Lmjimenezr@unal.edu.co

most adequate morphology of metaphases. It was established that the best results were obtained during an incubation period of seventy hours, temperature of 37.5°C, and hypotonic time of 38 minutes; other conditions were similar to those of bovine. Good results with some modifications were obtained with protocols to G, C, R and NOR bands, adapted in the Laboratory of Cytogenetics.

Key words: chromosomal banding, lymphocytes culture, white tailed deer, *Odocoileus virginianus*.

INTRODUCCIÓN

Los inicios de la citogenética se remontan a 1842, cuando fueron observados por primera vez los cromosomas al microscopio y se denominaron citoblastos (Eldridge, 1985). A partir de ese momento, muchos investigadores se interesaron en optimizar las técnicas para la obtención de cromosomas y descubrieron las propiedades de los reactivos que hoy en día se emplean en los cultivos de linfocitos en la mayoría de especies.

El desarrollo de las técnicas de cultivos celulares de mamíferos involucró el descubrimiento de la colchicina para detener las células en metafase (McFeely, 1990), la solución hipotónica para el hinchamiento celular y la fitohemaglutinina como mitógeno (Bueno *et al.*, 1994 en Jiménez, 2000).

Más tarde, alrededor de 1970, Pardue y Gall identificaron la heterocromatina constitutiva (Arrighi y Hsu, 1974) y se empezaron a desarrollar decenas de tratamientos de bandeos cromosómicos para describir los cromosomas y las regiones cromosómicas. De esta forma, la eucromatina se observaría con las bandas R, la heterocromatina intercalar con las G, la heterocromatina centromérica con las C y los genes del ARNr con las regiones organizadoras de nucleolos (NOR) (Jiménez, 2000).

En humanos, las técnicas de cultivo de linfocitos y bandeo cromosómico se optimizaron rápidamente y lograron desarrollar un sistema unificado de identificación de cromosomas humanos (Bergsma, 1978) y, por consiguiente, un avance en la investi-

gación de las anormalidades cromosómicas estructurales.

En algunos animales domésticos también se han establecido sistemas unificados de identificación de cromosomas, mediante un sistema internacional de nomenclatura para las bandas G y R (Di Bernardino y Hayes, 1989).

A pesar de los esfuerzos realizados por algunos autores (Correa y Sánchez, 1994; Sarria, 1998; González *et al.*, 1990; Vargas *et al.*, 2002), no se conocen a nivel citogenético la mayoría de las especies silvestres. Teniendo en cuenta que Colombia posee un total registrado de 471 especies de mamíferos (Alberico *et al.*, 2000), los estudios citogenéticos realizados en el país siguen siendo pocos en relación con el número de especies que falta por estudiar.

Para realizar caracterizaciones cromosómicas es necesario estandarizar las técnicas para la obtención de resultados adecuados. La importancia de los procesos de estandarización de los cultivos y las técnicas en citogenética veterinaria se debe a que el ciclo celular presenta variaciones dependiendo del estado fisiológico del individuo, del tejido obtenido y de la especie animal. Se debe realizar la identificación o caracterización de los parámetros que pueden ser manipulados en el cultivo, como el tiempo de incubación y la temperatura en cada especie, entre otros (Ronne, 1990, en Jiménez, 2000).

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales experimentales

Se realizó la estandarización de la técnica de cultivo de linfocitos en una muestra de diez venados cola blanca (*Odocoileus virginianus*), ocho machos y dos hembras, en cautiverio, en los zoológicos Piscilago, Jaime Duque y Santa Cruz, ubicados en el departamento de Cundinamarca (Colombia). Aunque se desconocía la procedencia de los animales, se tomaron algunos datos morfométricos que permitieron asumir que pertenecían a la subespecie *Odocoileus virginianus apurensis* (Barragán, inédito).

A cada uno se le realizó un examen clínico completo, encontrándose todos en buenas condiciones de salud. Así mismo, se llevaron registros de cada uno de los animales muestreados, consignando datos de identificación, sexo, edad aproximada, número y morfología cromosómica, y se les asignó un código que indicaba especie, procedencia y número del animal.

Restricción de los animales

Se realizó la restricción química en todos los ejemplares con una mezcla de Ketamina 3,58 mg/kg ($\pm 1,2$) y Xilazyne 0,71 mg/kg ($\pm 0,29$), por medio del uso de dardos disparados con pistola neumática Telinject®. Cuando los animales se encontraban en el plano I de la anestesia (Sánchez, 1995) se realizó su restricción física y se procedió a la toma de muestra de sangre. Los animales se manipularon preferiblemente en las horas de la mañana.

Tabla 1. Protocolo de siembra y cosecha para bovinos.

RPMI 1640	Mitógeno	SFB	Sangre	Tº incubación	Tº incubación	Cantidad Colchicina	Tº colchicina	Tº hipotónica KCL 0,075M
8 ml	PHA-P: 0,3 ml	1 ml	2 ml	38,5 ºC	67 h	0,2 ml	1 hora	30 minutos

RPMI - 1640 = Medio de cultivo, PHA - P = Fitohemaglutinina P, SFB = suero fetal bovino, Tº= temperatura, T= período.

Recolección de sangre venosa periférica

De cada uno de los individuos muestreados se extrajeron entre 5 y 12 ml de sangre venosa de la vena yugular, con agujas Vacutainer® N° 21 (figura 1), que se recolectó en tubos Vacutainer® con Liquemine® (heparina 5.000 UI/ml). Inmediatamente se colocaron en refrigeración (3-4°C) en una nevera portátil herméticamente cerrada y fueron trasladadas al Laboratorio de Citogenética de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia.



Figura 1. Toma de la muestra de sangre de un venado cola blanca.

Estandarización de la técnica de cultivo

La adaptación de la técnica se realizó a partir de la utilizada para linfocitos bovinos (Jiménez, 2000) (tabla 1).

Se realiza una breve descripción de los procesos básicos de la siembra y la cosecha realizados en este estudio en las tablas 2 y 3.

Tabla 2. Protocolo de siembra de linfocitos del Laboratorio de Citogenética de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia.

Protocolo de Siembra
1. Se coloca en un frasco de cultivo estéril 8 ml del medio de cultivo RPMI – 1640.
2. Se coloca luego 1 ml de suero fetal bovino.
3. Se coloca posteriormente 0,3 ml de mitógeno (PHG-P).
4. Se coloca 2 ml de sangre a sembrar.
5. Se homogeniza suavemente la mezcla.
6. Se marca el cultivo y se lleva a incubación.

Tabla 2. Protocolo de cosecha de linfocitos del Laboratorio de Citogenética de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia.

Protocolo de cosecha
1. Una (1) hora antes de la cosecha, se aplica 0,2 ml de colchicina.
2. El contenido del frasco del cultivo se pasa a un tubo de centrífuga cónico.
3. Se centrifuga a 1200 r.p.m durante 10 minutos y el sobrenadante se elimina.
4. Se colocan 8 ml de solución hipotónica (KCl) y se deja en la incubadora.
5. Se colocan 12 gotas de fijador carnoy y se homogeniza la mezcla.
6. Se centrifuga a 1200 r.p.m durante 10 minutos y el sobrenadante se elimina.
7. El botón celular se resuspende con golpes suaves.
8. Se adicionan 8 ml de solución carnoy y se mezcla con una pipeta.
9. Se refrigerara por 30 minutos la primera vez, luego 15 minutos y luego 10 minutos. Los pasos 6, 7, 8 y 9 se repiten 5 o 6 veces hasta que el botón celular quede limpio.
10. El botón celular se gotea sobre láminas limpias y enfriadas en congelador.
11. Secar al aire o flamear suavemente.
12. Teñir con Giemsa al 5%.

Se realizaron 71 cultivos de linfocitos modificando las condiciones tanto para la siembra como para la cosecha (tabla 4). Dependiendo de los resultados obtenidos se seleccionaban las mejores condiciones.

Tabla 4. Factores y variables para la estandarización de la técnica de cultivo de linfocitos en venado cola blanca.

Número cultivos	Factores	Variables		
19	Establecimiento del ciclo	66, 67, 68, 69, 70 y 71 horas		
10	Fitohemaglutinina P	0,3 – 0,4 – 0,5 ml	Favina 0,2 – 0,3 ml	
	Mitógenos			
10	Cantidad de sangre	0,5 – 1 – 1,5 – 2 – 2,5 ml		
8	Temperatura de incubación	37,5 – 38,5 °C		
9	Tiempo colchicina	60, 45 y 30 minutos		
15	Tiempo de la solución hipotónica Cloruro de Potasio (KCl)	25, 30, 35, 38, 40 y 45 minutos		

Estandarización de las técnicas de bandeo cromosómico

Luego de obtener las preparaciones cromosómicas se procedió a ejecutar la estandarización de cada una de las técnicas

de bandeo, sobre láminas con 7 a 55 días de envejecimiento. Se utilizaron dos protocolos distintos para cada banda, además de diferentes variaciones en cada protocolo (tabla 5).

Tabla 5. Protocolos de bandeo cromosómico que se siguieron para el venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*).

Bandeo	Número láminas	Envejecimiento	Protocolo
G	150	8-55 días a temperatura ambiente	Howell & Black, 1978 3-180 segundos de sln. de Hank's con tripsina y 45 segundos sln. de Hank's con rojo fenol
	15	2 días, 60°C / 1 hora	Ponsa, 2001 Incubación 15-30 segundos en sln. salina citratada. Tinción Wright.
C	110	8-55 días a temperatura ambiente	Sumner, 1972 1 hora en HCl 0,2N. 3-8 minutos BaOH2 e incubación por 1 hora en sln. salina citratada a 53°C.
	15	2 días, 60°C / 1 hora	Ponsa, 2001 Incubación en BaOH2 6 segundos e incubación por 5 minutos en sln. salina citratada
R	160	8-55 días a temperatura ambiente	Pai y Thomas, 1980 7 horas antes de la cosecha se añade BrDU al cultivo. 30 minutos en sln. bisBenzimide, radiación lámpara de vapor de mercurio a 52°C por 1 hora, incubar en sln. salina citratada a 56°C por 30 minutos.
N	95	8-55 días a temperatura ambiente	Howell y Black, 1978 sln. coloidal reveladora + sln. de nitrato de plata. Incubación por 80-130 segundos a 67°C + protocolo bandas G
	10	2 días, 38°C x 24 horas	Ponsa, 2001 Sln. de nitrato de plata. Incubación a 37°C por 24 horas, en cámara húmeda.

Análisis de las láminas

Se realizó el análisis de las láminas utilizando un microscopio de luz, inicialmente con bajo aumento (10X), para ubicar las mejores metafases. Posteriormente se llevó a un mayor aumento (100X). Para el análisis de la técnica del cultivo se utilizaron parámetros como el índice mitótico (IM) y la eficiencia del mitógeno (EM), aplicando las siguientes fórmulas:

$$IM = \frac{Nº \text{ metafases}}{Nº \text{ células totales}} \times 100$$

$$EM = \frac{Nº \text{ metafases} + Nº \text{ células transformadas}}{Nº \text{ células totales}} \times 100$$

Para calcularlos en cada ensayo se eligieron 10 campos por lámina y se realizó el conteo total de células transformadas (CT), células no transformadas (CNT) y metafases (M). Además, se evaluaron el número de metafases y su calidad (longitud de los cromosomas, cromátides unidas, metafases limpias). Para el análisis del bandeo cromosómico se observó que se presentara buena expresión de las bandas, sin alterar la estructura de los cromosomas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estandarización de la técnica de cultivo

Establecimiento del ciclo celular

Se realizaron 19 cultivos con las siguientes condiciones de siembra: 8 ml de medio de cultivo (RPMI-1640), 0,3 ml de Fitohemaglutinina-P, 1 ml de suero fetal bovino y

2 ml de sangre, modificando el período de incubación entre 66 y 71 horas.

El cultivo con 70 horas de incubación presentó la mayoría de características deseables: mayor IM, mayor número de metafases y mayor porcentaje de cromosomas largos.

En la figura 2 se puede encontrar un diagrama con el número de metafases, eficiencia del mitógeno e índice mitótico presentados por cada período de incubación, donde se observa mayor porcentaje de características deseables en el cultivo con 70 horas de incubación.

Mitógeno y cantidad

Se realizaron 10 cultivos con las siguientes condiciones de siembra: 8 ml de medio de cultivo (RPMI-1640), 1 ml de suero fetal bovino, 1 ml de sangre y 70 horas de incubación, variando el mitógeno empleado (Fitohemaglutinina-P o Favina) y su cantidad (0,2 a 0,5 ml).

Aunque se observó un mayor IM, una mejor EM y un mayor número de metafases en el cultivo con 0,5 ml de PHA-P, en las láminas se observaba mayor suciedad y hemaglutinación.

Con la Favina (Fa), tanto el IM, la EM y el número de metafases fueron muy bajos, aunque se presentan mejores resultados con 0,3 ml que con 0,2 ml de ésta. La cantidad de PHA-P con mejores resultados fue 0,3 ml por cada 10 ml de cultivo (tabla 6).

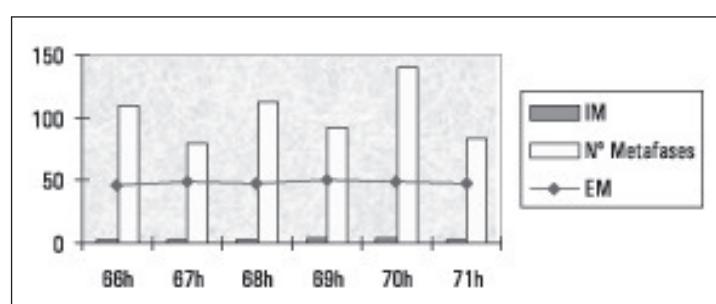


Figura 2. Período de incubación del cultivo celular con mejores resultados.

Tabla 6. Características del cultivo con diferentes mitógenos.

Número cultivos	Código	IM	EM	Nº Metafases
2	PHA-P 0,3	4,1%	55%	72
2	PHA-P 0,4	3,8%	57,1%	54
2	PHA-P 0,5	5,2%	59,48%	82
2	Fa 0,2	1,2%	42%	5
2	Fa 0,3	1,5%	44%	7

Cantidad de sangre

Se realizaron 10 cultivos con las siguientes condiciones de siembra: 8 ml de medio de cultivo (RPMI-1640), 0,3 ml de Fitohemaglutinina-P y 1 ml de suero fetal bovino, sembrando diferentes cantidades de sangre. En general, se obtuvieron buenos resultados en cuanto a IM y número de metafases (tabla 7). Sin embargo, a menor cantidad de sangre se observa menor número de células y metafases, mientras que sembrar cantidades mayores a 2 ml de sangre ocasiona dificultades en la cosecha, la solución hipotónica no se homogeniza fácilmente con el cultivo y hay mayor suciedad en la lámina. Por lo tanto, la cantidad adecuada de sangre que debe ser utilizada para el cultivo de linfocitos del venado cola blanca es de 2 ml.

Tabla 7. Características del cultivo con diferentes cantidades de sangre.

Número cultivos	Código Vol. Sangre	IM	EM	Nº Metafases
2	Ven 0,5	4,4%	48%	75
2	Ven 1	4,7%	49%	80
2	Ven 1,5	5,0%	49%	118
2	Ven 2	5,1%	50%	132
2	Ven 2,5	5,1%	51%	137

Temperatura de incubación

Se realizaron 8 cultivos con las siguientes condiciones de siembra: 8 ml de medio

de cultivo (RPMI-1640), 0,3 ml de Fitohemaglutinina-P, 1 ml de suero fetal bovino y 2 ml de sangre, modificando la temperatura de incubación. Se obtuvo un mayor IM en los cultivos incubados a 37,5°C en comparación a los de 38,5°C; además, presentaron un mayor porcentaje de cromosomas largos (tabla 8).

Tabla 8. Características del cultivo con diferentes temperaturas de incubación.

Número cultivos	Código	IM*	EM**	Nº Metafases	Crom. cortos	Crom. largos
4	38,5°C	3,9%	48%	99	81%	19%
4	37,5°C	4,6%	51%	162	69,8%	30,2%

Se observó que con los cultivos incubados a una temperatura menor (37,5°C) a la corporal del venado cola blanca (38,5-39,5°C) se obtienen mejores resultados, lo que no concuerda con lo reportado por Verma and Babu (1989), que afirman que la temperatura de incubación de los cultivos debe ser similar a la temperatura corporal de los individuos objeto de estudio.

Tiempo de solución hipotónica

Se realizaron 15 cultivos con las siguientes condiciones de siembra: 8 ml de medio de cultivo (RPMI-1640), 0,3 ml de Fitohemaglutinina-P, 1 ml de suero fetal bovino y 2 ml de sangre, con variaciones en el tiempo de acción de la solución hipotónica (KCL 0,075M).

Se observó un gran porcentaje de metafases incluidas dentro del citoplasma celular dificultando su análisis. Con 40 y 45 minutos de acción de la KCl, gran parte de las metafases se mezclaban y algunas presentaban pérdida de algunos cromosomas (incompletas).

El tiempo ideal fue de 38 minutos, tiempo con el que la mayoría de las metafases estaban completas y no tenían residuos de citoplasma.

Tiempo de colchicina

Se realizaron 9 cultivos con las siguientes condiciones de siembra: 8 ml de medio de cultivo (RPMI-1640), 0,3 ml de Fitohemaglutinina-P, 1 ml de suero fetal bovino y 2 ml de sangre, cambiando únicamente los tiempos de acción de la colchicina.

El mejor IM y la mayoría de características metafásicas deseables se encuentran en el cultivo con 1 hora de colchicina. Se observó en los cultivos con 45 y 30 minutos de colchicina una alta proporción de cromosomas con cromátides cortas y separadas, lo que no es conveniente para el bandeo cromosómico, porque la condensación de las cromátides no permite la buena expresión de éste y dificulta el análisis (tabla 9).

Tabla 9. Características del cultivo con diferentes tiempos de colchicina.

Número cultivos	Código	IM	EM	Nº Metafases	Crom. cortos	Crom. largos
3	30 min	3,8%	44%	61	86,2%	13,8%
3	45 min	3,6%	43%	79	96%	4%
3	1 h	4,0%	45%	94	74%	25%

Cultivo con mejores resultados

El protocolo de siembra y cosecha con mejores resultados se observa en la tabla 10. Con este protocolo se pueden obtener altos IM y EM, además de un alto número y una buena calidad de metafases, que permiten realizar adecuados análisis de la morfología cromosómica en el venado cola blanca.

En la figura 3 se pueden ver dos metafases obtenidas con el protocolo de siembra y cosecha estandarizado, donde se observan cromosomas largos y con cromátides unidas, que los hace convenientes para el conteo de cromosomas y adecuados para las técnicas de bandas.

Estandarización Técnicas de bandeo cromosómico

Las técnicas adaptadas en el Laboratorio de Citogenética de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia (Sánchez *et al.*, 1997; Jiménez, 2000), para el bandeo cromosómico G (Howell and Black, 1978), R (Pai and Thomas, 1980), C (Sumner, 1972)

Tabla 10. Protocolo de siembra y cosecha con mejores resultados para venado cola blanca.

RPMI 1640	Mitógeno	SFB	Sangre	Tº incubación	T incubación	Cantidad Colchicina	T colchicina	T hipotónica (KCL 37,5°C)
8 ml	PHA-P: 0,3 ml	1 ml	2 ml	37,5 °C	70 h	0,2 ml	1 hora	38 minutos

RPMI-1640 = Medio de cultivo, PHA - P= Fitohemaglutinina P, SFB = suero fetal bovino, Tº= temperatura, T= período.

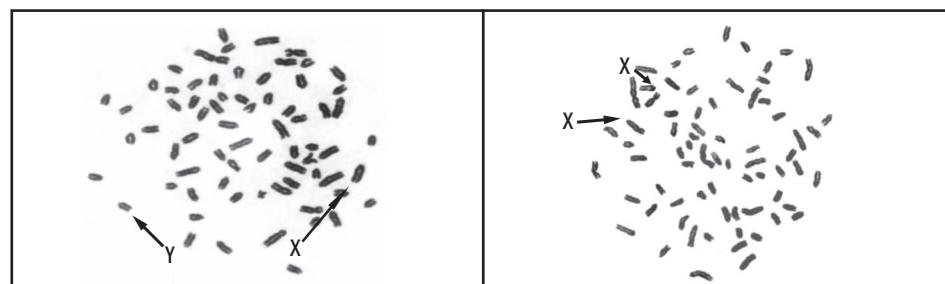


Figura 3. Metafases con tinción convencional Giemsa con características cromosómicas convenientes para el análisis. Izquierda, macho, y derecha, hembra. Las flechas señalan los cromosomas sexuales (XY y XX).

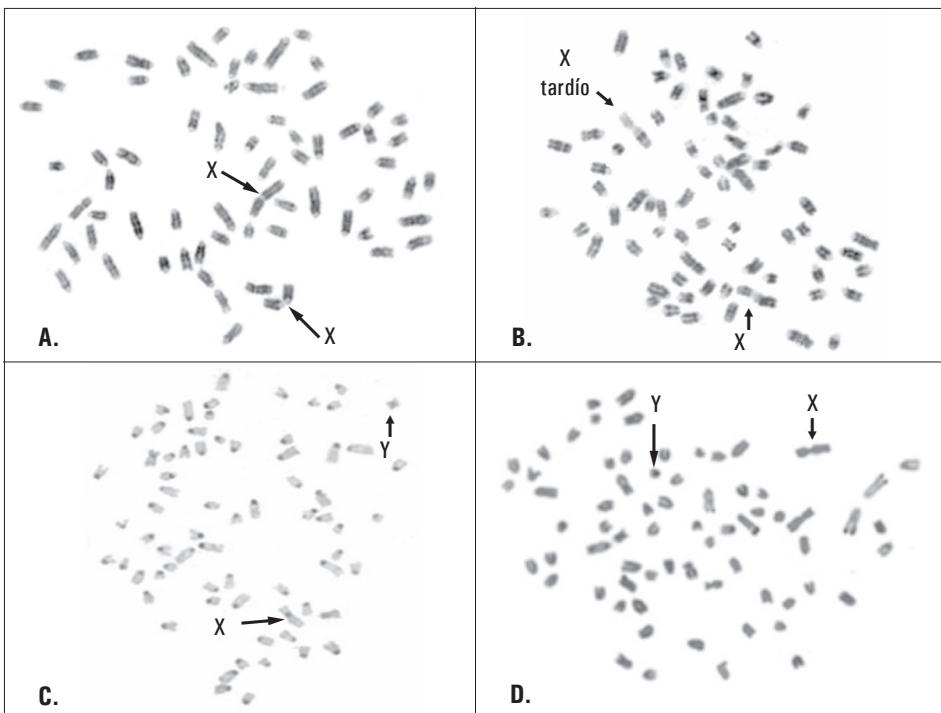


Figura 4. Metafases con bandeo cromosómico. A: bandas G (Howell y Black, 1978), B: bandas R (Pai y Thomas, 1980), C: bandas C (Sumner, 1972) y D: bandas NOR (Howell y Black, 1978). Las flechas señalan los cromosomas sexuales (XX y XY).

y NOR (Howell y Black, 1978), con algunas modificaciones dependiendo del tiempo de la maduración de las láminas, dieron buenos resultados.

Con los protocolos propuestos por Ponsa (2001) los resultados fueron negativos, porque el bandeo no se presentó en los cromosomas.

En la figura 4 se pueden observar 4 metafases con bandeo cromosómico GTG, RBG, CBG y NOR-GTG, respectivamente, con las modificaciones realizadas en este estudio.

Bandas GTG

El bandeo G con láminas con un tiempo de maduración de 7 a 55 días utilizando una tripsina recién preparada puede mostrarse utilizando el protocolo propuesto por Howell y Black (1978), con un tiempo de 3

a 9 segundos de la solución de Hank's con tripsina y posteriormente 45-50 segundos de la solución de Hank's con rojo fenol (tabla 11).

Tabla 11. Tiempo de tripsina necesario para expresión de bandeo G con láminas de diferente tiempo de maduración.

Tiempo de maduración de la lámina	Tiempo con solución de Hank's con tripsina
7-20 días	3-4 segundos
20-35 días	5-7 segundos
35-55 días	8-9 segundos

El tiempo necesario de tripsina para que se presenten cromosomas con bandeo es directamente proporcional al tiempo de envejecimiento que tenga la lámina y/o al tiempo de preparación que tenga la tripsina.

Para realizar bandas G con láminas que han sido previamente teñidas con tinción convencional Giemsa se deben utilizar tiempos entre 15 y 30 minutos con tripsina para que se muestren adecuados patrones de bandeo en los cromosomas.

Bandas C BG

El protocolo de Sumner (1972) bandeó cromosomas en láminas envejecidas de 7 a 55 días con 3 a 6 minutos de BaOH₂ y con un período de incubación de 1 hora a 53°C en solución salina citratada (tabla 12).

La temperatura de la solución salina citratada y el tiempo en hidróxido de bario son los factores críticos más importantes a tener en cuenta en la calidad de las bandas C; la alta temperatura ocasiona hinchamiento en los cromosomas y desvanecimiento de las bandas, mientras que un período prolongado en hidróxido de bario ocasiona el deterioro de los cromosomas.

Tabla 12. Protocolo para bandas C Sumner (1972) dependiendo del tiempo de maduración de la lámina.

Tiempo de HCl 0,2 N	Tiempo de maduración de la lámina	Tiempo en hidróxido de bario a 56°C	Tiempo en solución salina citratada a 53°C*
1 hora a temperatura ambiente	7-15 días	3 minutos	
	15-25 días	4 minutos	1 hora
	25-40 días	5 minutos	
	40-55 días	6 minutos	

*La temperatura de incubación en solución salina citratada puede disminuirse 4 o 5°C si los cromosomas se observan muy hinchados.

Tabla 13. Protocolo de Pai y Thomas (1980).

Tiempo de bisBenzimide (Hoescht 33258)	Radiación lámpara de mercurio de 100 watt	Tiempo de solución salina citratada
30 minutos a temperatura ambiente	1 hora a 52°C + buffer McIlvaine pH 6,85	30 minutos a 56°C Bandas NOR - GTG

Tabla 14. Tiempo de incubación con nitrato de plata necesario para expresión de bandeo NOR con láminas de diferente tiempo de maduración.

Tiempo de maduración de la lámina	Incubación a 68°C
7-20 días	120 segundos
20-35 días	125 segundos
35-55 días	135 segundos

Al aplicar el protocolo de bandas G no se obtuvieron resultados positivos al trabajar con un tiempo de exposición de 12, 22 y 50 segundos de tripsina; lo anterior puede deberse a una sobretinción de plata que bloquea la aparición de las bandas G, como lo afirman Verma y Babu (1989). Tal vez el ensayo de menor tiempo de incubación a mayor temperatura, o viceversa, pueda permitir la obtención de resultados positivos en la expresión de las bandas secuenciales NOR - GTG.

CONCLUSIONES

A partir del protocolo de cultivo de linfocitos bovinos estandarizado utilizado por el Laboratorio de Citogenética de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia, con algunas variaciones en temperatura, tiempo de incubación y tiempo de solución hipotónica, se pudieron obtener buenos IM, EM y una alta cantidad y calidad de metafases para el análisis.

Probablemente, debido a la relación entre los cérvidos y los bóvidos, por pertenecer al mismo infraorden (Pecora), los cromosomas de ambos géneros tienen similitudes que influyen para que las técnicas de cultivo para la obtención de linfocitos y de bandeo cromosómico sean similares.

Para obtener mejores bandeos cromosómicos es importante tener buenos cultivos con excelentes resultados manifestados en metafases completas y cromosomas adecuados (largos y con cromátides unidas).

Se deben manejar láminas con un tiempo de envejecimiento similar o igual para que las condiciones de las variables de la técnica de bandeo también lo sean.

Los protocolos de bandeo cromosómico deben adaptarse a las condiciones de cada laboratorio y al tiempo de envejecimiento de las láminas.

AGRADECIMIENTOS

A la doctora Connie Stelle, por su ayuda en la primera fase del laboratorio. Al profesor Hugo López, coordinador del Grupo en Conservación y Manejo de Vida Silvestre, por el apoyo económico a través del proyecto DI00C1054. A las Doctoras Carolina Falla y Haydy Monsalve, por su colaboración y apoyo en la restricción de los animales del estudio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alberico M, Cadena A, Hernández J y Muñoz Y. Mamíferos (Synapsida:Theria) de Colombia. Biota colombiana. 1: 58; 62, 2000.
2. Arrighi FE and Hsu TC. Staining constitutive heterochromatin and giemsa crossbands of mammalian chromosomes. Human Chromosome Methodology. Academic press. New York, 1974.
3. Bergsma D. An international system for human cytogenetic nomenclature (1978). Iscn. Cytogenetic cell genetics, 4: 309-404, 1978.
4. Correa F y Sánchez C. Estudio citogenético del chigüiro (*Hydrochoerus hydrochaeris hydrochaeris*) descripciones preliminares. Tesis de pregrado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Bogotá, 1994.
5. Di Bernardino D and Hayes H. International system for cytogenetic nomenclature of domestic animals. Iscnda. Cytogenetics and cell genetics, 53: 65-79, 1989
6. Eldridge FE. Cytogenetics of Livestock. Avi Publishing Company, 1985.
7. González J, Bueno M y Forero J. Caracterización cromosómica de dos especies ícticas nativas; guapucha (*Grundulus bogotensis*) y capitán (*Eremophilus mutisii*) de la Sabana de Bogotá. Acta biológica colombiana, 7: 45-59, 1990.
8. Howell WM and Black DA. A rapid technique for producing silver - stained Nucleolus Organizer Regions and tripsin - giemsa bands

- on human chromosomes. Human genetics, 43: 53-56, 1978.
9. Jiménez L. La citogenética en medicina veterinaria. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Bogotá. pp. 13-120, 2002.
 10. McFeely RA. Domestic animal cytogenetics. Advances in veterinary science and comparative medicine, 34: 131-167, 1990.
 11. Moorehead PS, Nowell PC, Melman W, Batipps D and Hungerford D. Chromosomal preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. Experimental cell Research, 20: 613-616, 1960.
 12. Pai GS and Thomas GH. A new r-banding technique in clinical cytogenetics. Human Genetics, 54: 41-45, 1980.
 13. Ponsa M. Tinción secuencial uniforme bandas G-bandas C. Memorias del curso teórico-práctico: citogenética de mamíferos y conservación de especies. Universidad Nacional de Colombia y Universidad Autónoma de Barcelona. Colombia. 5 p., 2001.
 14. Sánchez G. Drogas depresoras en Medicina Veterinaria. Fondo Nacional Universitario. Santafé de Bogotá D.C. pp. 33-41, 1995.
 15. Sánchez C, Correa M, Umaña J y Jiménez L. Estudio citogenético del chigüiro (*Hydrochaeris hydrochaeris hydrochaeris*). Memorias IV Encuentro Nacional de Investigadores de las Ciencias Pecuarias (ENICIP). Revista colombiana de ciencias pecuarias, 1997.
 16. Sarria J. Estudio citogenético del tapir de selva (*Tapirus terrestris*) en algunos zoológicos de Colombia: descripciones preliminares. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Bogotá, 1998.
 17. Sumner AT. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Experimental Cell Research, 75: 304-306, 1972.
 18. Vargas D, Jiménez L y Sánchez C. Evaluación de técnicas para obtención de cromosomas en aves de la familia *Psittacidae*. Memorias. Primer Simposio de Genética de Aves Neotropicales. 16 y 17 de mayo. Brasil, 2002.
 19. Verma R and Babu A. Human chromosomes. Manual of Basic Techniques. Pergamon Press, 1989.