



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

Grao en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

**Obtención de metafases en especies animais e
vegetales**

Obtención de metafases en especies animais e vexetais

Metaphase obtention in animal and plant species

Catalina Antonia López López

Curso: 2022 – 2023

Convocatoria: Junio

Director/a 1: Ana María González Tizón
Director/a 2: Andrés Martínez-Lage

Índice

Resumen	5
Palabras clave	5
Introducción	7
Objetivos	10
Material y métodos	11
Obtención de cromosomas metafásicos de <i>Mytilus galloprovincialis</i> Lamarck, 1819	11
Obtención de cromosomas metafásicos de <i>Palaemon elegans</i> Rathke, 1837	12
Obtención de cromosomas metafásicos de <i>Lens culinaris</i> Medik 1787 y <i>Allium cepa</i> L. 1753.....	13
Obtención de cromosomas metafásicos de <i>Homo sapiens</i> L. 1758 y <i>Canis familiaris</i> L. 1758	14
Obtención de bandas G en cromosomas de <i>H. sapiens</i>	16
Resultados	17
Obtención de cromosomas metafásicos de <i>Mytilus galloprovincialis</i> y <i>Palaemon elegans</i>	17
Obtención de cromosomas metafásicos de <i>Lens culinaris</i> y <i>Allium cepa</i>	17
Obtención de cromosomas metafásicos de <i>Homo sapiens</i> y <i>Canis</i> <i>familiaris</i>	18
Obtención de bandas G en cromosomas de <i>H. sapiens</i>	20
Discusión	20
Conclusiones	23
Bibliografía	25

Resumen

La citogenética es el estudio de la morfología, la estructura y el funcionamiento de los cromosomas. En el transcurso de poco más de 100 años, ha nacido y se ha desarrollado hasta convertirse en una de las herramientas más versátiles de la genómica, gracias al perfeccionamiento de técnicas cada vez más selectivas y refinadas. En este trabajo, se obtuvieron cromosomas metafásicos de varias especies: *Palaemon elegans*, *Mytilus galloprovincialis*, *Lens culinaris*, *Allium cepa*, *Canis familiaris* y *Homo sapiens*. Después, se puso en práctica el bandeo G en los cromosomas de *H. sapiens*. Debido a la variedad de especies, con cada una se llevaron a cabo protocolos específicos de obtención de cromosomas metafásicos. Los resultados obtenidos fueron después contrastados con la literatura existente respecto a cada una de las especies utilizadas.

Abstract

Cytogenetics is the study of the morphology, the structure and the functioning of chromosomes. In the course of slightly more than 100 years, it has been born and developed into one of the most versatile tools in the field of genomics, thanks to the perfecting of continuously more selective and refined techniques. In this project, metaphase chromosomes of several species have been obtained: *Palaemon elegans*, *Mytilus galloprovincialis*, *Lens culinaris*, *Allium cepa*, *Canis familiaris* and *Homo sapiens*. Afterwards, G banding was carried out on *H. sapiens* chromosomes. Due to the high variety of species, specific protocols of chromosome obtention were used in each case. The results of this project were then contrasted with existing literature about each of the selected species.

Palabras clave

citogenética, bandeo cromosómico,

Introducción

Los cromosomas son estructuras altamente organizadas que contienen la información genética nuclear necesaria para que el organismo funcione y se desarrolle por completo. Su nombre significa cuerpo (*soma*) de color (*chromo*) en griego, debido a lo fácilmente que se colorean con determinados compuestos. Los cromosomas comprenden tanto el ADN como las proteínas asociadas, histonas y no histonas, y, generalmente, sólo se pueden visualizar en los momentos de la división celular. Cada especie cuenta con un cariotipo específico, el conjunto completo de sus cromosomas, y las alteraciones cromosómicas pueden llevar a presentar enfermedades o incluso ser letales en algunos casos (Qaisar *et al.*, 2017).

La primera vez que los cromosomas fueron observados fue en 1842, cuando Carl von Nägeli estudiaba células madre del polen de *Tradescantia sp. L.*, 1753. Unos años después, Arnold (1879), Flemming (1882) y Hansemann (1890) fueron los primeros en conseguir ver cromosomas humanos en mitosis (Riegel, 2014). Inicialmente, Flemming llamó a las estructuras filamentosas que vio “cromatina”, pero en 1888 Waldeyer-Hartz las renombró “cromosomas”.

En la década de 1880, Theodor Boveri logró demostrar que estas estructuras eran esenciales para el desarrollo del individuo, lo que despertó el interés de muchos citólogos y llevó al desarrollo de la teoría de la herencia cromosómica en 1902, postulada independientemente por Boveri y Sutton. Boveri realizó una serie de experimentos cruzando especies de erizos de mar que le llevaron a concluir que todos los cromosomas debían estar presentes para un correcto desarrollo embrionario y que el núcleo controlaba este desarrollo.

Durante mucho tiempo, la observación de los cromosomas sólo fue posible gracias a la división espontánea de células, pero en 1955 Eagle desarrolló un medio de cultivo específico (con aminoácidos esenciales universales), o medio esencial mínimo (MEM), que promovía la división celular y por lo tanto facilitó mucho el análisis citogenético. Los primeros citogenéticos empezaron sus

estudios con vegetales, y por ello la mayoría de aquellos considerados fundadores de la citogenética humana eran botánicos (Balajee & Hande, 2018; Liehr & Weise, 2017; Riegel, 2014).

Moorhead *et al.* (1960) desarrollaron un nuevo método de cultivo celular que acumulaba las células en división gracias al uso de colchicina, que detiene la división celular en la metafase. Ese mismo año, Peter Nowell averiguó que la fitohemaglutinina era un agente mitogénico, o estimulador de la mitosis, por lo que facilitaba el trabajo con células de la sangre periférica. Ambos descubrimientos impulsaron aún más el desarrollo de la citogenética.

Con el diseño de técnicas cada vez más veloces y específicas, la citogenética ha evolucionado de una ciencia básica y meramente descriptiva a una herramienta útil en una gran multitud de campos: estudios evolutivos, diagnóstico de determinadas enfermedades pre y postnatalmente, estudios ecológicos y toxicológicos, optimización del ganado y de los cultivos agrícolas, seguimiento de la salud de poblaciones, etc.

En el ámbito clínico, un gran número de anomalías cromosómicas han sido caracterizadas desde la primera observación de la trisomía en el par 21, presente en el Síndrome de Down, por Lejeune *et al.* (1929). Estos descubrimientos fueron posibles gracias al desarrollo de diferentes técnicas de tinción que, al ser pensadas principalmente para el genoma humano, han permitido estudiar a esta especie más que a cualquier otra (Riegel, 2014).

Estas técnicas de “bandeo cromosómico” consisten en la tinción diferencial de regiones específicas del cromosoma, utilizadas tanto para realizar y comparar los cariotipos de las especies como para detectar anomalías en los mismos.

Los primeros protocolos de bandeo fueron desarrollados entre 1960 y 1970, como las bandas Q obtenidas por Caspersson *et al.* (1969) al intercalar quinacrina en el ADN para marcar regiones ricas en bases AT, o las bandas T, obtenidas por Dutrillaux (1973) y que marcan las regiones terminales de los cromosomas gracias al naranja de acridina. Las bandas G, las más utilizadas y

sencillas, se obtienen tiñendo los cromosomas con colorante Giemsa, pero también son comunes las bandas C, que tiñen específicamente la heterocromatina constitutiva. La principal función de estas bandas es obtener cariotipos e identificar anomalías en estos. Las técnicas de hibridación *in situ* fluorescente (*FISH*) fueron desarrolladas más tarde, permitiendo localizar secuencias de ADN determinadas dentro del cromosoma gracias a sondas específicas para esas secuencias. La *FISH* puede utilizarse también para varias regiones de distintas composiciones a la vez, en un solo cromosoma o en todo el genoma, resultando en bandas distintas, lo que las hace muy versátiles (Balajee & Hande, 2018).

De acuerdo con Liehr & Weise (2017), podemos dividir la historia de la citogenética humana en tres periodos principales: periodo pre-bandeo, periodo de bandeo puro, y finalmente el periodo de la citogenética molecular. El periodo pre-bandeo abarcaría hasta 1959, cuando se identificó la primera anomalía cromosómica hereditaria, la trisomía en el par 21 que se presenta en el Síndrome de Down. La etapa de bandeo puro duraría hasta 1986, cuando los primeros experimentos citogenéticos moleculares con cromosomas humanos empezaron a realizarse. En la actualidad, nos encontraríamos en la era de la citogenética molecular: el análisis molecular de la información genética humana con el fin de localizar aberraciones cromosómicas (numéricas o estructurales) que puedan ser dañinas para las personas que las presentan (Herrington, 1994).

Objetivos

Este trabajo tiene la finalidad de obtener cromosomas metafásicos de distintas especies para crear una colección con fin divulgativo y docente, así como desarrollar cultivos celulares y técnicas de bandeo en especies animales y vegetales. Para ello, se realizarán:

- Cultivos celulares de sangre periférica de *Homo sapiens* L., 1758 y *Canis familiaris* L., 1758
- Cultivos celulares de tejido radicular de *Lens culinaris* Medik 1787 y *Allium cepa* L., 1753
- Captura y aclimatación de individuos de las especies *Palaemon elegans* Rathke, 1837 y *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819, así como extracción de tejidos para su cultivo celular.
- Tinción de cromosomas metafásicos humanas mediante bandeo G.

Material y métodos

Obtención de cromosomas metafásicos de *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819

La primera especie utilizada fue *Mytilus galloprovincialis*, de la familia *Mytilidae*. El primer estudio sobre el cariotipo de *M. galloprovincialis* fue publicado por Thiriot-Qiévereux (1984), y como en el caso de otros bivalvos, la mayor parte de estudios genéticos se limitaron mucho tiempo a descripciones morfológicas de sus cromosomas, principalmente el tamaño y la forma de estos.

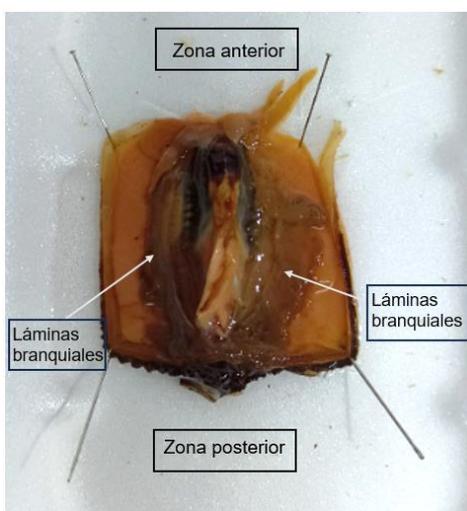


Figura 1- Fotografía de ejemplar de *M. galloprovincialis* preparado para disección, tomada por la autora.

Los individuos fueron recogidos en la playa de Regueiro (Bergondo) durante la marea baja (43'3321410, -8'2196349). En el laboratorio, fueron mantenidos vivos durante 10 días en un tanque y alimentados mediante una bomba programable, con una suspensión de microalgas de acuerdo con Martínez-Lage *et al.* (1997). Este periodo de aclimatación fue necesario para evitar la ralentización de la actividad celular de los individuos debido al estrés por el cambio de ambiente.

Después se añadió al agua colchicina al 0,005% durante 8 h. Las branquias fueron entonces diseccionadas (fig. 1) y se realizaron dos choques hipotónicos de 8 minutos con KCl 0,56% (los cuales facilitan el acceso al núcleo y las metafases al disgregar la membrana plasmática) seguidos de 4 fijaciones en carnoy (etanol/ácido acético glacial 3:1) a 4 °C, las dos primeras de 10 minutos y las dos siguientes de 20.

Para la dilaceración, las branquias se sumergieron y agitaron en agua acetilada al 45%. Ésta se limpió entonces de los restos de tejido más grandes y se llevó a un portaobjetos, apoyado en una placa calefactora a 43 °C para facilitar la

fijación. Tras unos segundos, la suspensión celular se reabsorbió a la pipeta Pasteur, para que las células quedasen en la periferia de la gota.

Para su visualización en el microscopio, las muestras fueron teñidas con 64 μ L de medio de montar Vectashield (Vector Laboratories) con marcador fluorescente DAPI, y se utilizó un microscopio de fluorescencia con cámara Nikon Fx-35DX, conectado al programa NIS-Elements.

Obtención de cromosomas metafásicos de *Palaemon elegans* Rathke, 1837

Recientemente, Torrecilla *et al.* (2017) consiguieron hacer el primer cariotipo de *Palaemon elegans*, de la familia *Palaemonidae*, mostrando que el número cromosómico de la especie era 90 cromosomas en hembras y 89 en machos.

Los camarones fueron recogidos en la playa de Regueiro (Bergondo) durante la marea baja (43'3321410, -8'2196349). Para extraer y tratar el material genético se siguió el protocolo de González-Tizón *et al.* (2013) y Torrecilla *et al.* (2017): se inyectó a los camarones con una proporción de colchicina 0,1% de entre 50 y 150 μ L, dependiendo del tamaño del individuo, en el cefalotórax, y se dejó a los individuos en cubetas de agua salada durante 4 horas. Después, se anestesió a los individuos por frío durante 10 min a -20 °C y se les seccionó la región cefálica, que contiene el material de interés.

El resto del cuerpo del camarón se sumergió en etanol 100% para su preservación, necesaria para distinguir los individuos machos de las hembras: sólo los machos tienen un apéndice en el endopodito del segundo pleópodo (fig. 2a). Las cabezas se sumergieron en agua marina hasta la extracción del tejido, que después se trató con un choque hipotónico de KCl 0,56% durante 10 minutos (fig. 2b). A continuación, se realizaron 4 fijaciones con carnoy (etanol/ácido acético glacial 3:1) de entre 10 y 20 minutos.

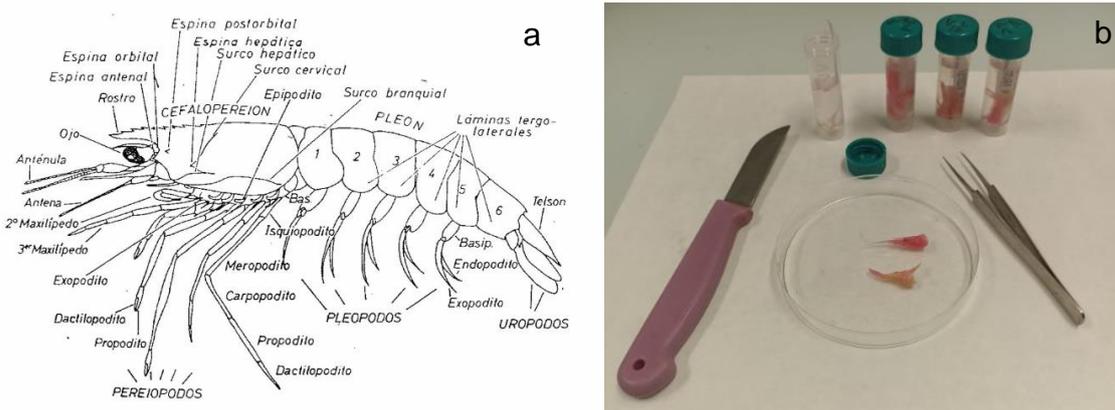


Figura 2 (a) Anatomía general de los carídeos, obtenida de la página https://www.parasitosypatogenos.com.ar/archivos/morfologia/morfologia_externa_basica_en_camarones.html Acceso: 20/06/2023 (b) Disección de *P. elegans* y conservado de la región torácica para determinación sexual.

La dilaceración del material se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo que el utilizado para las muestras de *M. galloprovincialis*.

Para la observación de las metafases, las muestras se tiñeron con 64 μ L de medio de montar Vectashield con DAPI, y se utilizó un microscopio de fluorescencia con cámara Nikon Fx-35DX, conectado al programa NIS-Elements.

Obtención de cromosomas metafásicos de *Lens culinaris* Medik 1787 y *Allium cepa* L. 1753

Lens culinaris, de la familia *Fabaceae*, fue también utilizada en el trabajo, debido a su rapidez de crecimiento y a su fácil germinación. El número cromosómico de esta especie ($2n=14$) fue determinado por Heitz (1926) y su cariotipo fue desarrollado más tarde por Bhattacharjee (1951, 1953).

Se incluyó además otra especie vegetal, *Allium cepa*, de la familia *Amaryllidaceae*. Las primeras descripciones del cariotipo de esta especie estaban limitadas a la morfología de algunos cromosomas y no incluían un número cromosómico exacto hasta que finalmente, en 1935, los experimentos de Levan (1931, 1933, 1935, 1936) y Emsweller & Jones (1935, 1938) permitieron clasificar los cromosomas de *A. cepa* en tres grupos basados en sus

constricciones primarias. Con este sistema, diseñaron un idiograma de los 16 cromosomas del cariotipo. Sin embargo, no fue hasta que Barsa (1952) utilizó por primera vez la colchicina que se pudieron medir con exactitud los tamaños de los cromosomas y clasificarlos de acuerdo con la nomenclatura estándar (Pinky *et al.*, 2017).

Para la preparación de metafases de estas dos especies se dejaron germinar los



Figura 3- Material utilizado para la tinción de raíces de L. culinaris y A. cepa con orceína

vegetales en bandejas húmedas y se cortaron los ápices de las raíces, que se sumergieron en colorante orceína hidro acética al 2% (Panreac) y se fijaron por calor durante 30 segundos (fig. 3). Después, se homogeneizaron por presión en el portaobjetos.

Las metafases de *A. cepa* fueron visualizadas con un microscopio de fluorescencia con cámara Nikon Fx-35DX, utilizando el programa NIS-Elements, mientras que para las de

L. culinaris se utilizó un microscopio óptico con cámara Amscope MU900 y el programa Amscope asociado.

Obtención de cromosomas metafásicos de *Homo sapiens* L. 1758 y *Canis familiaris* L. 1758

En 1956, Tjio y Levan establecieron que el número cromosómico de *Homo sapiens* era 46, y no 48 como se había creído. Desde entonces, la mayoría de las técnicas utilizadas en el campo de la citogenética han sido desarrolladas para el genoma humano, especialmente para la detección de anomalías cromosómicas con consecuencias dañinas.

En el caso de *Canis familiaris*, su número cromosómico fue objeto de debate, variando los valores propuestos entre 50 y 78 durante años, hasta que Hsu & Pomerat (1953) descubrieron la utilidad del tratamiento hipotónico a la hora de dispersar los cromosomas en una muestra. Gracias a esta herramienta, Awa *et al.* (1959) determinaron que el número real era 78. Finalmente, en 1996, el Comité para el Cariotipo Estandarizado del Perro publicó los cromosomas con bandas G y sus idiogramas correspondientes (Fischer *et al.*, 1996; Gustavsson, 1964; Selden *et al.*, 1975; Switonski *et al.*, 1996).

La sangre humana fue extraída por una enfermera en el laboratorio e introducida inmediatamente en tubos de cultivo, mientras que la sangre de *C. familiaris* fue obtenida de una clínica veterinaria que realizó la extracción, y luego transportada al laboratorio de la universidad.

La sangre de ambas especies fue incubada en tubos con 4,5 mL de medio de cultivo, añadiendo 0,5 mL de sangre a cada uno (fig. 4). El medio es una versión modificada del utilizado por Chaves *et al.* (2002) y Merentes (2016), compuesto por:

- 82% de RPMI 1640
- 15% de suero bovino fetal (*fetal bovine serum, FBS*)
- 1% de fitohemaglutinina
- 1% de L-glutamina 200mM 100X
- 1% de solución antibiótico-antimitótico 200mM 100X



Figura 4- Tubos de cultivo de sangre de H. sapiens y C. familiaris en estufa

La incubación fue de 72 horas a 37 °C, 3 horas antes de la finalización del cultivo se añadieron 50 µL de Colcemida de Sigma Aldrich al 10% a cada tubo (con la misma función que la colchicina). Fue necesario agitar los tubos una vez al día durante el tiempo de incubación para evitar que la sangre se precipitase y se coagulase en el fondo, lo que estropearía las muestras.

Tras la incubación, se siguió una variación del protocolo de Moorhead *et al.* (1960). Se centrifugaron los tubos (5 minutos, 1200 rpm) y se descartó el sobrenadante. Después se llevó a cabo el choque hipotónico con 3,5 mL de KCl 0,56%, seguido de una incubación de 5 minutos a 37 °C y una segunda centrifugación para después descartar el sobrenadante de nuevo. Por último, se realizaron 3 fijaciones con solución carnoy (etanol/ácido acético glacial 3:1), añadiendo 3 mL al precipitado mientras se agitaba el tubo y centrifugando después para eliminar el sobrenadante. En la tercera fijación, el carnoy se enfrió previamente a 4 °C para facilitar la extensión de la muestra.

Para ver las metafases, cada muestra se mezcló con dos gotas adicionales de solución carnoy en el portaobjetos. Una vez seca, se lavó en solución citrato salina (SSC) 2X, se tiñó con colorante Wright-Giemsa 0,4% en tampón fosfato pH 6,8 durante 2 minutos y medio y finalmente se lavó con agua destilada.

La visualización de las muestras se realizó con un microscopio óptico con cámara Amscope MU900 y el programa Amscope asociado.

Obtención de bandas G en cromosomas de *H. sapiens*

Se utilizó la tinción Wright-Giemsa para observar las bandas G, sumergiendo las muestras en 2XSSC, lavando con agua destilada y finalmente tiñéndolas con Wright-Giemsa, siguiendo una versión modificada del método de Sumner (1972). Para conseguir los mejores resultados, se probó con diferentes tiempos de lavado en tampón 2XSSC (entre 10 y 20 minutos) y de colorante Wright-Giemsa (entre 3 y 10 minutos). Algunos de los portaobjetos se trataron con ácido acético

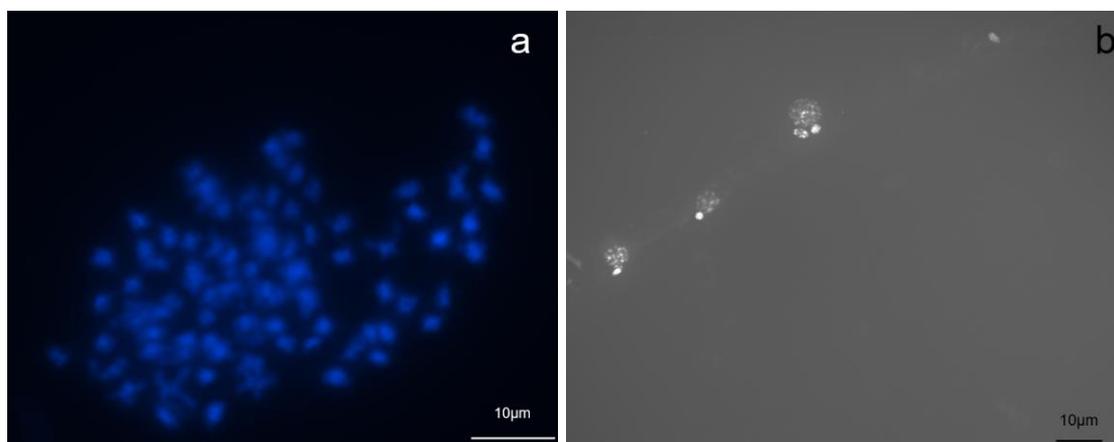
para fijar la muestra y se incubaron en estufa a 56 °C durante 24 horas antes de comenzar la fase de tinción.

La visualización de las muestras se realizó con un microscopio óptico con cámara Amscope MU900 y el programa Amscope asociado.

Resultados

Obtención de cromosomas metafásicos de *Mytilus galloprovincialis* y *Palaemon elegans*

Se visualizaron metafases de las células del cefalotórax de distintos individuos de *P. elegans*, pudiendo observar el número cromosómico de las hembras $2n=90$ tras teñir con DAPI (fig. 5a). También se obtuvieron metafases de *M. galloprovincialis*, aunque no se pudo ver el número cromosómico en este caso (fig. 5b).



*Figura 5 (a) Metafase de *P. elegans* hembra teñida con DAPI (b) Metafases de *M. galloprovincialis* teñidas con DAPI*

Obtención de cromosomas metafásicos de *Lens culinaris* y *Allium cepa*

Se obtuvieron también cromosomas metafásicos del tejido radicular de *A. cepa* y *L. culinaris*, permitiendo observar los números cromosómicos de ambos: $2n=16$ (fig. 6 a, b) y $2n=14$ (fig. 6 c, d) respectivamente.

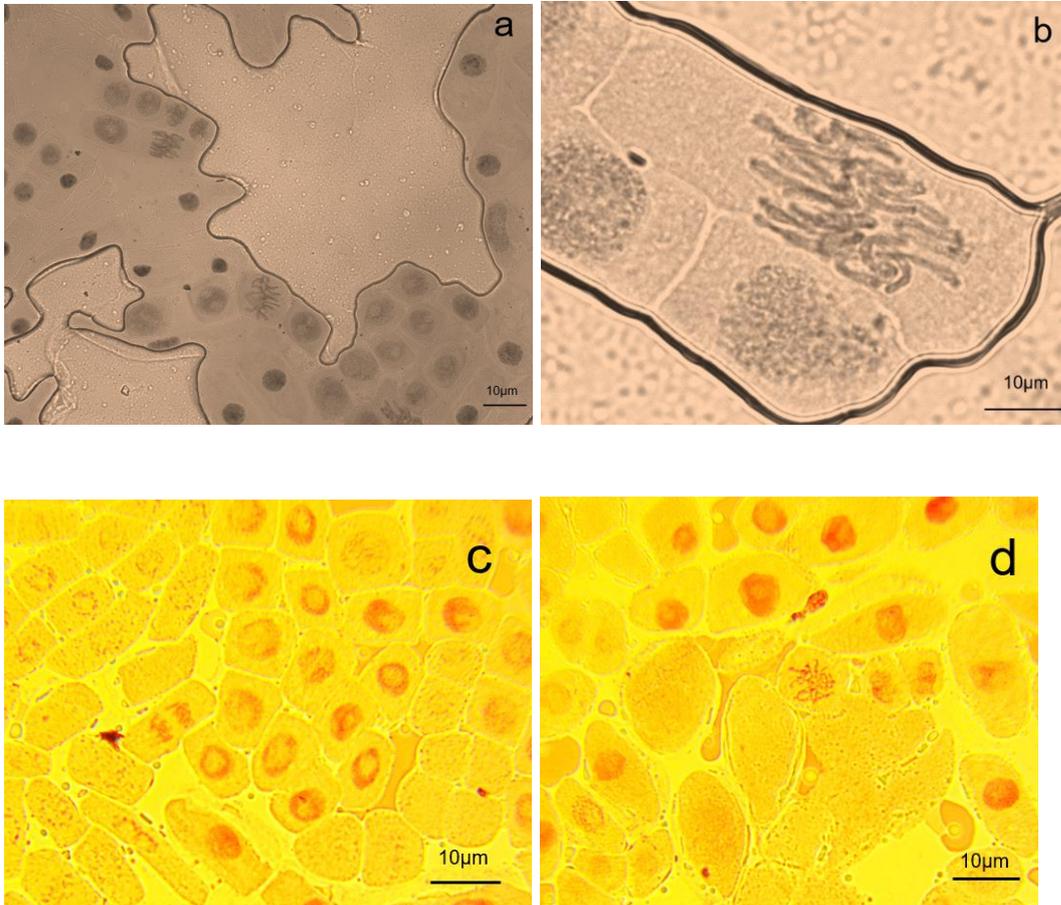


Figura 6 (a,b) Metafase de *A. cepa* teñida con orceína. (c,d) Metafase de *L. culinaris* teñida con orceína

Obtención de cromosomas metafásicos de *Homo sapiens* y *Canis familiaris*

Para *H. sapiens*, se obtuvieron muestras con metafases completas de los cuatro donantes (fig. 7 a, b, c, d), mostrando claramente el número cromosómico ($2n=46$).

Las muestras de *C. familiaris* también contenían metafases completas que permitieron ver el número cromosómico de la especie, $2n=78$ (fig. 7e).

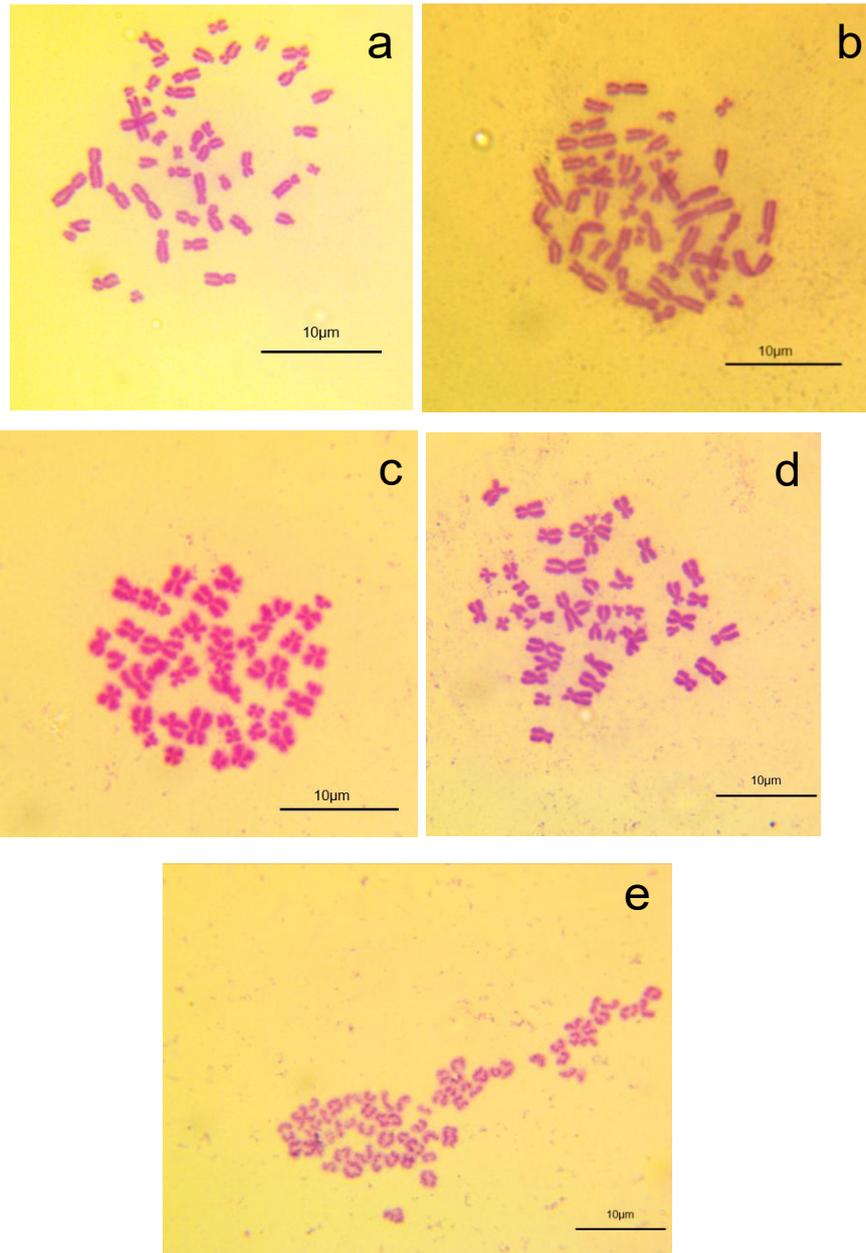


Figura 7 (a,b,c,d) Metafases de *H. sapiens* de 4 donantes distintos teñidas con Giemsa-Wright (e) Metafase de *C. familiaris* teñida con Giemsa-Wright

Obtención de bandas G en cromosomas de *H. sapiens*

También fue posible llevar a cabo el bandeo G en las metafases humanas gracias a la calidad que presentaban (fig. 8a, b).

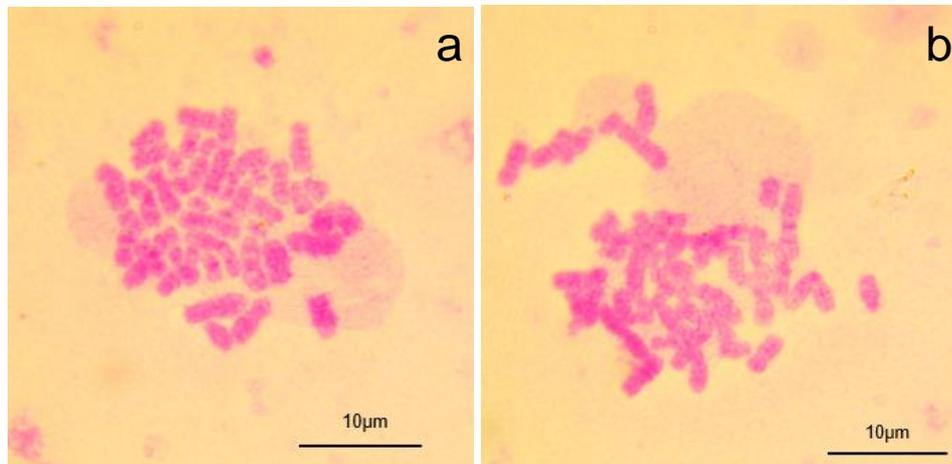


Figura 8 (a,b) Metafases de *H. sapiens* con bandas G por tratamiento con colorante Wright-Giemsa

Discusión

La primera especie con la que se trabajó, *M. galloprovincialis*, fue también la que dio resultados menos satisfactorios. El nivel de condensación de las metafases observadas era demasiado alto para poder diferenciar los cromosomas que las formaban, y por lo tanto no fue posible ver el número cromosómico de la especie. De acuerdo con Martínez-Lage *et al.* (1994, 1995), su número cromosómico es $2n=28$, y su cariotipo lo forman 6 pares de cromosomas metacéntricos y 8 de submeta/ subtlocéntricos. La gran cantidad de cromosomas del cariotipo y su pequeño tamaño son obstáculos a la hora de estudiar su genoma, ya que dificultan su observación incluso con metafases en buen estado. Encontrar estas metafases es un proceso que lleva tiempo con cualquier protocolo, y dada la complejidad del utilizado para *M. galloprovincialis*, no fue posible repetirlo en el tiempo dado.

En el caso de *P. elegans*, las metafases obtenidas fueron mucho más claras, permitiendo observar el número cromosómico de las hembras, $2n=90$ (fig. 5a).

Sin embargo, la homogeneidad morfológica de los cromosomas y su elevada cantidad impidió distinguirlos entre ellos, una circunstancia común a la mayoría de las especies del género *Palaemon*. Como se explicó anteriormente, el número cromosómico de esta especie varía según el sexo del individuo, siendo $2n=89$ para machos y $2n=90$ para hembras. Ambos sexos tienen los mismos cromosomas autosómicos: 5 parejas de cromosomas sub/metacéntricos, 4 sub/telocéntricos y 34 que no pueden ser distinguidos con facilidad debido a su homogeneidad morfológica (Torrecilla *et al.* 2017). Es en los cromosomas sexuales donde radica la diferencia: los cromosomas sexuales de los machos son tres ($X_1X_2 Y$) (dos cromosomas sexuales telocéntricos y uno más grande metacéntrico) y los de las hembras son cuatro ($X_1X_1 X_2X_2$) (dos parejas de grandes cromosomas sexuales telocéntricos).

Las siguientes especies utilizadas fueron *L. culinaris* y *A. cepa*, cuyos protocolos fueron mucho más sencillos, ya que la germinación de los individuos requirió muy poco material y tiempo. De hecho, el mayor problema en estos cultivos era que crecían demasiado rápido: el ápice de la raíz debe cortarse al poco de empezar a crecer, porque se endurece y las metafases en buenas condiciones son más escasas, por lo que generalmente sólo eran necesarios uno o dos días para tener el tejido listo para procesar.

Un problema que no se había previsto para *L. culinaris* era la variedad dentro de la especie: según el origen de la lenteja, los cromosomas se teñían mejor o peor con la orceína. Por ello, las fotografías utilizadas en este trabajo pertenecen todas a la misma variedad de lenteja, a pesar de que varias distintas fueron tratadas con el mismo protocolo, descrito en *Material y Métodos*. Esta variedad fue la única que permitió ver el número cromosómico: $2n=14$. Esto quizá esté relacionado con diferencias en las condiciones del suelo o con los químicos utilizados en las plantas hayan afectado al nivel de permeabilidad del tejido a la orceína.

A. cepa, por otro lado, no presentó esta variabilidad de tinción, y la observación de metafases en buen estado fue relativamente sencilla, permitiendo ver su número cromosómico sin complicaciones ($2n=16$). De acuerdo con Barsa (1952),

su cariotipo está conformado por 5 parejas de cromosomas metacéntricos, 2 de cromosomas submetacéntricos y 1 de cromosomas telocéntricos.

Finalmente, los protocolos utilizados para observar las metafases de *H. sapiens* y *C. familiaris* fueron los más complejos en cuanto a tiempo y recursos necesarios, pero los resultados obtenidos han sido también los más satisfactorios. En ambos casos se obtuvieron metafases en buen estado sin necesidad de múltiples intentos, y los números cromosómicos se vieron fácilmente en todas las metafases observadas: $2n=46$ en *H. sapiens* y $2n=78$ en *C. familiaris*.

En el caso de *C. familiaris*, las metafases se encontraron en buen estado, pero con un aspecto diferente a las demás muestras (tanto animales como vegetales). Es posible que esto se debiera a que se necesitase más tiempo de incubación en estufa para esta especie, lo cual no se pudo comprobar con el tiempo dado, o debido al origen de las muestras: al ser obtenidas de una clínica veterinaria, es posible que los individuos estuviesen tomando cierta medicación o teniendo determinados problemas de salud que afectaron al resultado final.

Las metafases de *H. sapiens* fueron las de mayor calidad de entre todas las obtenidas, si bien se dio una alta variabilidad en cuanto a la cantidad de metafases entre los individuos donantes. La calidad de las muestras nos permitió teñirlas para visualizar las bandas G. El protocolo era relativamente sencillo, pero fue necesario probar con diferentes tiempos de exposición al tampón SSC, al colorante Wright-Giemsa y al ácido acético (intervalos de entre 5 y 15 minutos en cada caso) para conseguir bandas en buen estado. Se observó que las metafases humanas obtenidas inicialmente eran más nítidas que el bandeo realizado posteriormente, posiblemente a causa del envejecimiento de las muestras en el tiempo entre ambos protocolos. Uno de los grupos de muestras dio los mejores resultados con diferencia, gracias a la fijación con ácido acético y al periodo de incubación. Dado que *H. sapiens* es la especie más estudiada a nivel citogenético, es comprensible que las metafases obtenidas sean las de mayor calidad, ya que los protocolos desarrollados para obtenerlas han sido

perfeccionados a lo largo de los años y los componentes necesarios están mucho más estandarizados que con otras especies.

Conclusiones

La aclimatación de los ejemplares de *P. elegans* y *M. galloprovincialis* y la extracción de su material genético fue exitosa, consiguiendo ver metafases en buen estado de *P. elegans*, así como su número cromosómico. En el caso de *M. galloprovincialis*, los cromosomas mostraron una menor nitidez, pero no se pudo buscar una solución al problema en el tiempo dado.

Los protocolos para obtener cultivos celulares de tejido radicular de *A. cepa* y *L. culinaris* fueron los más sencillos y rápidos, y en el caso de *A. cepa* dieron los resultados esperados en poco tiempo. *L. culinaris* presentó más dificultad debido a la variabilidad de absorción de la orceína dependiente de la variedad de los individuos, pero finalmente también se pudieron ver metafases en buen estado.

Finalmente, los protocolos para obtener cultivos de sangre periférica de *H. sapiens* y *C. familiaris* fueron los más complejos, pero también los más exitosos, tanto en términos de nitidez de visualización como en abundancia de metafases. A pesar del envejecimiento de las muestras de los cromosomas en el momento del bandeo, se pudieron visualizar claramente las bandas G conseguidas en las metafases de *H. sapiens*. Con más tiempo disponible, se podría comprobar si un tiempo mayor de incubación en las muestras de *C. familiaris* sería beneficioso para la visualización de las metafases obtenidas.

Conclusions

The acclimatization of specimens of *P. elegans* and *M. galloprovincialis* and the extraction of their genetic materials were successful, allowing us to observe clear metaphases for *P. elegans* as well as its chromosome number. In *M. galloprovincialis* case, chromosomes displayed less definition, but it wasn't possible to resolve the issue within the given time.

The protocols to obtain cellular cultures of root tissue in *A. cepa* and *L. culinaris* were the simplest and swiftest and, in the case of *A. cepa*, they reported the expected results within a short time. *L. culinaris* presented higher difficulty due to the variability of absorption of orcein depending on the variety of the specimen, but in the end, it was possible to observe clear metaphases as well.

Finally, the protocols to obtain peripheral blood cultures from *H. sapiens* and *C. familiaris* were the most complex, but the most successful as well, both in terms of definition and abundance of metaphases. Despite the weathering of part of the chromosomes samples by the time of banding, it was possible to clearly observe the G bands in the metaphases of *H. sapiens*. With more time available, it would be interesting to check if an extended period of time of incubation of samples of *C. familiaris* would be beneficial for the visualization of the resulting metaphases.

Bibliografía

- Awa, A., Sasaki, M., & Takayama, S. (1959). An in vitro study of the somatic chromosomes in several mammals. *Japanese journal of applied entomology and zoology*, 12, 257-265.
- Balajee, A. S., & Hande, M. P. (2018). History and evolution of cytogenetic techniques: Current and future applications in basic and clinical research. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 836, 3-12. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.08.008>
- Barsa, M. C. (1952). *A comparative study of the karyotypes of A. cepa and A. fistulosum* [Dissertation for a Master of Science]. Fordham University.
- Bhattacharjee, S. K. (1951). Karyotype analysis of *Lens esculenta* Moench. Var. *Microsperma*. *Scientific Culture*, 16, 426-427.
- Bhattacharjee, S. K. (1953). Cytogenetics of *Lens Esculenta* Moench. *International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics*, 5, 159-166. <https://doi.org/10.1080/00087114.1953.10797436>
- Caspersson, T., Zech, L., Modest, E. J., Folley, G. E., Wagh, U., & Simonsson, E. (1969). Chemical differentiation with fluorescent alkylating agents in *Vicia faba* Metaphase chromosomes. *Experimental Cell Research*, 58, 128-140. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(69\)90123-2](https://doi.org/10.1016/0014-4827(69)90123-2)
- Chaves, R., Adegá, F., Santos, S., Guedes-Pinto, H., & Heslop-Harrison, J. S. (2002). In situ hybridization and chromosome banding in mammalian species. *Cytogenetic and Genome Research*, 96, 113-116. <https://doi.org/10.1159/000063020>
- Dutrillaux, B. (1973). Nouveau système de marquage chromosomique: Les bandes T. *Cromosoma*, 41, 395-402. <https://doi.org/10.1007/BF00396497>
- Emsweller, S. L., & Jones, H. A. (1935). Meiosis in *Allium fistulosum*, *Allium cepa* and their hybrid. *Hilgardia*, 9, 277-294.
- Emsweller, S. L., & Jones, H. A. (1938). Crossing over, fragmentation and formation of a new chromosome in an *Allium* species hybrid. *Botanical Gazette*, 99, 729-772. <https://doi.org/10.2307/2471791>
- Fischer, P. E., Holmes, N. G., Dickens, H. F., Thoas, R., Bins, M. M., & Nacheva, E. P. (1996). The application of FISH techniques for physical mapping in the dog. *Mammalian Genome*, 7, 37-41. <https://doi.org/10.1007/s003359900009>
- González-Tizón, A., Rojo, V., Menini, E., Torrecilla, Z., & Martínez-Lage, A. (2013). Karyological analysis of the shrimp *Palaemon serratus* (Decapoda: Palaemonidae). *Journal of Crustacean Biology*, 33, 843-848. <https://doi.org/10.1163/1937240X-00002185>
- Gustavsson, I. (1964). The chromosome of the dog. *Hereditas*, 51, 187-189.
- Heitz, E. (1926). *Der Nachweis der Chromosomen*.
- Herrington, C. (1994). Interphase Cytogenetics: Principles—And Applications. *Journal of Histotechnology*, 17, 219-234. <https://doi.org/10.1179/his.1994.17.3.219>
- Hsu, T. C., & Pomerat, C. M. (1953). Mammalian Chromosomes *in vitro* II: A method for spreading the chromosomes in tissue culture. *Heredity*, 44, 23-30. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a106344>

- Levan, A. (1931). Cytological studies in *Allium*. *Hereditas*, 15, 347-356. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1931.tb02557.x>
- Levan, A. (1933). Cytological studies of *Allium* IV: *Allium fistulosum*. *Svensk Botanisk Tidskrift*, 27, 211-232.
- Levan, A. (1935). Cytological studies in *Allium* VI: The chromosome morphology of some diploid species of *Allium*. *Hereditas*, 20, 289-330. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1935.tb03192.x>
- Levan, A. (1936). Cytological studies of *Allium cepa* X *fistulosum*. *Hereditas*, 21, 195-214. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1936.tb03199.x>
- Liehr, T., & Weise, A. (2017). Background. En T. Liehr (Ed.), *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)* (2.^a ed., Vol. 1, pp. 1-14). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-52959-1_1
- Martínez-Lage, A., González-Tizón, A., Ausió, J., & Méndez, J. (1997). Karyotypes and Ag-NORs of the mussels *M. californianus* and *M. trossulus* from the Pacific Canadian coast. *Aquaculture*, 153, 239-249. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00028-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00028-8)
- Martínez-Lage, A., González-Tizón, A., & Méndez, J. (1994). Characterization of different chromatin types in *Mytilus galloprovincialis* L. after C-banding, fluorochrome and restriction endonuclease treatments. *Heredity*, 72, 242-249. <https://doi.org/10.1038/hdy.1994.34>
- Martínez-Lage, A., González-Tizón, A., & Méndez, J. (1995). Chromosomal markers in three species of the genus *Mytilus* (Mollusca: Bivalvia). *Heredity*, 74, Article 4. <https://doi.org/10.1038/hdy.1995.55>
- Merentes, E. (2016). *Manual de técnicas básicas de cultivo celular* (1.^a ed., Vol. 1). Universidad Central de Venezuela.
- Moorhead, P. S., Nowell, P. C., Mellman, W. J., Battips, D. M., & Hungerford, D. A. (1960). Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Experimental Cell Research*, 20(3), 613-616. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(60\)90138-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(60)90138-5)
- Pinky, M. S., Begum, K. N., & Mahbub, M. (2017). Comparative karyotype and RAPD analysis of four varieties of *Allium cepa* L. and a species of *Allium fistulosum* L. *Bangladesh Journal of Botany*, 46(1), 1-7.
- Qaisar, U., Tayyeb, A., & Bhat, T. A. (2017). Techniques of Chromosomal Studies. En T. A. Bhat & A. A. Wani (Eds.), *Chromosome Structure and Aberrations* (1.^a ed., Vol. 1, pp. 307-330). Springer India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-3673-3_14
- Riegel, M. (2014). Human molecular cytogenetics: From cells to nucleotides. *Genetics and Molecular Biology*, 37, 194-209. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572014000200006>
- Selden, J. R., Moorhead, P. S., Oehlert, M. L., & Patterson, D. F. (1975). The Giemsa banding pattern of the canine karyotype. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 15, 380-387. <https://doi.org/10.1159/000130537>
- Sumner, A. T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75, 304-306. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(72\)90558-7](https://doi.org/10.1016/0014-4827(72)90558-7)
- Switonski, M., Reimann, N., Bosma, A. A., Long, S., Bartnitzke, S., Pienkowska, A., Moreno-Milan, N. N., & Fischer, P. (1996). Report on the progress of

standardization of the G-banded canine (*Canis familiaris*) karyotype. *Chromosome Research*, 4, 306-309. <https://doi.org/10.1007/BF02263682>

Thiriot-Qiévereux, C. (1984). Chromosome analysis of three species of *Mytilus* (Bivalvia). *Marine Biology Letters*, 5, 265-273.

Torrecilla, Z., Martínez-Lage, A., Perina, A., González-Ortegón, E., & González-Tizón, A. M. (2017). Comparative cytogenetic analysis of marine *Palaemon* species reveals a X1X1X2X2/X1X2Y sex chromosome system in *Palaemon elegans*. *Frontiers in Zoology*, 14, 14-47. <https://doi.org/10.1186/s12983-017-0233-x>