

UNIVERSIDAD DE SEVILLA. FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

TECNICAS DE BANDEO EN NEMATODES PARASITOS

MEMORIA, QUE PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIATURA  
EN FARMACIA, PRESENTA:

José Moreno Cruzado



UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE FARMACIA  
BIBLIOTECA

Esta TESINA ha sido realizada en los Laboratorios del Departamento de Parasitología, de la Facultad de Farmacia de la Unirvesidad de Sevilla.

En Sevilla, a 23 de Octubre de 1985

Los directores

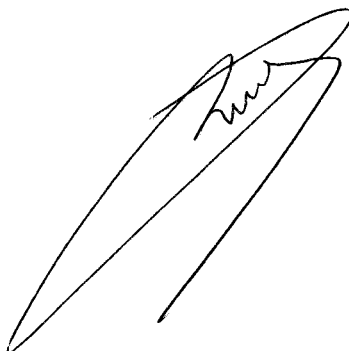
Fdo: Prof. Dr. D.

Diego Carlos Guevara Benítez  
Profesor Catedrático del  
Dpto. de Parasitología de la  
Facultad de Farmacia de la  
Universidad de Sevilla.

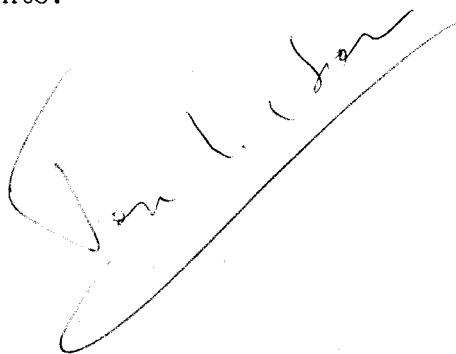


Fdo: Profra. Dra. Dña.

Cristina Cutillas Barrios  
Profesora Colaboradora del  
Dpto. de Parasitología de  
la Facultad de Farmacia de  
la Universidad de Sevilla.



JOSE MANUEL UBEDA ONTIVEROS, Director del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia, de la Universidad de Sevilla, certifica que la realización de la Tesina "Técnicas de bandeo en nematodos parásitos" de D. José Moreno Cruzado, se ha llevado a cabo en los Laboratorios de dicho departamento.

A handwritten signature in black ink, written in a cursive style. The signature is enclosed within a large, sweeping, handwritten loop that underlines the text. The signature appears to read "Jose Manuel Ubeda Ontiveros".

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento:

Al Prof. Dr. D. Diego Carlos Guevara Benitez, por permitirme la realización de la presente tesina, aceptando la dirección de la misma, comprendiendome y ayudandome en todo momento, por sus continuos aciertos y por esa dedicación que ha hecho posible la finalización de este trabajo.

A la Profra. Dra. Dña. Cristina Cutillas Barrios, sin cuya dirección y continua ayuda, siempre de forma abnegada, no hubiese sido posible la realización y finalización de esta tesina, y por la amistad recibida. Gracias Cristina.

A D. José Gutierrez, veterinario del Matadero del Sur S.A., por la colaboración prestada, de forma totalmente desinteresada, en el suministro del material parasitológico, facilitando así de forma principal la conclusión de este trabajo. Queriendo significar en su persona otros tantos veterinarios que han colaborado en la misma.

Al Prof. Dr. D. José Manuel Ubeda Ontiveros, por esa palabra de aliento siempre a tiempo, sus buenos consejos, por su interés y por su saber escuchar.

A la Profra. Dra. Dña. María luisa Murillo Taravillo, la ayuda continua demostrada durante todos estos años, por su amistad y ese saber comprenderme en cada momento.

A la Profra. Dña. Concepción Ariza Astolfi, por el buen trato que me ha dispensado y por el interes demostrado en el desarrollo de esta tesina.

Parte de los resultados de esta Tesina han sido presentados en el IV Congreso Nacional de Parasitología. Puerto de la Cruz. Tenerife. Julio de 1985.

Esta Tesina ha sido realizada como parte del Proyecto nº 2895/83 de la CAICYT.

A mis Padres

A tí, María José

A Estrella y Jesús

INDICE

	Pag.
1.- INTRODUCCION.....	1
1.1.- ESTADO ACTUAL DE LA CITOGNETICA DE NEMATODES PARASITOS...	1
1.2.- TECNICAS DE BANDEO.....	7
1.2.1.- <u>Generalidades</u> .....	7
1.2.2.- <u>En Parasitología</u> .....	11
1.2.3.- <u>En Nematoda</u> .....	11
2.- OBJETO DEL TRABAJO.....	12
3.- MATERIAL Y METODOS.....	14
3.1.- MATERIAL PARASITOLOGICO UTILIZADO.....	14
3.1.1.- <u>Dictyocaulus filaria</u> .....	14
3.1.2.- <u>Chabertia ovina</u> .....	20
3.2.- RECOGIDA DE MUESTRAS.....	22
3.3.- METODOS DE OBSERVACION NEMATOLOGICA.....	24
3.4.- METODOS CITOLOGICOS.....	25
3.4.1.- <u>Extracción de las gonadas</u> .....	25
3.4.2.- <u>Técnicas de tinción convencional</u> .....	26
3.4.3.- <u>Técnicas de bandeo propiamente dichas</u> .....	27
3.4.3.1.- Técnicas de bandeo C.....	27
3.4.3.2.- Técnicas de bandeo G.....	29
3.4.3.3.- Técnicas de bandeo N.....	31
3.4.4.- <u>Preparación de reactivos</u> .....	32
3.4.5.- <u>Obtención de resultados</u> .....	35

4.- RESULTADOS.....	36
4.1.- TECNICAS DE BANDEO.....	36
4.1.1.- <u>Técnicas de bandeo C</u> .....	36
4.1.2.- <u>Técnicas de bandeo G</u> .....	40
4.1.3.- <u>Técnicas de bandeo N</u> .....	43
4.2.- GENETICOS.....	51
4.2.1.- <u>Dictyocaulus filaria</u> .....	51
4.2.1.1.- Bandeo C.....	51
4.2.1.1.a.- Profase mitótica, hembra.....	51
4.2.1.1.b.- Metafase mitótica, macho.....	54
4.2.1.1.c.- Metafase mitótica, hembra.....	55
4.2.1.1.d.- Diacinesis.....	56
4.2.1.2.- Bandeo G.....	58
4.2.1.2.a.- Profase mitótica, macho.....	58
4.2.1.2.b.- Metafase mitótica, macho.....	59
4.2.1.2.c.- Profase mitótica, hembra.....	61
4.2.1.3.- Bandeo N.....	62
4.2.2.- <u>Chabertia ovina</u> .....	63
5.- DISCUSION.....	85
5.1.- TECNICAS DE BANDEO.....	85
5.1.1.- <u>Bandeo C</u> .....	85
5.1.2.- <u>Bandeo G</u> .....	87
5.1.3.- <u>Bandeo N</u> .....	89



5.2.- GENETICA.....	91
5.2.1.- <u>D. filaria</u> .....	91
5.2.1.1.- Bando C.....	91
5.2.1.2.- Bando G.....	96
5.2.1.3.- Bando N.....	98
5.2.2.- <u>Ch. ovina</u> .....	99
6.- CONCLUSIONES.....	101
7.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	105

## 1.- INTRODUCCION

### 1.1.- ESTADO ACTUAL DE LA CITOGENETICA DE NEMATODES PARASITOS.

Los primeros trabajos sobre genética de parásitos que se conocen datan de principios de siglo. Struckmann (1905) (60) realiza un estudio citogenético en Strongylus filaria; apuntando la posibilidad de un determinismo del sexo XY para el macho de esta especie. Los resultados los presenta en forma de esquemas o dibujos de las distintas fases del ciclo meiótico, así en el estadio de diacinesis se puede observar la formación de tétradas que dan figuras en anillo, cruz, "X" y "V".

En 1909 Boring (2) descubre un cromosoma extra que aparece repetidamente en los machos de un espécimen de Ascaris megalocephala, lo que es interpretado por otros autores como un cromosoma X desapareado que normalmente está asociado a un autosoma, y por tanto generalmente no visible.

Edwards (1910) (16) interpreta este hallazgo de Boring como la presencia de un elemento X en los cromosomas del macho de A. megalocephala, también encuentra un grupo X que consta de cinco miembros y que está presente durante la espermatogénesis de Ascaris lumbricoides.

Boveri (1911) (3) encuentra dos tipos de espermatozoides que se diferencian por un elemento X en las células sexuales formadas por los machos, tanto de generaciones de vida libre como partenogénéticas, de Angiostomun nigrovenosum.

Edwards (1911) (17) describe un caso de condición XY en Ascaris felis, que es interpretado por Boveri como una condición X, en la cual el cromosoma X está asociado a un autosoma.

Por tanto, en estos años todas las investigaciones en este campo van dirigidas a determinar la presencia o ausencia de los denominados cromosomas sexuales en los nematodos parásitos.

Walton (1923) (69) intenta clarificar la existencia o no de cromosomas múltiples o compuestos en Ascaris canis. Asimismo trata de determinar que correlación, si la hay, existe entre este fenómeno citológico y la taxonomía de los parásitos que estudia. En su trabajo estudia 16 especies distribuidas en 12 géneros, 10 subfamilias, 8 familias y 5 superfamilias del orden Nematoda. Posteriormente Walton (1959) (70) presenta una lista de más de 50 especies de nematodos en la que recoge el número haploide correspondiente a cada una de ellas y de la que saca las siguientes conclusiones:

- El denominado fenómeno de "disminución" se encuentra solamente en miembros de Ascaridata, principalmente entre los Ascaridae.
- El número de los denominados "cuerpos X" es mayor de uno solamente en Ascaridata (X puede estar compuesto de 1, 2, 5, 6 u 8 unidades).
- Hay una constancia del número total de cromosomas en varios grupos de Nematoda.

A partir de esta fecha se han realizado distintos trabajos sobre la citogenética de nematodos, si bien muchos de ellos con-

sistentes en una simple descripción del cariotipo. Salazar y col (1962) (50) describen el procedimiento para observar los cromosomas en hembra y macho de Onchocerca volvulus, concluyendo que en esta especie, y en las células germinales, el número diploide es de 4 y el haploide de 2 cromosomas.

Lejambre (1968) (31) determina que el número cromosómico de Oesophagostomun columbianum y Chabertia ovina es de  $2n=12$ ; los 6 pares de cromosomas de ambas especies aparecen similares siendo indiferenciables unos de otros en esta etapa.

Gonzales y Malmann (1970) (21) presentan las metafases mitóticas de: Ostertagia circumcincta, Nematodirus spathiger, Bunostomun flebotomun, Oesophagostomun venulosum, O. columbianum y Dictyocaulus filaria. Los machos de estas especies presentan un número diploide  $2n=11$ , mientras que las hembras examinadas (O. columbianum, O. venulosum)  $2n=12$ , no siendo posible encontrar u observar diferencias morfológicas entre los distintos cromosomas.

Dmitrieva (1977) (13) estudia los cromosomas en mitosis y gametogénesis de dos nematodos del género Dictyocaulus, describiendo el cariotipo de D. filaria y D. viviparus; asimismo, realiza dibujos de las metafase I, anafase I y metafase II de D. filaria, sugiriendo que los cromosomas de esta especie son holocinéticos, con centrómeros difusos, debido a que no aparecen formas en "V" o "S" durante la anafase.

Podgornova y col (1979) (43) aportan los cariotipos de algunas especies de nematodos pertenecientes a la familia: Trichocephalidae, Capillaridae, Systoopsidae, Dictyocaulidae, Rabdochoniidae, Setariidae y Haplonematidae.

En nuestro país es en el año 1979 cuando prácticamente se inician los estudios citogenéticos en Nematoda. Valero y Pretel (1979) (63) realizan un estudio cariológico en Marshallagia marshalli dando un número diploide  $2n=11$  para el macho y  $2n=12$  para las hembras, siendo el determinismo del sexo XO/XX. Asimismo, observa la presencia de tétradas que dan figuras en "V", en cruz y  $\emptyset$ . Hay que hacer notar la presencia de un cromosoma extra en algunas preparaciones de los machos que estos autores estudian.

Valero y col. (1982a) (64) presentan la citogenética de Gongylonema pulchrum obteniendo un número diploide  $2n=10$  tanto para el macho como para la hembra, concluyendo que el determinismo del sexo es XY/XX. Es de destacar el estudio de la oogénesis realizado en esta especie.

Valero y col. (1982b) (65) realizan un estudio citogenético de Heterakis spumosa no encontrando divisiones mitóticas en las preparaciones obtenidas a partir de individuos machos. No obstante el número cromosómico obtenido a partir de las diferentes fases de la meiosis es  $2n=9$  para el macho y  $2n=10$  para la hembra. Característico de esta especie es el cromosoma sexual que durante la diacinesis

y metafase I aparece unido a uno de los bivalentes, hecho que parece afirmar la existencia de una cierta afinidad terminal entre ellos. En las hembras tales asociaciones no han podido ser detectadas en ningún caso.

Valero y col. (1982c) (66) realizan un estudio de la gametogénesis espermatogonial de Ostertagia circumcincta, O. trifurcata y O. occidentalis. El número diploide es  $2n=11$  en los machos de las tres especies y el determinismo del sexo XO/XX.

Valero y col. (1982d) (67) estudian la meiosis en machos de Nematodiroides zembrae, parásito de Oryctolagus cuniculus ferox (L) obteniendo un número cromosómico  $2n=11$  siendo el mecanismo de determinismo del sexo XO/XX.

Valero y col. (1983) (68) desarrollan un estudio comparativo entre la citogenética de Trichuris suis y T. ovis, concluyendo del mismo que el número cromosómico para estas especies es  $2n=6$  y el mecanismo del determinismo del sexo XY/XX para ambas especies. Los machos muestran localización estricta proximal de los quiasmas, mientras que las hembras de las dos especies poseen quiasmas normales. Estas especies se diferencian por la localización del centrómero en el par mayor de cromosomas que se explica en términos de una inversión pericéntrica. En T. ovis se describen B-cromosomas.

Pretel y col. (1982) (44) determinan un número diploide  $2n=11$  en el macho de Haemonchus contortus, detectando B-cromosomas

en uno de ellos y cuyo número por núcleo varía de 2 a 5.

Pretel y Valero (1984a) (45) describen por primera vez el cariotipo de Graphidium strigosum que presenta un número cromosómico diploide  $2n=11$  en machos. El cromosoma X es un isocromosoma de tamaño gigante, siendo su meiosis normal.

Pretel y Valero (1984b) (46) estudian la citogenética de Nematodirus abnormalis que presenta un número cromosómico diploide de  $2n=13$  en los machos. El cariotipo modal incluye 11 cromosomas acrocéntricos y dos m-cromosomas.

Cutillas y col. (1985a) (9) estudian el comportamiento genético en ejemplares machos y hembras de Subulura brumpti obtenidos de gallos domésticos. Los bivalentes en diacinesis se agrupan a modo de círculo en contacto unos con otros, un par de ellos dan la típica figura en cruz, otros dos en forma de "V" y el último par muestra un quiasma subterminal. El número haploide es  $n=5$  en la hembra y para el macho  $n=5$ ,  $n=4$ .

Cutillas y col. (1985b) (10) estudian la oogénesis en Hammerschmidtella diesingi y Leydinema appendiculata observando 5 pares de cromosomas en metafase mitótica en ambas especies.

Cutillas y col. (1985c) (11) llevan a cabo un estudio citológico en machos de D. filaria. En diacinesis se observan bivalentes en cruz y en anillo abierto. La frecuencia de quiasmas es 1 localizándose la región organizadora del nucleolo en la zona terminal del cromosoma.

1.2.- TECNICAS DE BANDEO.

1.2.1.- Generalidades.

El objetivo principal de la citogenética ha sido el estudio de las bases citológicas que pudiesen explicar satisfactoriamente los fenómenos hereditarios. No obstante, hace 15 años se tropezaba aún con 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 contaban los especialistas para diferenciar claramente entre sí a los distintos pares de cromosomas homólogos que constituían el complemento diploide (Cortés, 1984) (8).

A partir de 1970, se han desarrollado nuevos métodos para la identificación de cromosomas metafásicos mitóticos, que hacen posible distinguir entre cromosomas de muy diferentes especies (Schulz y Schaeffer, 1980) (56). Las técnicas de bandeo ponen de manifiesto estructuras cromosómicas tales como el centrómero (bandeo C), Región organizadora del nucleolo (Bandeo N), cromómeros (bandeo G), etc.

La demostración de las denominadas bandas C tiene su punto de partida en el método de hibridación "in situ" de ácidos nucleicos descrito por Pardue y Gall (1970) (41) destinado a determinar la localización del ADN satélite (altamente repetitivo) en los cromosomas del ratón. Estos autores observaron que las áreas cromosómicas donde se localiza el ADN satélite (los centrómeros de todos



los autosomas y el cromosoma sexual X) se teñían intensamente con Giemsa, a diferencia del resto de las regiones cromosómicas.

Arrighi y Hsu (1971) (1) trabajando con tales métodos encuentran que el tratamiento de las preparaciones de cromosomas humanos con NaOH 0.07N durante 2 minutos, seguido de un lavado de las preparaciones con etanol, incubación con 2xSSC (2xSSC: 0.3M ClNa, 0.03M citrato trisódico), y posterior tinción con Giemsa, producía una coloración diferencial de los cromosomas. En los humanos, las regiones centroméricas de los cromosomas se tiñen mas intensamente que las otras regiones.

Posteriormente a la publicación de las técnicas originales para detección de bandas C, se desarrollaron algunos métodos que producían áreas teñidas no solamente en las regiones centroméricas, sino regiones teñidas diferencialmente a lo largo de toda la longitud de los brazos cromosómicos, son las denominadas técnicas de bandeado G que provee más detalle que las de bandeado C, utilizando como colorante el Giemsa (=G). Drets y Shaw (1971) (14) incuban las preparaciones después de un tratamiento con NaOH en 12xSSC, a 65°C, durante 60-72 h. Otros métodos usan solamente una incubación en 2xSSC, a 65°C, durante varios periodos (Sumner y col., 1971) (61).

Patil y col. (1971) (42) observaron que si el pH de la solución de Giemsa se cambia de un pH neutro a un pH 9.0, se puede obtener una tinción diferencial de los cromosomas; en algunos casos,

en este método se combina el tratamiento de un álcali, con la tinción por Giemsa en un solo paso.

Seabright (1971) (57) utiliza una solución de tripsina (Difco) al 0.25% e incubación de las preparaciones durante 10-60 segundos; posteriormente, las preparaciones se tiñeron con colorante Leishman tamponado (Schnedl, 1974) (55).

El patrón de bandas obtenido en el bandeo G es básicamente idéntico al que se consigue mediante el bandeo Q. Las bandas teñidas intensamente con Giemsa se corresponden con las bandas Q fuertemente fluorescentes que aparecen al teñir con quinacrina. Equivalencia que no es absoluta en el caso del cromosoma Y humano, que posee un segmento con fuerte fluorescencia, que no se bandea mediante la técnica de bandeo G. El bandeo G, aparte de facilitar preparaciones cromosómicas bandeadas permanentes, presenta sobre el bandeo Q la ventaja de proporcionar un patrón de bandas más detallado; lo que implica un mayor auxilio a la hora de identificar los pares de cromosomas homólogos de un complemento.

La técnica de bandeo R, diseñada por Dutrillaux y Lejeune en 1971 (15) puede considerarse una variante del bandeo G. Debe su nombre a que el patrón de bandas que se obtiene es como el "reverso" del G; las bandas teñidas fuertemente con Giemsa mediante el bandeo G se tiñen débilmente al aplicar el bandeo R y viceversa. Este método consiste en la incubación de las preparaciones cromosó-

micas en solución de Earle (pH=6.5) a 87°C, durante 5-20 minutos y tinción posterior con Giemsa. Las bandas reversas de acridina se obtienen por calentamiento en tampón fosfato (pH=6.5), a 85°C, durante 5-20 minutos, con posterior tinción con naranja de acridina al 0.01%, a pH= 6.5, durante 5 minutos, y diferenciándose durante 2 minutos en el mismo buffer (en frío).

En 1973, Matsui y Sasaki (38) publicaron un método de bandeo por medio del cual se pone de manifiesto un tipo de heterocromatina constitutiva asociada a las regiones de los cromosomas (normalmente constricciones secundarias), en las cuales se organiza el nucleolo. Dichas regiones cromosómicas han recibido el nombre de regiones NOR ("nucleolar organized region). Las técnicas de bandeo N son, por tanto, de gran utilidad para determinar el número total y la localización de los organizadores nucleolares funcionalmente activos en los complementos cromosómicos de animales o plantas. La técnica de bandeo N inicial utiliza el Giemsa como colorante selectivo, tras someter las preparaciones a una breve incubación en una solución de ácido tricloroacético a alta temperatura, o a una digestión con determinados enzimas: ADNasa o ARNasa.

Howell y Hsu (1979) (24) tiñen selectivamente los NOR utilizando nitrato de plata.

Finalmente Wang y Juurlink (1979) (71) logran teñir los NOR en cromosomas de Hamster chino sirviéndose de un colorante

específico de proteínas, el azul coomasie brillante. Este método en fase experimental todavía, puede terminar sustituyendo, por su rapidez y sencillez, a todos los desarrollados hasta la fecha (Cortés, 1984) (8).

#### 1.2.2.- En Parasitología.

A pesar de que las técnicas de bandeo se desarrollaron hace 15 años, su aplicación, en el campo de la Parasitología no se inicia hasta el año 1980 en que Grossman y col. (22) utilizan la técnica de bandeo C para demostrar la heterocromatina sexual en los cromosomas mitóticos de Schistosoma mansoni (Trematoda). Posteriormente Short y Grossman (1981) (58) examinan las diferencias existentes entre los cariotipos de una cepa de Puerto Rico de S. mansoni y una cepa de Kenia de S. rhodaini mediante técnicas de bandeo C. En este mismo año Hirai y col (23) estudian el polimorfismo de bandas C en un trematode pulmonar: Paragonimus ohirai.

#### 1.2.3.- En Nematoda.

En la bibliografía consultada no se ha encontrado referencia alguna al empleo de técnicas de bandeo en estudios citogenéticos de representantes de la Clase Nematoda.

## 2.- OBJETO DEL TRABAJO

Como queda indicado en la introducción precedente, los estudios genéticos realizados hasta la fecha sobre nematodos parásitos, en los distintos países donde existen grupos de investigadores dedicados a esta línea, se han centrado fundamentalmente en el objetivo básico de llegar a conocer en las distintas especies parásitas su citogenética y su número cromosómico, no existiendo prácticamente antecedentes sobre la aplicación de técnicas de bandeo al estudio cromosómico en la Clase Nematoda. Esta situación ha demostrado la insuficiencia de los datos experimentales obtenidos, a la hora de realizar un correcto cariotipo de las especies de nematodos parásitos hasta ahora estudiados. Para conseguir este objetivo se hace imprescindible la utilización de las técnicas de bandeo, técnicas ampliamente aplicadas actualmente al estudio cromosómico de muchas especies de seres vivos, pero no de los nematodos parásitos.

Esta situación es la que nos lleva a continuar nuestros estudios, dentro de la línea de citogenética seguida en la Cátedra de Parasitología de la Facultad de Farmacia de Sevilla, y que son el objetivo de la presente Tesina. En ella se pretende hacer un estudio de las principales técnicas de bandeo C, G y N, utilizadas hoy día. a fin de encontrar las modificaciones necesarias que las hagan aplicables al estudio cromosómico en nematodos parásitos y, posteriormente, aplicar dichas técnicas a algunas de las principales especies de nematodos parásitos que afectan a los animales de explota-

ción industrial, para determinar en ellas su cariotipo, como base de un nuevo sistema futuro de diferenciación sistemática entre los mismos, ya que es perfectamente conocida la insuficiencia para la tipificación de especies de nematodos de los actuales criterios, basados fundamentalmente en datos morfológicos y biológicos.

### 3.- MATERIAL Y METODOS

#### 3.1.- MATERIAL PARASITOLÓGICO UTILIZADO.

Las especies parásitas utilizadas para la aplicación de las técnicas de bandeado han sido: Dictyocaulus filaria y Chabertia ovina.

##### 3.1.1.- Dictyocaulus filaria.

Es un nematode de cuerpo filiforme, blanco-amarillento, con cutícula estriada longitudinalmente, la apertura oral es oval y su dorso ventral aparece más grueso que el dorsal, las ligeras depresiones sobre ambos lados laterales de la superficie perioral forman labios dorsales y ventrales. La cavidad oral está remarcada con una gruesa cápsula quitinoide. El esófago tiene forma de maza, con el extremo posterior dos veces más ancho que el anterior (Esquema 1.B). El poro excretor está conectado por un conducto estrecho y corto con dos glándulas excretoras en forma de salchicha.

El macho de esta especie presenta una longitud de 40-80 mm., con bolsa copulatrix prominente: el radio dorsal consta de dos largas ramas unidas en su base teniendo cada una de ellas en la extremidad distal tres papilas. El radio externo dorsal está separado; los posteriores y medio laterales están unidos a lo largo de toda su longitud excepto en la parte terminal; los anterolaterales están separados; los ventrales están unidos en el primer tercio, mientras que los ventroventrales son considerablemente más cortos que los lateroventrales. Las espículas son robustas teniendo dos ondulaciones

o membranas, a manera de alas, en los lados. El gubernáculo es oval y de estructura esponjosa y semitransparente (Esquema 1.A y 2.A).

La hembra de D. filaria presenta una longitud de 50-110 milímetros, todo el interior del verme está ocupado por los tubulos genitales conteniendo huevos con las larvas del primer estadio, perfectamente desarrolladas, en su final distal. La vulva se localiza cerca de la mitad del cuerpo (Gerichter, 1.951) (20) (Esquema 2.B).

Esta especie se denomina algunas veces "el gusano grande del pulmón de las ovejas y cabras". Los adultos viven en las vias respiratorias altas, siendo su ciclo biológico directo; la hembra pone los huevecillos en los bronquios y las primeras larvas pueden salir a las vias aéreas. Unos cuantos huevecillos y larvas pueden, posiblemente, ser expulsados por la boca o por la nariz al toser el animal, debido a la acción irritante de los vermes. Sin embargo, la mayor parte de ellos son expulsados con la tos hacia la parte posterior de la boca y deglutidos, pasando así al estómago. Los huevecillos que no han incubado en las vias aéreas, lo hacen durante su paso por el tubo digestivo y, probablemente, la mayoría de ellos eclosionan en este canal. Por lo tanto, en las excretas, se encuentran las primeras larvas y no los huevecillos. La 1ª y 2ª larvas no se nutren sino que dependen de los gránulos de alimentos de sus células intestinales. Las terceras larvas infectantes de Dictyocaulus son destruidas con bastante facilidad por la desecación, pero resisten bien las bajas temperaturas si hay suficiente humedad.



Las larvas infectantes ingresan en el hospedador solo por via oral al ser ingeridas por él cuando pastorea. Las larvas no pueden perforar la epidermis del hospedador y cuando llegan al intestino atraviesan su pared pero no pasan a la corriente sanguinea, localizandose en los ganglios linfáticos mesentéricos. Aquí mudan su cutícula, convirtiendose en cuartas larvas. Estas pasan a la corriente linfática y por la sangre venosa alcanzan la aurícula derecha, de la cual pasan al ventrículo derecho y llegan a los pulmones. De los capilares pulmonares migran a los alveolos pulmonares, donde alcanzan la madurez sexual.

En los bronquios, D. filaria causa irritación e inflamación (bronquitis). Se acumula liquido mucoso en las paredes de los bronquios alrededor de los vermes y entonces estos pueden regresar a las pequeñas vias aéreas. Dentro de los bronquios se secreta una una gran cantidad de mucosidad viscosa que se convierte en espumosa al mezclarse con el aire, llegando a teñirse con sangre procedente de las lesiones mecánicas infligidas por los vermes. Los bronquios se obstruyen por la mucosidad espumosa en la cual se encuentran los vermes y los huevecillos, de manera que la respiración se vuelve difícil, presentandose tos áspera y frecuente. Al mismo tiempo puede haber descarga de mucosidad por la nariz.

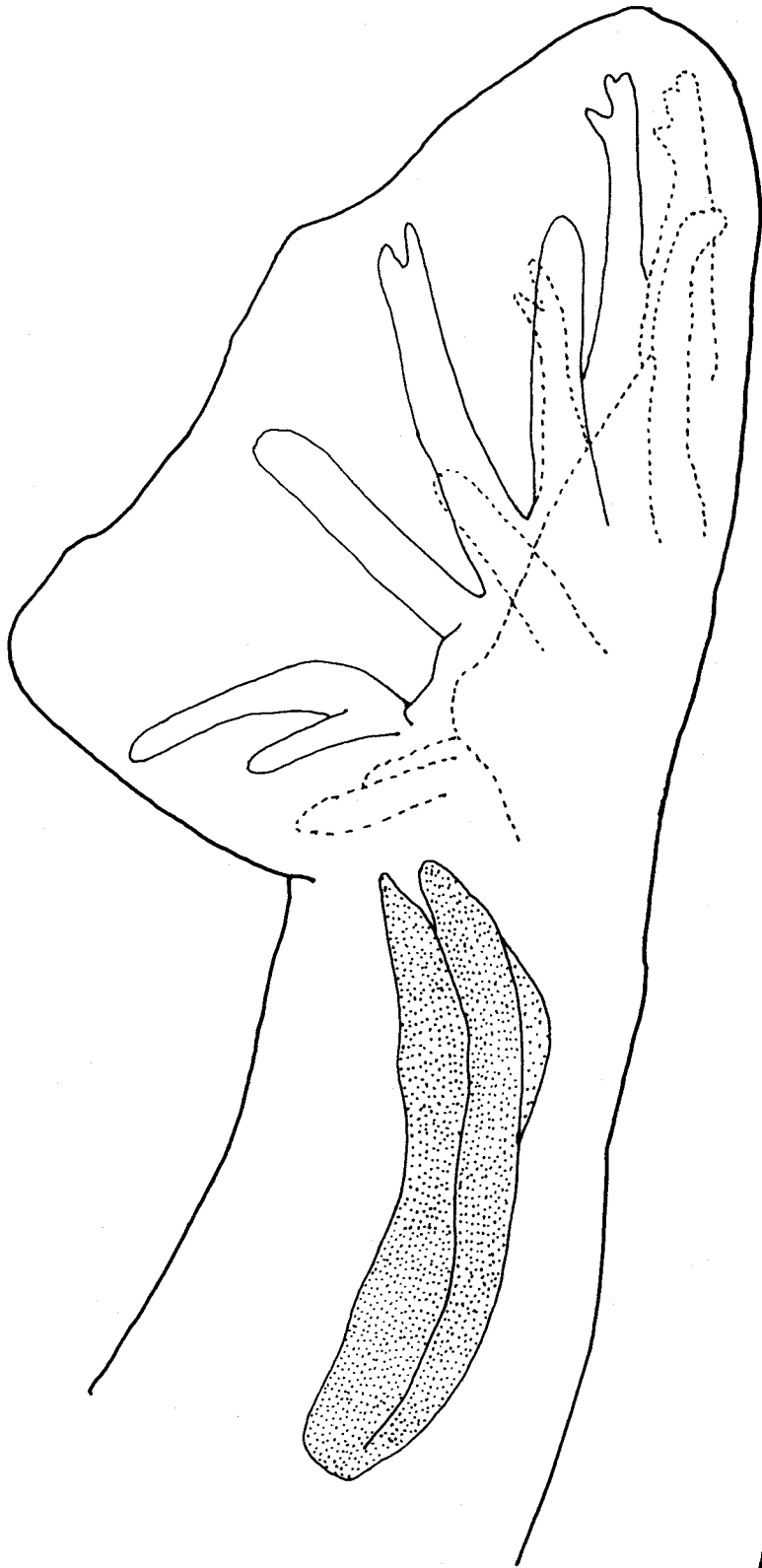
La obstrucción de los bronquios va acompañada con frecuencia de bloqueo parcial o completo de los bronquiolos más pequeños, pudiendose llegar a impedir el intercambio gaseoso en estas zo-

nas del pulmón. El resultado es el colapso (atelectasia) de dichas porciones pulmonares, llegando a formarse enfisema compensatorio de las áreas adyacentes. La contaminación bacteriana sobreimpuesta de las zonas afectadas, puede desencadenar en la aparición de bronco - neumonías.

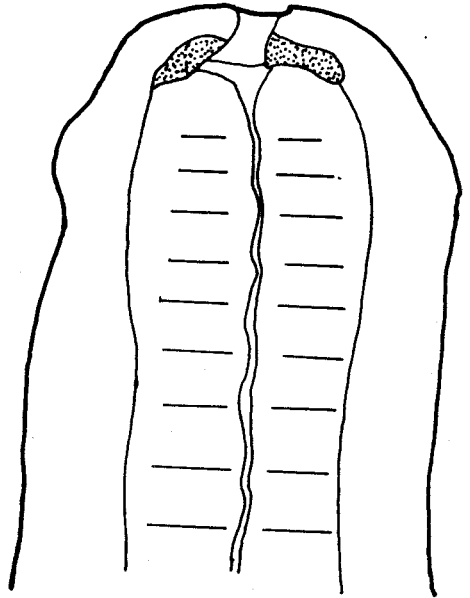
Además de estas alteraciones en pulmones y vías aéreas, las larvas infectantes, cuando son numerosas, pueden ocasionar irritación intestinal y diarrea, al perforar las paredes de este órgano en su ruta hacia los ganglios linfáticos mesentéricos.

En algunos casos, puede presentarse la muerte, especialmente en los corderos o cabras jóvenes hasta de un año de edad; después de este tiempo interviene la inmunidad debida a la edad para reducir la acción patógena del parásito (Lapage, 1.971) (30).

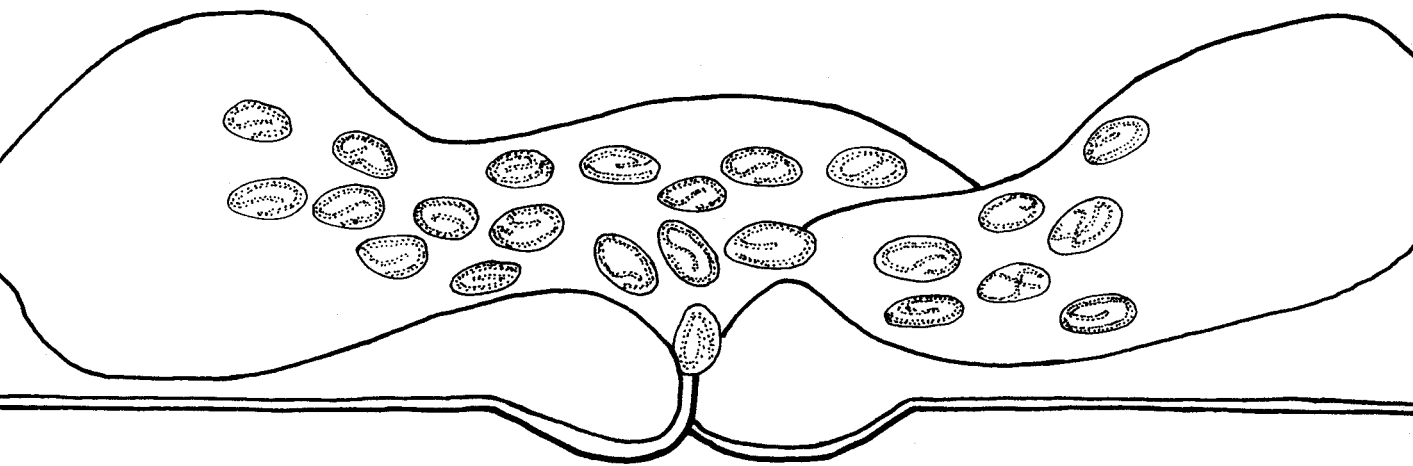
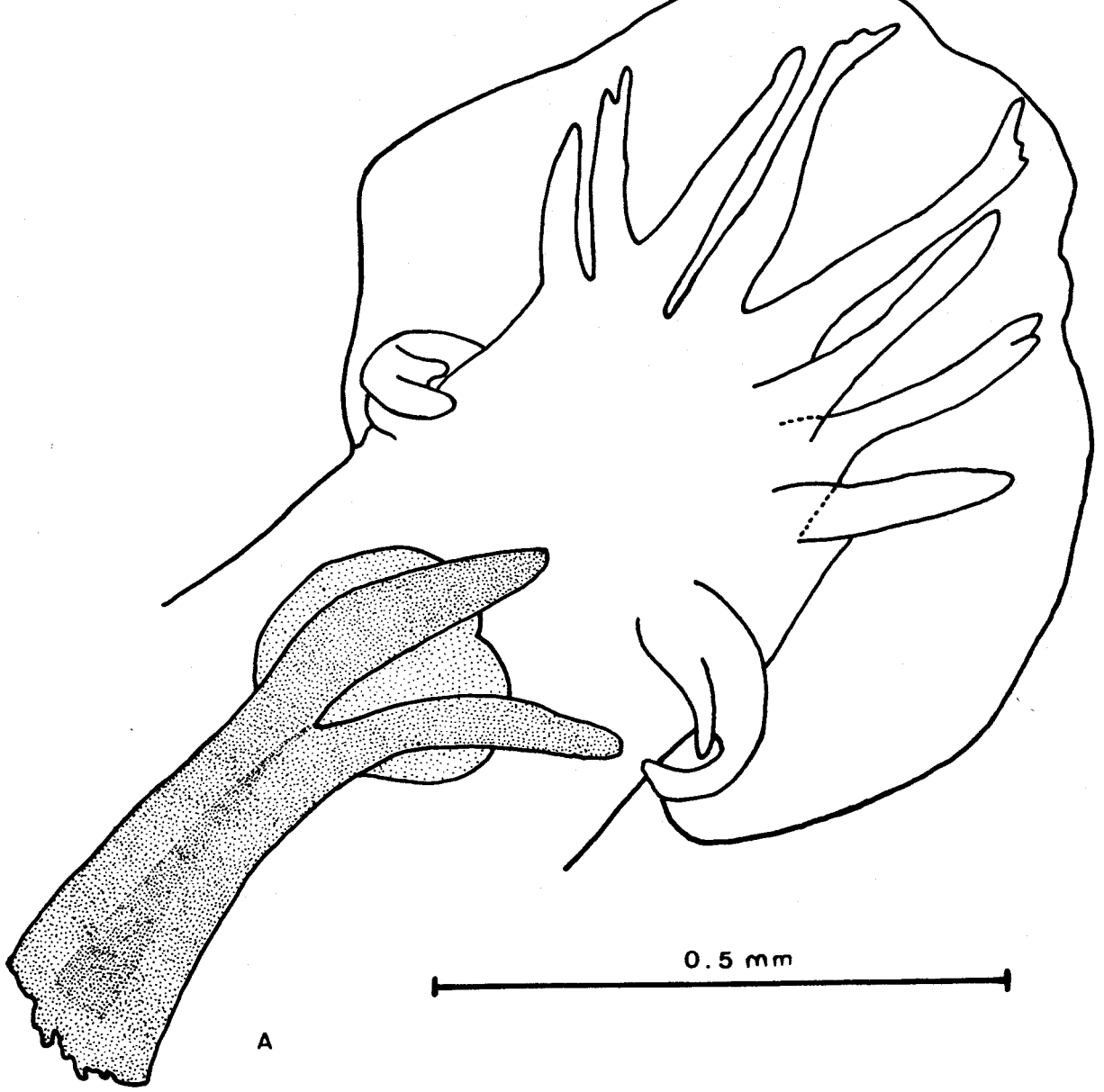
Romero (1.972) (48) en una encuesta parasitológica realizada en 1.970 sobre 384.000 cabezas de Ovies aries en Granada, obtuvo un tanto por ciento de parasitación del 69,5 % debida a metastrongilidos, con una pérdida económica cifrada en varios millones de pesetas anuales. Este mismo estudio realizado sobre 149.000 cabezas de Capra hircus en Granada, dio un porcentaje de parasitación del 68,2 % por metastrongilidos, lo que supone una incidencia negativa en la explotaciones agropecuarias de la zona.



A



B



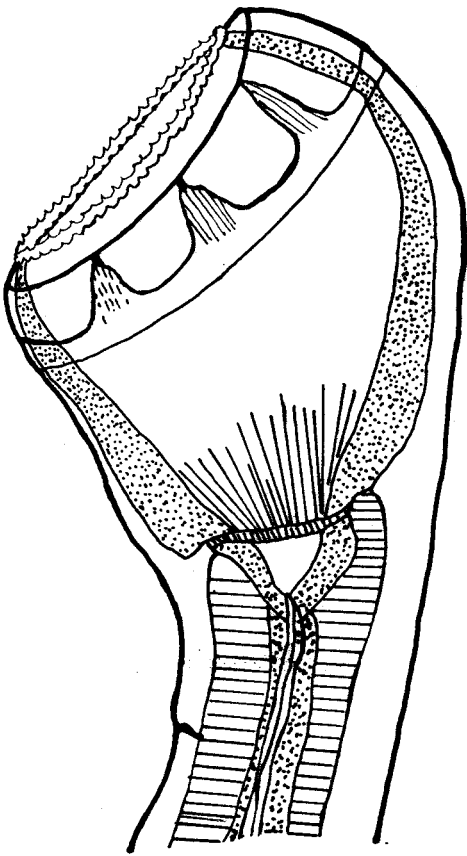
### 3.1.2.- Chabertia ovina.

Es un parásito del colon de ovejas, cabras, vacuno y otros rumiantes.. Los machos de esta especie miden de 13 a 14 mm. de largo y las hembras de 17 a 20 mm. Se reconoce fácilmente por su gran cápsula bucal subglobular que carece de dientes. La boca presenta una dirección anteroventral. las coronas de hojas son muy pequeñas y las vesículas cefálicas y la ranura no son muy manifiestas (Esquema 3.A).

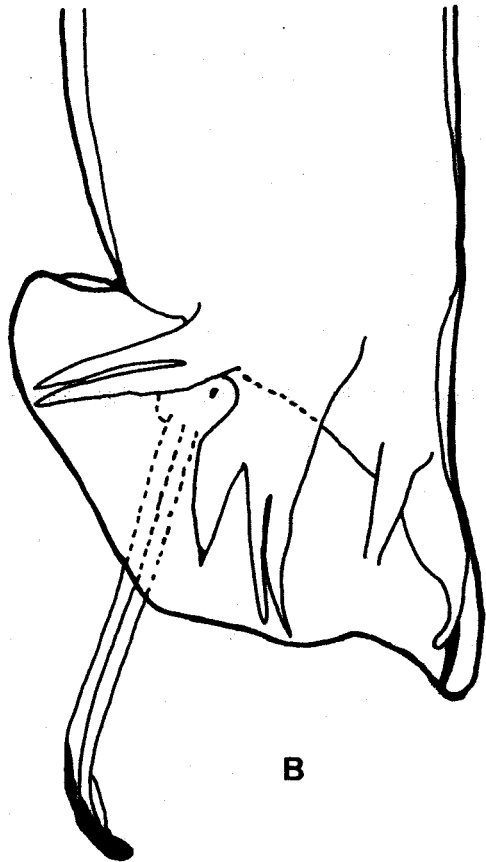
La bolsa copuladora del macho está bien desarrollada y las espículas miden de 1,3 a 1,5 mm. de longitud, presentando un gubernáculo (Esquema 3.B). La vulva de la hembra se abre aproximadamente a 0,4 mm. del extremo posterior (Lapage, 1.971) (30).

El ciclo biológico de esta especie es directo. La vaina de la larva infectiva tiene una cola relativamente larga. La larva del tercer estadio sufre una fase histotrófica en la pared del intestino delgado antes de la tercera ecdisis, a los 7-8 días después de la infección. Deben de transcurrir más de 26 días antes que los estados en desarrollo alcancen el colon. La larva del cuarto estadio se desarrolla principalmente en el lumen del ciego. La cuarta muda ocurre, como término medio aproximadamente, a los 24 días posinfección. Los adultos inmaduros pasan al colon, donde se localizan a los 49 días después de la infección (Soulsby, 1.982) (59).

Aunque la mayoría de las lesiones sufridas por el hospede



A



B

dador son causadas sin duda por el adulto, los estadios inmaduros también suelen ocasionar daños considerables. El adulto se adhiere por medio de su gran cápsula bucal a la mucosa del colon del hospedador y succiona un repliegue de la misma dentro de la cápsula bucal. Los vermes también causan hemorragias y pueden succionar sangre, aunque algunos autores consideran que lo hacen solo cuando, accidentalmente, lesionan un vaso sanguíneo de la pared del colon. Los Vermes con frecuencia emigran a nuevas localizaciones de manera que son capaces de causar extensas lesiones en la mucosa del colon, si estas lesiones se infectan con bacterias intestinales pueden formarse úlceras sépticas. Es posible que los vermes al mismo tiempo secreten sustancias tóxicas que afecten al hospedador. Entre los síntomas causados por este nematode se encuentran la anemia, trastornos de la función intestinal, excreción de heces suaves y pulposas, en las cuales podemos encontrar sangre y mucosidad. Las infestaciones fuertes ocasionan agotamiento y pueden producir la muerte del hospedador.

### 3.2.- RECOGIDA DE MUESTRAS.

Para el estudio de estas dos especies, se han recogido durante el curso 1.984-85 pulmones e intestinos gruesos procedentes de ejemplares de Ovies aries sacrificados en el Matadero Municipal de Dos Hermanas y Matadero del Sur S.A.(Salteras, Sevilla).

Los pulmones con lesiones macroscópicas claramente visi

bles, así como los intestinos correspondientes, son transportados al laboratorio en bolsas de plástico hermeticamente cerradas. Cuando estas lesiones no se manifiestan de forma clara, pero se sospecha un posible parasitismo vermidiano, los pulmones son abiertos en el mismo matadero.

Una vez en el laboratorio, los pulmones e intestinos son depositados en distintas bandejas de gran tamaño para proceder a su disección.

Con ayuda de pinzas y tijeras se procede a la disección de las visceras. Generalmente los nematodos pulmonares se encuentran formando ovillos unos con otros y mezclados con moco; por ello, con ayuda de una aguja enmangada se separan con mucho cuidado y son depositados individualmente en cajas Petri conteniendo solución salina al 0,9 % con el fin de evitar el enrollamiento de unos con otros y asegurar su supervivencia.

El mismo procedimiento se lleva a cabo para los nematodos intestinales.

Una vez aislados los nematodos, se siguen dos caminos diferentes:

A.- Cuando la identificación específica de los vermes, caracteres morfológicos macroscópicos, no ofrece ningún tipo de duda, se procede a someterlos a las técnicas citológicas directamente y en la mayor brevedad de tiempo.



B.- Cuando existan dudas en cuanto a las características morfológicas de los vermes, se hacen dos lotes, uno de ellos destinado a su estudio cariológico inmediato, a fin de evitar detrimento en la calidad de los resultados por retraso del examen del material. El segundo lote destina para una ulterior diagnosis específica.

### 3.3.- METODOS DE OBSERVACION NEMATOLOGICA.

- En fresco: mediante la visualización de sus estructuras en la lupa o al microscopio con mayores aumentos.

- Fijación: en el caso que el examen en fresco ofrezca dudas o se desee conservar los ejemplares en preparaciones permanentes, se procede a la fijación y transparentación de los mismos.

Los nematodes pulmonares se someten a lavados sucesivos con solución salina al 0,9 %, con el fin de retirar los restos mucosos que se encuentren adheridos a ellos.

La fijación se realiza con alcohol de 70° o formol al 7 %. para la transparentación se utiliza glicerina o lactofenol.

Las regiones del cuerpo no utilizadas, en las preparaciones para estudios citogenéticos, tales como: región caudal del macho o la parte anterior de la hembra, se conservan en ácido acético al 45 % para su total transparentación.

El montaje permanente se realiza entre porta y cubre,

utilizando como medio glicerina anhidra o lactofenol. Para ello se toma una gota de glicerina o lactofenol y se coloca en el centro del portaobjetos, eliminando las posibles burbujas que pueda tener. Se coloca encima el nematode adaptado a dicho medio. La cantidad de glicerina o lactofenol debe ser suficiente como para que llegue a ocupar todo el cubreobjetos, pero teniendo en cuenta que no sobresalga por los bordes.

Se coloca una gota de glyceel sobre los cuatro vértices esperando unos segundos; seguidamente se cubre bordeando con el glyceel las aristas del cubreobjetos, formando de ese modo una película de cierre entre el porta y el cubreobjetos.

### 3.4.- METODOS CITOLOGICOS.

#### 3.4.1.- Extracción de las gónadas.

El material para estudio citogenético debe ser recolectado inmediatamente después de la necropsia del hospedador, para obtener los parásitos vivos y en plena actividad.

La extracción de las gónadas se efectua bajo el campo visual de un microscopio estereoscópico, mediante procedimientos que dependen del parásito a estudiar y sexo del mismo. Con ayuda de agujas enmangadas se procede a romper la cutícula por la parte anterior del nematode, ejerciendo presión por debajo del esófago, con ello se consigue extraer parte de las gónadas junto con el intestino. Este

último se separa y se aíslan las gonadas. Se realiza otro corte en la parte posterior del gusano por encima del ano, consiguiéndose el resto de las gonadas.

#### 3.4,2,- Técnicas de tinción convencional.

Un paso previo a la aplicación de las técnicas de bandeo es la realización de una tinción convencional para la localización de las placas cromosómicas objetos de estudio.

La técnica de tinción convencional utilizada es la de Slizynski (Gonzales y Malmann, 1.970) (21) que sigue los siguientes pasos:

- La disección del nematode es realizada directamente sobre un portaobjetos albuminizado en el cual se coloca una gota de agua destilada.
- A continuación se separa el intestino del resto del material.
- Se añade una gota de metanol-acético 3:1.
- Se cubre la gónada con un trozo de papel celofán.
- Posteriormente se coloca encima de toda la preparación un papel de filtro.
- El "squashing" o "aplastamiento" se realiza haciendo presión (con el dedo pulgar) sobre la preparación. A continuación se

sumerge la preparación en cajas Petri conteniendo metanol:acético 3:1.

Trascurridos pocos minutos el papel celofán se libera y se deja secar al aire la preparación.

- Posteriormente, se procede a la tinción con Giemsa al 1% durante 15 minutos; pasado este tiempo se retira el colorante, se lava con agua y se deja secar.

Una vez localizadas las placas cromosómicas de interés, se procede al destañamiento de las mismas, antes de la ejecución de las técnicas de bandeado correspondientes. Para ello las preparaciones son sumergidas, sucesivamente, en xileno (2 minutos), xileno:etanol absoluto, 1:1 (1 minuto), etanol absoluto (2 minutos), etanol del 95% (2 minutos), etanol del 70% (2 minutos), HCl-etanol del 70%, 1:300 (30 segundos), etanol del 70% (2 minutos). Por último las preparaciones se dejan secar al aire (McKenzie y Lubs, 1.973) (36).

### 3.4.3.- Técnicas de bandeado propiamente dichas.

#### 3.4.3.1.- Técnicas de bandeado C.

A.- Técnica de Sumner (1.972) (62).

- Fijación en metanol-acético (3:1) con tres cambios de fijador de 15 minutos cada uno.

- Secar al aire y guardar las preparaciones, así obtenidas, a temperatura ambiente durante varios días.

- Tratamiento con HCl 0,2N durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Lavar con agua destilada.
- Incubar las preparaciones en una solución de Hidroxiido de bario octo hidratado al 5%, recientemente preparada, a 50°C durante 10 minutos.
- Lavar profundamente con agua destilada.
- Incubación en una solución de 2xSSC (NaCl 0,3M, citrao trisódico 0,03M) a 60°C durante 1 hora.
- Lavar y teñir con Giemsa (Merck) al 2% v/v durante 1½ horas en tampón fosfato (0,461 g. de  $PO_4H_2K$ , 0,584 g. de  $PO_4HNa_2$  en 100 cc. de agua destilada).

No obstante, esta técnica no se ha seguido estrictamente en todos los casos; así, se han realido algunas modificaciones:

A.1.- Incubación de las preparaciones en  $Ba(OH)_2 \cdot 8 H_2O$  al 5%, recientemente preparado, a 37°C durante 1½ horas. El resto del proceso se mantiene exactamente igual que en la técnica original.

A.2.- Fijación con metanol-acético, 3:1, durante 15 minutos. Incubación con  $Ba(OH)_2 \cdot 8 H_2O$  al 5%, durante 5 minutos, a 50°C. Tinción con Giemsa al 2%, durante 30 minutos.

B.- Técnica de Luciani y col. (1.975) (33).

- Fijación con metanol-acético, 3:1, durante 15 minutos.
- Secar y guardar a temperatura ambiente un mínimo de una semana.
- Incubación en 2xSSC a 40°C, durante 2 horas.
- Lavar en agua destilada y dejar enfriar.
- Tratar con solución de tripsina (Sigma tipo III) al 0,25% en solución salina (0,9%), durante 10 segundos, a 18°C.
- Lavar con agua destilada.
- Teñir con Giemsa al 1,5% durante 15 minutos, en tampón citrato-fosfato (2 ml. de ac. cítrico 0,1M; 4 ml. de fosfato di-sódico 0,2 M y 92,5 ml. de agua destilada). pH= 6,7.
- Lavar con agua destilada.

Las modificaciones a esta técnica son las siguientes:

B.1.- Incubación en 2xSSC, a 60°C, durante 3 horas.

B.2.- Incubación en 2xSSC, a 60°C, durante 3 horas y prolongación del tratamiento con tripsina a 20 segundos.

3.4.3.2.- Técnicas de bandeo G.

C.- Técnica de Schnedl (1.974) (55).

- Fijación en metano-acético, 3:1, durante 15 minutos.
- Secar las preparaciones al aire y guardar a temperatura ambiente durante más de 7 días.

- Tratamiento con NaOH 0,07N a temperatura ambiente, durante 90 segundos.

- Pasar por alcohol de 70° durante 10 minutos y posteriormente por alcohol absoluto durante 10 minutos.

- Dejar secar al aire.

- Incubar en buffer Sorensen ( $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K} + \text{PO}_4\text{HNa}_2$  0,6M) pH=6,8 a 60°C durante 24h.

- Secar al aire.

- Teñir con Giemsa al 10% durante 15 minutos a pH=6,93 usando tampón fosfato ( 0,57g  $\text{PO}_4\text{HNa}_2$ , 0,25g de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  para 100cc de agua).

- Lavar con agua destilada.

D.- Técnica de Gallimore y Richardson (1973) (19).-

- Fijación en etanol-acético 3:1 durante 15 minutos.

- Incubación con 2xSSC a 60°C durante 3h.

- Enfriar lavando con agua destilada.

- Tratamiento con tripsina al 1% (una parte de tripsina en 99 de solución salina al 0,9%) a 10°C durante 90 segundos.

- Lavar con agua destilada.

- Teñir con Giemsa al 10%, durante 5 minutos, en tampón fosfato ( 6,2 ml de solución A ( 9,46 g de  $\text{PO}_4\text{HNa}_2$ , agua para un litro); 3,8 ml de solución B ( 9,07g de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ , agua para un litro)).

E.- Técnica de Comings y Avelino (1974) (6).

- Fijación en metanol-acético 3:1 durante 15 minutos.
- Tratamiento con ClH 0,2N durante 1h y 30 minutos.
- Incubación en 2xSSC a 60°C durante 3h.
- Lavar con agua destilada hasta enfriar.
- Tratamiento con tripsina al 1% (una parte de tripsina en 99 de solución salina al 0,9%) a 10°C, durante 90 segundos.
- Lavar con agua destilada.
- Teñir con Giemsa al 10%, durante 5 minutos en tampón fosfato (6,2 ml de solución A y 3,8 de solución B).

3.4.3.3.- Técnicas de bandeado N.-

F.- Técnica de Matsui y Sasaki (1973) (38).

- Fijación en metanol-acético 3:1 durante 15 minutos.
- Secar al aire y guardar las preparaciones obtenidas un mínimo de una semana.
- Incubar los portas en ácido tricloroacético al 5%, a 85°C, durante 30 minutos.
- Lavar profundamente en agua del grifo.
- Incubar en ClH 0,1N a 60°C, durante 30 minutos.
- Volver a lavar profundamente en agua del grifo.
- Teñir con Giemsa al 10% en buffer fosfato (0,461g de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  y 0,584g de  $\text{PO}_4\text{HNa}_2$  en 100 ml de agua destilada, pH=7) durante 1h.



- Lavar con agua destilada.

La modificación realizada a esta técnica ha sido la siguiente:

F.1.- Tratamiento con ácido tricloroacético al 5% durante 15 minutos, a 85-90°C.

#### 3.4.4.- Preparación de reactivos.

1.- Metanol-acético 3:1

Reactivos: ALCOHOL METILICO purísimo

$\text{CH}_3\text{OH}$  , Cod. 141091. Panreac.

ACIDO ACETICO GLACIAL purísimo

$\text{CH}_3\text{COOH}$  , cod. 141008. Panreac.

Se toman 3 partes de metanol y se mezclan con una parte de ácido acético glacial, posteriormente se agita hasta homogeneizar.

2.- Solución de ácido clorhídrico 0,2N

Reactivos: ACIDO CLORHIDRICO 35% purísimo

$\text{ClH}$  cod. 141019 . Panreac.

La normalidad de este ácido clorhídrico al 35% es 11,31 y las proporciones de ácido y agua destilada a tomar, varían según el volumen final de solución final que se quiera preparar.

### 3.- Hidróxido de Bario al 5%.

HIDROXIDO DE BARIO, 8-hidrato, purísimo

$\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ , cod. 141188. Panreac.

La preparación de este reactivo se ha de realizar extemporáneamente. Para ello, en un matraz se colocan 5g de hidróxido de Bario y se añade agua destilada hasta 100ml, a continuación se procede a agitar en un agitador magnético. Siempre ha de tenerse la precaución de mantener la boca del matraz cerrada para evitar así la formación de carbonatos. El tiempo de agitación es variable pero como pauta podemos aconsejar una duración de 30 minutos. Antes de utilizar esta solución concentrada de hidróxido de Bario hay que filtrar para eliminar el exceso de hidróxido no solubilizado.

### 4.- Solución salina citratada (2xSSC).

Reactivos: SODIO CLORURO, purísimo

$\text{NaCl}$  cod. 141659. Panreac.

CITRATO DE SODIO TRIBASICO 2-hidrato

$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  cod. 141655. Panreac.

En la técnica de bandeo C el 2xSSC utilizado es preparado antes de dar comienzo a la realización de la técnica de bandeo, mientras que para las técnicas de bandeo G se ha preparado una solución concentrada (20xSSC), la cual es posteriormente diluída, convenientemente para su uso como 2xSSC.

Para preparar la solución de 2xSSC extemporánea se pesan 1,75g de cloruro sódico y 0,88g de citrato trisódico que se disuelven posteriormente en 100ml de agua destilada, agitando hasta su perfecta disolución. Este 2xSSC se puede guardar durante 2 semanas a 2°C.

La solución 20xSSC es preparada disolviendo 175,5g y 82,2g de cloruro sódico y citrato trisódico respectivamente, en un volumen final de un litro de agua destilada. Esta solución de 20xSSC es guardada y diluída convenientemente (10 veces) antes de su uso.

#### 5.- Buffer Sorensen.

Reactivos: FOSFATO DE POTASIO MONOBASICO, purísimo

$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  cod. 141509. Panreac.

FOSFATO DE SODIO DIBASICO ANHIDRO, purísimo

$\text{PO}_4\text{HNa}_2$  cod. 141679. Panreac.

Se mezclan 4,4g de fosfato disódico, 4,2g de fosfato monopotásico en un matraz y se disuelven mediante la adición de agua destilada en cantidad suficiente para un volumen final de 500ml. Se agita en agitador magnético.

#### 6.- Solución de Giemsa al 2%.

Reactivos: AZUR-EOSIN METHYLENBLAULOSUNG. Ref. 3834946. Merck

TAMPON FOSFATO

Se toman 2ml de Giemsa Merck y se diluyen con tampón fosfato hasta un volumen final de 100ml.

#### 3.4.5.- Obtención de resultados.

Para la obtención de las microfotografías, que reflejan y materializan los resultados obtenidos en el presente trabajo, se ha usado un fotomicroscopio BH-2 marca Olympus.

Por otro lado las películas fotográficas empleadas han sido Kodalith y Panatomic, ambas de la casa Kodak. En su revelado se han utilizado los reveladores Rodinal S y Rodinal N y Valca Universal siendo fijadas con Valca Fival.

Por último el papel fotográfico para la positivación de los negativos es marca Negra NBN, 11P normal politenizado blanco brillante.

#### 4.- RESULTADOS

##### 4.1.- TECNICAS DE BANDEO.

##### 4.1.1.- Técnicas de bandeo C.

Cuando se aplica la técnica de bandeo C aparecen dos tipos de bandas: las bandas C positivas (más teñidas que las regiones eucromáticas) y otras denominadas bandas C negativas porque aparecen menos teñidas que las restantes regiones dentro del cromosoma.

Las bandas C positivas son clasificadas, de acuerdo a su localización dentro del cromosoma, como bandas paracentroméricas (localizadas en el centrómero o próximas a él), bandas terminales (cuando ocupan las regiones teloméricas) y bandas intersticiales (Santos y col., 1983) (52).

Este método de bandeo C detecta la presencia de heterocromatina centromérica (constitutiva) (Okada y Comings, 1974) (40) que corresponde a las bandas C positivas. Estas bandas se correlacionan con heterocromatina constitutiva rica en ADN satélite, por eso se piensa que estas bandas C positivas representan áreas de reasociación de ADN altamente repetitivo (Comings, 1978; Chuprevich y col., 1973, y Arrighi y Hsu, 1971) (7) (12) (1).

Hoy día se llega a la conclusión que la aparición de bandas C es el resultado de varias causas (Caragna y Redi, 1984) (5):

- 1) Gran contenido de ADN repetitivo fácilmente reasociable.
- 2) Grado diferencial de empaquetamiento local.
- 3) Abundancia de Citosina metilada.
- 4) Relación particular entre ADN y proteínas histonas o no histonas en las bandas C.
- 5) Envolvimiento del complemento proteínico como sustrato del bandeo.
- 6) Extracción diferencial del ADN de regiones eu y heterocromáticas, a lo largo de los brazos cromosómicos.

Como se indica en Material y Métodos, para el estudio del bandeo C se ha utilizado la técnica de Sumner (1972) (62) (A), considerada de referencia por estar perfectamente contrastada su eficacia en el estudio cromosómico de diversos grupos de seres vivos. Por otra parte, a fin de adaptar dicha técnica de referencia a la problemática cromosómica en nematodos parásitos, se han ensayado diversas modificaciones de la técnica original de Sumner (A.1, A.2) y de la de Luciani y col. (1975) (33) (B.1, B.2).

Los resultados se han valorado sobre placas en paquitene, profase y metafase mitótica (Fig. 1), ya que en paquitene y profase mitótica se puede distinguir entre eu y heterocromatina, observar los cromómeros y la presencia de nucleolo asociado a los denominados cromosomas organizadores del nucleolo. La metafase mitótica es la etapa del ciclo celular en la que el cromosoma es más fácilmente distinguible e identificable (Schulz y Schaeffer, 1980) (56).

#### TECNICA A.- (Técnica original de Sumner).

Se ha podido comprobar la eficacia de la técnica de Sumner en nuestro material parasitológico, pues se pone de manifiesto un bloque heterocromático más intensamente teñido que el resto del cromosoma (Fig. 1A), y los centrómeros, que aparecen como una constricción débilmente teñida (constricción primaria) entre dos pequeñas zonas de heterocromatina paracentromérica, que se tiñen más intensamente al ejecutar esta técnica. Sin embargo, los resultados obtenidos no son constantes, pues la observación del centrómero es a veces difícil en algunos de los pares cromosómicos y en fases de mayor condensación cromosómica, se produce una sobretinción no siempre deseable. También dentro de una misma preparación se presentan placas con alteraciones morfológicas en los cromosomas.

#### TECNICA A.1.

En la técnica A.1 se aumenta el tiempo de tratamiento con hidróxido de Bario y se reduce la temperatura de esta solución. Los resultados obtenidos son buenos, pues los cromosomas aparecen en buen estado morfológico, no presentando deformación (Fig. 1B,1C). El bloque heterocromático aparece nítidamente teñido. La heterocromatina paracentromérica se observa en forma de bandas teñidas, lo mismo que ocurre con otras bandas C a lo largo de la longitud del cromosoma.

### TECNICA A.2.

Esta modificación se ha limitado a reducir el tiempo de tinción , fijación y tratamiento con hidróxido de Bario originalmente empleados por Sumner. Con ella, se ha conseguido un bandeo cromosómico semejante al conseguido con la técnica A.1. La morfología de los cromosomas es buena (Fig. 1D,1E), al igual que su estado de conservación. El grado de tinción es adecuado, lo que permite observar las mismas estructuras que con los dos procesos anteriores. La ausencia de algunas bandas C en los brazos cromosómicos representados en la Figura 1E, es consecuencia de una mayor condensación cromosómica.

### TECNICA B.- (Técnica original de Luciani y col.)

La tinción conseguida mediante esta técnica pone de manifiesto la aparición de bloques de heterocromatina más densamente teñidos que el resto del cromosoma (Fig. 2A). El centrómero no se observa de una forma clara.

### TECNICA B.1.

La simple prolongación del tiempo de incubación en 2xSSC (Comings y Avelino, 1974,(6)), proporciona una buena visualización del centrómero (Fig. 2C) y además pone de manifiesto en los bloques heterocromáticos, de algunos cromosomas del complemento, la existencia de varias bandas.



### TECNICA B.2.

En la técnica B.2 se prolonga tanto el tiempo de incubación en 2xSSC como el tiempo de tratamiento de tripsina.

Los resultados obtenidos permiten la clara observación del bloque heterocromático y del centrómero (Fig. 2C).

#### 4.1.2.- Técnicas de bandeo G.

Las técnicas de bandeo G proporcionan más detalle que las de bandeo C y permiten una mejor identificación de los cromosomas dentro del complemento. La naturaleza de las bandas está sujeta a discusiones, pero se ha demostrado que reflejan más fuertemente la condensación de cromatina (Ross y Gormley, 1973; McKay, 1973; Yunis y Sánchez, 1973) (49) (35) (72).

En el bandeo G, al igual que en el bandeo Q y R juega un papel importante las proteínas cromosómicas o la interacción ADN-proteína (Burkholder y Duczek, 1982) (4).

Los patrones de bandas G se corresponden exactamente con el patrón cromomérico de cromosomas meióticos (Ferguson-Smith y Page, 1973; Luciani y col, 1975) (18) (33) y el bandeo G no es nada más que un zcrementamiento de este patrón cromomérico ya existente (Comings, 1978) (7).

La razón de las bandas G positivas es clara. La cromatina

que está presente, tiene el ADN libre para unirse con el colorante tiazínico del Giemsa (Comings, 1978) (7).

La heterocromatina centromérica también se presenta como un cromómero prominente en cromosomas meióticos, estas áreas en cromosomas mitóticos están pobremente teñidas, algunas veces, por bandeado G, pero muy bien por bandeado C (Merrick y col. 1973) (39).

TECNICA C.- (Técnica original de Schnedl).

Este procedimiento de bandeado G no ofrece una homogeneidad de resultados, ya que sólo en algunos cromosomas del complemento podemos apreciar la aparición de tales bandas (Fig. 3).

Como es característico del material empleado, los cromosomas aparecen con su bloque heterocromático intensamente teñidos. En varios de los cromosomas se observa como este bloque no es homogéneo, sino que está subdividido en bandas e interbandas que aparecen algo difuminadas.

En general, el aspecto de las placas estudiadas con esta técnica no es bueno, destacando una tinción un poco excesiva.

TECNICA D.- (Técnica original de Gallimore y Richardson).

Antes de aplicar esta técnica, y como paso previo para la localización de las placas cromosómicas más interesantes se realiza una tinción convencional, tal como se ha indicado en el aparta-

do de Material y Métodos. Una vez seleccionadas éstas y anotadas las coordenadas correspondientes, se procede a la aplicación de la técnica B.

Esta técnica no nos proporciona resultados homogéneos en todos los casos; Así, mientras que en algunas preparaciones se observan placas con diferencias poco ostensibles con respecto a los obtenidos en la tinción convencional (Fig 4A, 4B), en otras placas, dentro de la misma preparación, se pueden observar perfectamente las llamadas bandas G (Fig. 5A, 5B, 5C).

No obstante, hay que significar, que estas bandas se ven más acentuadas en el caso de cromosomas en el estadio de profase mitótica, debido a la menor condensación cromosómica y a la relación existente entre el patrón de bandas G y los cromómeros situados a lo largo del cromosoma (Fig. 5A).

También se ve como el bloque heterocromático no se manifiesta como un bloque densamente teñido sino que aparece bandeado (Fig. 5B).

TECNICA E.- (Técnica original de Comings y Avelino).

Esta técnica se ha llevado a cabo tomando como referencia las coordenadas ya conocidas de las preparaciones a las que se ha aplicado anteriormente la técnica D.

La técnica de Comings y Avelino no se muestra en todos los casos como la más idónea, ya que, como se puede observar en la Figura 6A, el estado de los cromosomas aparece afectado notablemente, apreciándose un ligero hinchamiento de los mismos. Aunque si aparecen los mismos bandeados y su bloque heterocromático con bandas e interbandas más claras.

En otros casos (Fig. 6B) el estudio de los cromosomas individuales no se puede llevar a cabo debido al estado de deterioro de la placa cromosómica.

#### 4.1.3.- Técnicas de bandeo N.

Estas técnicas ponen de manifiesto un tipo de heterocromatina constitutiva asociada a las regiones de los cromosomas (normalmente constricciones secundarias), en las cuales se organiza el nucleolo. Dichas regiones reciben el nombre de RON (Región Organizadora del Nucleolo) ; en ellas se encuentran localizadas las secuencias necesarias para la síntesis (transcripción) de ARNr.

TECNICA F.- (Técnica original de Matsui y Sasaki).

La realización de esta técnica de bandeo se ha llevado a cabo en preparaciones a las que previamente se ha realizado una tinción convencional, para obtener las coordenadas de las placas cromosómicas más interesantes.



A



B



C



D

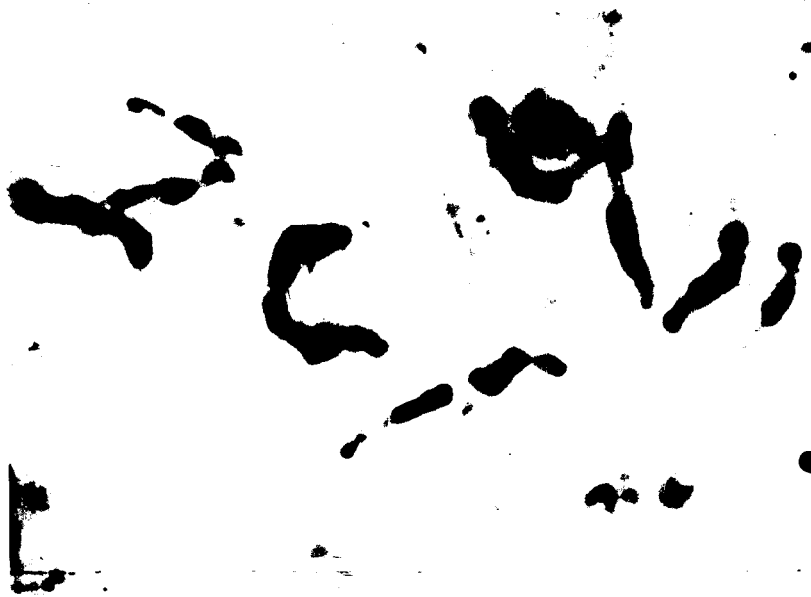


E

figura 1



A



B



C

figura 2



**figura 3**



A



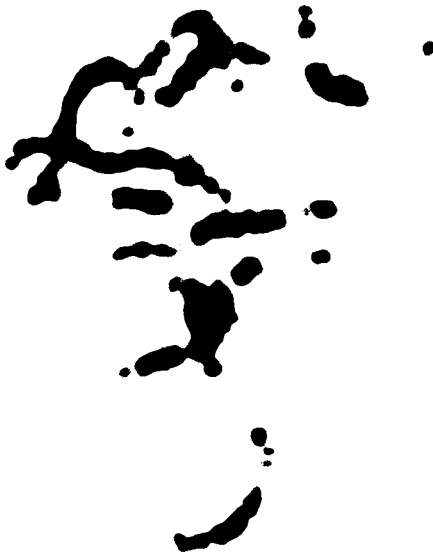
B

figura 4

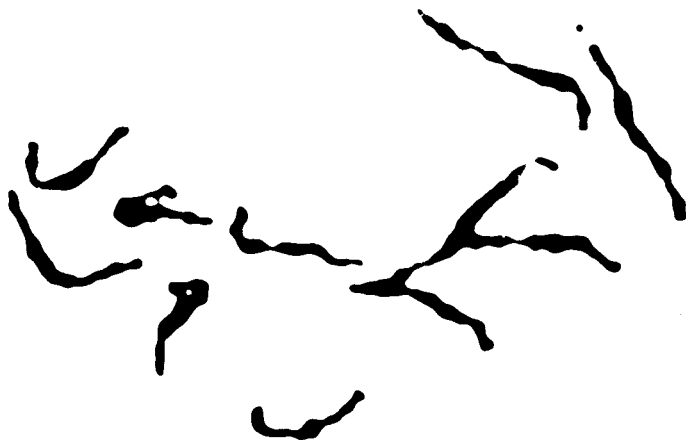




A



B



C

figura 5



A

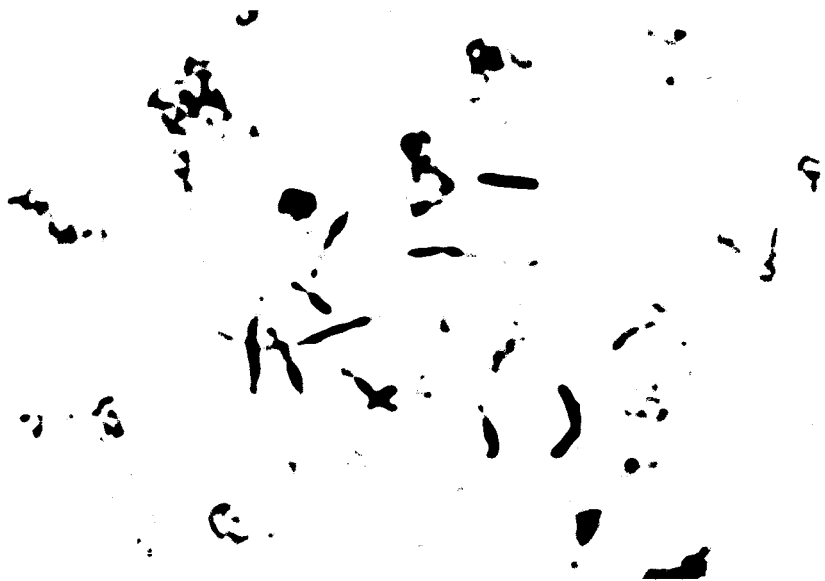


B

**figura 6**



A



B

figura 7

Este proceso de bandeo resulta ser excesivamente drástico, causando la completa desaparición de las placas cromosómicas, imposibilitando por ello, la obtención de microfotografías.

Esto nos ha movido a ensayar la modificación F.1, consistente en una disminución del tiempo del tratamiento con ácido tricloroacético al 5%. Los resultados así obtenidos son aleatorios, pues si bien en algunas placas se observan lo que podíamos llamar "cromosomas fantasmas", en los que es imposible localizar la RON (Fig. 7A), en otras placas los cromosomas se muestran con regiones fuertemente teñidas (Fig 7B).

#### 4.2.- GENETICOS.

##### 4.2.1.- D. filaria.

###### 4.2.1.1.- Bando C.

###### 4.2.1.1.a.- Profase mitótica, hembra.

Las bandas C han sido observadas en el estadio de profase y metafase mitótica.

El estadio de profase mitótica ha sido observado en ejemplares hembra de D. filaria (Foto 1 y 2). El cariotipo se ha realizado atendiendo al patrón de bandas característicos de cada par de homólogos (Lam. 1). Todo el conjunto cromosómico presenta

localización de heterocromatina constitutiva en las regiones terminales superiores de los cromosomas, correspondiente al lugar del centrómero (t-cromosomas); la presencia de grandes bloques de heterocromatina localizados intersticialmente es una característica común para todos los cromosomas. Las bandas más distales, correspondiente a pequeños telómeros, son observadas en todos los pares de homólogos, excepto en el par cuatro.

El par nº1 presenta dos bandas terminales separadas por una constricción, que ha sido identificada como el centrómero. El bloque de heterocromatina es de gran tamaño presentando variabilidad cuantitativa entre este par de homólogos. Hay que reseñar la presencia de dos pequeñas bandas C localizadas distalmente con respecto al centrómero.

El par nº2 posee dos bandas terminales bien visible sólo en uno de los homólogos, en donde se localiza el centrómero, seguidas de una pequeña banda intersticial. El bloque heterocromático se localiza intersticialmente. En la zona distal se visualiza, en uno de los homólogos, tres pequeñas bandas, el otro homólogo presenta la banda más distal separada por una banda C negativa.

El par nº3 presenta el centrómero localizado en la misma zona que en los dos pares anteriores, a continuación se pueden ver dos bandas, una de ellas débilmente teñida. El bloque heterocromático se localiza ligeramente distal, presentando variabilidad

cuantitativa entre homólogos. Hay presencia de bandas C terminales fuertemente teñidas.

El par nº4 es un t-cromosoma, con el centrómero localizado en la región terminal. El bloque heterocromático está situado intersticialmente, no observándose la presencia de bandas teloméricas.

El último par de homólogos es el de menor tamaño. El centrómero se visualiza entre una constricción existente entre dos bandas C terminales. El bloque de heterocromatina constitutiva es de pequeño tamaño, no observándose variabilidad cuantitativa. Existen dos bandas C terminales, una débilmente teñida y la otra muy apreciable.

Los cromosomas sexuales (XX) son heterocigóticos con el centrómero localizado en la región terminal del cromosoma (t-cromosoma). Existe variación cuantitativa en el bloque de heterocromatina C. Uno de ellos presenta una banda C débilmente teñida, mientras que ambos poseen bandas C teloméricas.

En la fotografía nº 2 se observa también una placa cromosómica, en profase mitótica, correspondiente a una hembra de D. filaria.

El patrón de bandas observado (Lámina 2) es semejante al de la lámina 1. Cabe destacar la presencia de bandas C negativas en la región terminal de uno de los miembros del par 1 y la no existen

cia de heteromorfismo en los cromosomas sexuales (par XX).

#### 4.2.1.1.b.- Metafase mitótica, macho.

El estudio de las bandas C se ha llevado a cabo también en el estadio de metafase mitótica. En esta etapa, debido al estado de condensación y acortamiento de los cromosomas, el número de bandas C detectables se ha visto un tanto restringido.

En la fotografía nº3 se puede observar una placa mitótica de un núcleo maculino de D. filaria ( $2n= 11$ ). El cariotipo se ha realizado atendiendo al patrón de bandas encontrado (Lam. 3).

El par nº1 presenta bandas C correspondientes a los centrómeros, un gran bloque heterocromático y bandas C teloméricas, no presentándose variabilidad cuantitativa en el bloque heterocromático.

El segundo par de homólogos localiza la constricción primaria (centrómero) en la zona terminal superior, apareciendo el bloque de heterocromatina C intersticialmente, que muestra una notable variabilidad cuantitativa. Ambos homólogos exhiben bandas C teloméricas inferiores.

El par nº3 presenta en uno de los homólogos una pequeña banda débilmente teñida por debajo de la heterocromatina centromérica. Por otra parte, el bloque de heterocromatina constitutiva se localiza en la zona intersticial del cromosoma, no observándose variabilidad alguna en esta región. A continuación de este se puede ver una banda no muy densamente teñida y bandas C distales.

El par de homólogos designado como par nº4 presenta bandas C terminales correspondientes a los centrómeros, homología del bloque heterocromático y carencia de bandas teloméricas.

El último par (nº5) posee el centrómero entre dos bandas C terminales, el bloque heterocromático es ligeramente distal y se observan bandas C teloméricas.

El cromosoma sexual es un t-cromosoma que posee un pequeño bloque heterocromático localizado en una región ligeramente intersticial, así como una pequeña banda situada más distalmente.

#### 4.2.1.1.c.- metafase mitótica, hembra.

El estudio de las bandas C en metafase mitótica también se ha realizado en ejemplares hembras de D. filaria (Foto 4 y 5).

Haciendo un estudio conjunto de ambas placas se puede resumir que el par nº1 se presenta como t-cromosomas poseyendo un bloque heterocromático, localizado en la región intersticial, que muestra una ligera variabilidad. Este par 1 posee a su vez bandas teloméricas (Lam. 4 y 5).

El segundo par de homólogos se manifiesta muy semejante al anterior, con el bloque heterocromático de tamaño un poco menor. El centrómero se observa como una constricción entre dos bandas terminales (Lam. 4).

El par nº3 de cromosomas homólogos (de menor tamaño) pre



senta una sola banda C terminal correspondiente al centrómero en la Lám. 4 , mientras que en la 5 se observan dos bandas proximales. En el otro extremo cromosómico aparece una banda C telomérica.

El cuarto par de cromosomas posee una sola banda terminal centromérica y bloque heterocromático. Se mantiene la ausencia en este par de homólogos de bandas C teloméricas.

El par de cromosomas nº5 tiene bandas C terminales, entre las cuales se observa una constricción correspondiente al centrómero (Lam. 4). El bloque de heterocromatina está localizado intersticialmente. También se observan bandas C teloméricas.

Los cromosomas X se presentan heterocigóticos. En la Lam. 5 uno de los cromosomas X (el de mayor tamaño) posee una región intensamente teñida correspondiente al bloque heterocromático. No se distingue el centrómero claramente, pudiéndose localizar en la región terminal. El homólogo a este cromosoma X es visiblemente de menor tamaño, no apreciándose la presencia de bandas C.

En la Lam. 4 uno de los cromosomas X presenta dos bandas C terminales separadas por una constricción pequeña (centrómero). El bloque de heterocromatina se localiza distalmente. El homólogo es de menor tamaño, no apreciándose presencia de bandas C.

#### 4.2.1.1.d.- Diacinesis.

El patrón de bandas C correspondiente de D. filaria tam

bien se ha realizado en el estadio de diacinesis, en ejemplares machos de esta especie (Foto 6).

La interpretación de las figuras presentes en esta fotografía se ha llevado a cabo teniendo en cuenta la localización del quiasma, bloque heterocromático y centrómero.

El bivalente nº1 presenta quiasma terminal con el bloque heterocromático muy proximo; este presenta variabilidad cuantitativa. Los centrómeros se localizan distalmente respecto del quiasma. Hay que significar la presencia de satélites en este par.

El bivalente nº2 exhibe un quiasma subterminal, se hace evidente la presencia del bloque de heterocromatina constitutiva y bandas C terminales, más patentes en uno de los brazos cromosómicos.

El bivalente nº3 desarrolla un quiasma terminal, presentando el bloque heterocromático muy proximo a él, Existe una ligera variación cuantitativa con respecto a este bloque. Se hace evidente la presencia de satélites y una banda débilmente teñida correspondiente al centrómero.

El bivalente nº4 se comporta de igual manera que el bivalente nº2.

El último bivalente (nº5) se muestra heterocigótico para un trozo de segmento terminal envolviendo al centrómero. Por otra parte, se observa una variabilidad cuantitativa, claramente ostensi

ble, con respecto al bloque heterocromático.

El cromosoma sexual (t-cromosoma) posee una banda C terminal y el bloque de heterocromatina localizado intersticialmente.

#### 4.2.1.2.- Bando G.

El estudio de las bandas G en D. filaria se ha llevado a cabo en núcleos masculinos y femeninos que se encuentran en estado de profase y metafase mitótica.

##### 4.2.1.2.a.- Profase mitótica macho.

En la fotografía 7 se puede observar un núcleo masculino en el estadio de profase mitótica. El cariotipo ha sido confeccionado atendiendo al patrón de bandas presentes en cada homólogo (Lam. 7).

El par nº1 exhibe dos bandas terminales, no se pueden distinguir claramente las bandas existentes en el bloque heterocromático, que es de gran tamaño. Hay que resaltar la presencia de cuatro bandas terminales.

El par nº2 presenta una banda terminal seguida de dos bandas. El bloque heterocromático se encuentra localizado distalmente, apreciándose una gran banda terminal.

El par de homólogos nº3 tiene una banda proximal seguida de otra banda y el heterocromático es proximal, al que se adosa una pequeña banda G. Es claramente ostensible la presencia de tres

bandas G distales.

El cuarto par de homólogos muestra una banda terminal en la región anterior, fuertemente teñida, que va seguida de otra pequeña banda. El bloque heterocromático es de gran tamaño y se sitúa intersticialmente. Uno de los homólogos posee una banda terminal, ausente en el otro.

El par nº5 exhibe dos bandas G adosadas una a otra y situadas proximalmente. El bloque heterocromático está situado intersticialmente, entre ambas estructuras se localiza una pequeña banda débilmente teñida. Por detrás del bloque se puede vislumbrar la presencia de una pequeña banda, Débilmente teñida, seguida de dos bandas distales.

El cromosoma sexual presenta una banda terminal superior intensamente teñida, una interbanda y una gran banda. El bloque heterocromático se sitúa intersticialmente y tras él se localizan cuatro bandas, las dos más proximas muy pobremente teñidas y las dos más distales muy manifiestas.

#### 4.2.1.2.b.- Metafase mitótica, macho.

Con la aplicación de las técnicas de bandeo G a los núcleos masculinos en el estadio de metafase mitótica, se obtienen los resultados que se pueden apreciar en la Fotografía 8. el patrón de bandas G obtenido, a partir de estos, figura en la Lámina 8.

En el primer par de homólogos se puede constatar la presencia en ellos de dos bandas proximales, seguidas de una interbanda y del bloque heterocromático que aparece bandeado con cuatro bandas, distalmente presentan dos bandas, una de ellas más fuertemente teñida.

el par nº2 exhibe dos bandas proximales, seguidas del bloque heterocromático que parece estar compuesto por tres bandas. Seguidamente se ponen de relieve dos bandas distales en uno de los homólogos, mientras que el otro presenta una sola banda y un satélite.

El par nº3 no se muestra homocigótico, y así, mientras uno de los homólogos exhibe cuatro bandas adosadas, una clara interbanda seguida de otras cuatro bandas, el otro homólogo presenta tres bandas proximales, un bloque heterocromático compuesto por tres bandas adosadas y una banda terminal fuertemente teñida.

El par nº4 se aprecia formado por dos bandas proximales, una gran interbanda, dos bandas fuertemente teñidas (bloque heterocromático), una pequeña banda y otra más distal.

El par nº5 muestra tres bandas proximales, el bloque heterocromático formado por dos bandas, una interbanda claramente visible y dos bandas terminales.

El cromosoma sexual presenta el siguiente patrón de bandas: una banda proximal de gran tamaño, una interbanda, una banda

gruesa, otra más pequeña y un bloque fuertemente teñido separado, mediante una interbanda, de una banda final densamente teñida.

#### 4.2.1.2.c.- Profase mitótica, hembra.

El patrón de bandas G también es estudiado en núcleos femeninos de D. filaria en el estado de profase mitótica (Foto y Lam. 9).

El par de homólogos nº1 manifiesta dos bandas intensamente teñidas en la zona proximal, seguidas de otra débilmente teñida. El bloque heterocromático parece estar formado por cuatro bandas adosadas unas a otras. A continuación se observa una interbanda y dos bandas distales.

El par nº2 exhibe tres bandas intensamente teñidas, seguidas de una interbanda. A continuación se observa un bloque, que parece estar formado por tres bandas y que se encuentra separado mediante una clara interbanda de otra banda distal.

El par nº3 se presenta con dos bandas densamente teñidas en la zona proximal, un bloque formado por dos bandas y otras dos que se encuentran situadas distalmente.

El cuarto par de homólogos posee una banda proximal seguida de una interbanda, un bloque heterocromático que se encuentra constituido por tres bandas y finalmente se presenta una banda distal localizada subterminalmente.

El par nº5 presenta tres bandas proximales, una gran banda intensamente teñida y dos bandas distales.

Los cromosomas sexuales poseen dos bandas proximales, una gran banda intersticial, una interbanda, otro pequeño bloque teñido muy denso y una pequeña banda terminal.

#### 4.2.1.3.- Bando N.

Los resultados obtenidos tras la aplicación de las técnicas de bando N se pueden examinar en la Fotografía 10.

El cariotipo ha sido realizado de acuerdo al patrón de bandas observado.

El par nº1 se manifiesta de gran tamaño y con una región fuertemente teñida localizada en la parte subterminal del cromosoma.

El par nº2 exhibe esta misma región situada en la zona terminal.

En el par nº3 se puede observar una pequeña región intensamente teñida en la zona terminal.

El par nº4 se muestra totalmente heterocigótico no observándose diferenciación de bandas.

El último par presenta la mitad de la longitud cromosómica densamente teñida.

El cromosoma X se presenta heterocigótico y de pequeño

tamaño.

#### 4.2.2.- Chabertia ovina.

El estudio de las técnicas de bandeo C también se ha llevado a cabo en placas mitóticas de ejemplares hembras de esta especie.

Del cariotipo realizado se desprende lo siguiente:

El par nº1 presenta bandas C negativas en la región terminal superior del cromosoma. En su región central se observa una constricción débilmente teñida, que ha sido considerada como el centrómero.

El par nº2 muestra una banda C fuertemente teñida en su mitad superior.

El tercer par de cromosomas presenta la misma característica que el anterior par de cromosomas homólogos.

El par nº 4 posee bandas C negativas, encontrándose esta zona no teñida en contacto con el nucleolo. En su mitad superior está localizado un punto intensamente teñido que se correspondería con el centrómero.

El par nº5 no presenta patrón de bandas característico. El par nº6 tiene dos bandas fuertemente teñidas en la región terminal inferior de cada uno de los homólogos, mientras que en el otro se muestra como un bloque compacto.

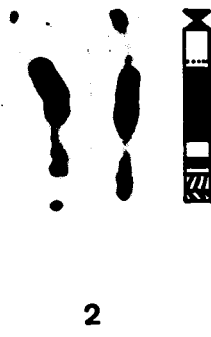
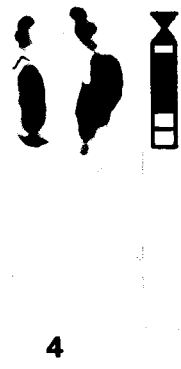




f.1

FOTOGRAFIA 1.- Profase mitótica de una hembra de Dictyocaulus filaria.

LAMINA 1.- Cariotipo y representación esquemática del patrón de bandas C.



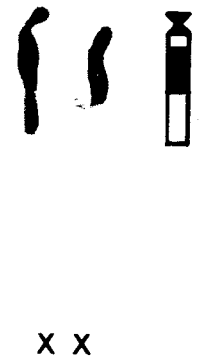
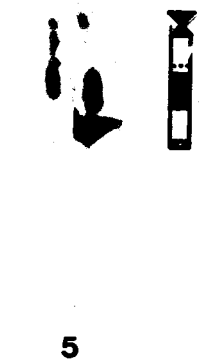
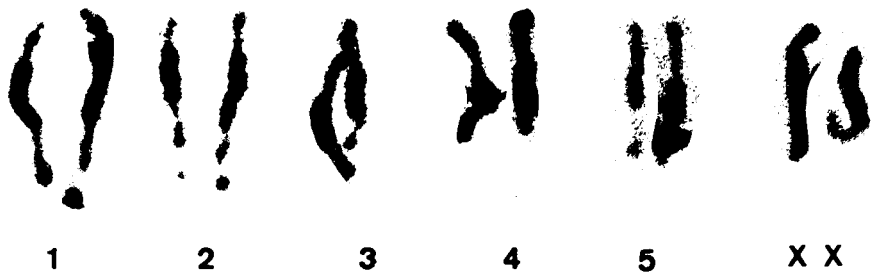
lamina 1



**f.2**

FOTOGRAFIA 2.- Profase mitótica de una hembra de Dictyocaulus filaria.

LAMINA 2.- Cariotipo y representación esquemática de las bandas C.

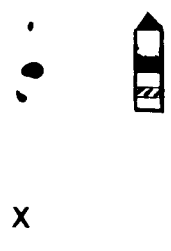
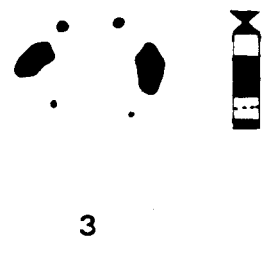
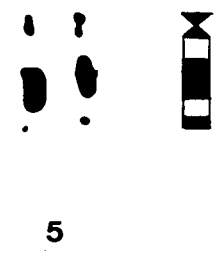
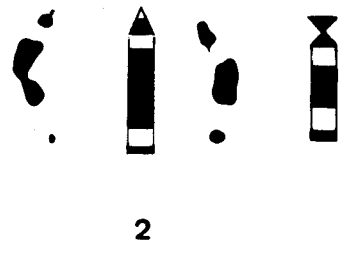
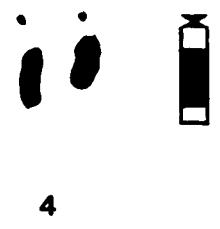
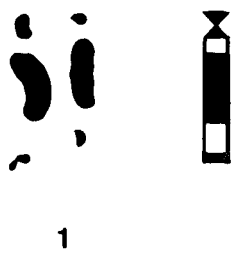
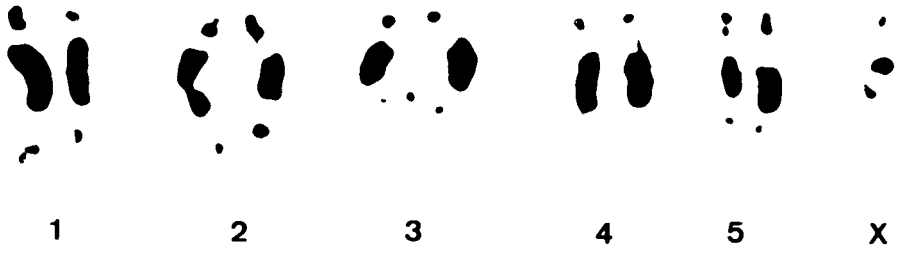




f.3

FOTOGRAFIA 3.- Metafase mitótica de un macho de Dictyocaulus filaria.

LAMINA 3.- Cariotipo y representación esquemática del patrón de bandas C.





f.4

FOTOGRAFIA 4.- Metafase mitótica de una hembra de Dicotycaulus filaria.

LAMINA 4.- Cariotipo y representación esquemática del patrón de bandas C.



1

2

3

4

5

X X



1



4



2



5



3



X

X

lamina 4



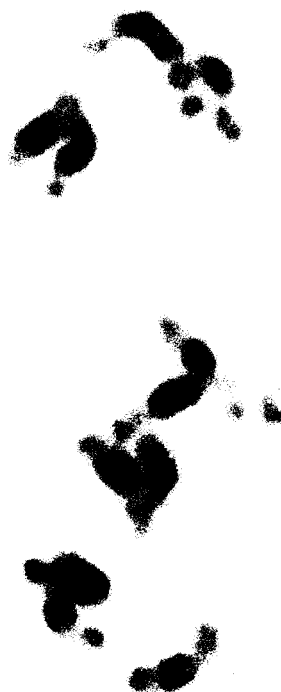


f. 5

FOTOGRAFIA 5.- Metafase mitótica de una hembra de Dicotylocaulus filaria.

LAMINA 5.- Cariotipo y representación esquemática del patrón de bandas C.





**f.6**

FOTOGRAFIA 6.- Diacinesis de un núcleo masculino de Dictyocaulus filaria

LAMINA 6.- Representación esquemática de los bivalentes tras la aplicación de la técnica de bandeó C.



1



2



3



4



5



X

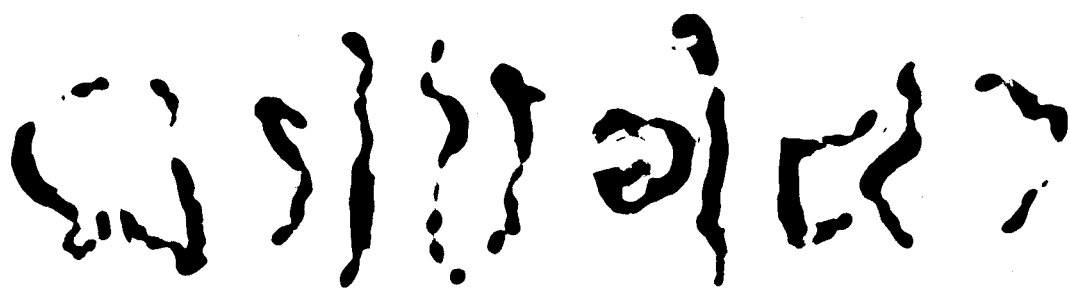




f.7

FOTOGRAFIA 7.- Profase mitótica de un núcleo masculino de D. filaria.

LAMINA 7.- Cariotipo y representación esquemática del patrón de bandas G.



1

2

3

4

5

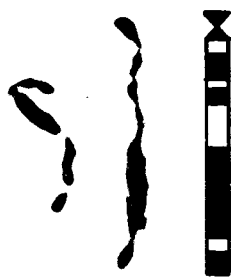
X



1



4



2



5



3



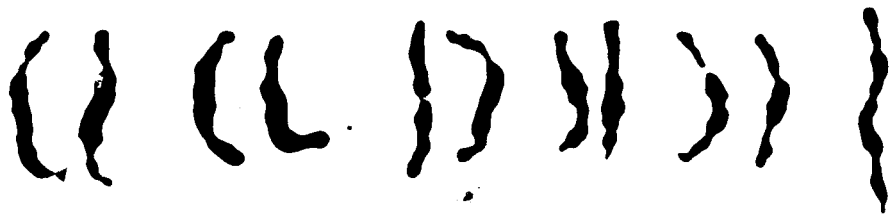
X



f. 8

FOTOGRAFIA 8.- Metafase mitótica de un macho de Dictyo-  
caulus filaria.

LAMINA 8.- Cariotipo y representación esquemática del  
patrón de bandas G.



1

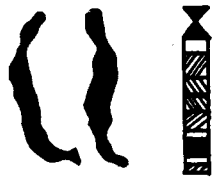
2

3

4

5

X



1



4



2



5

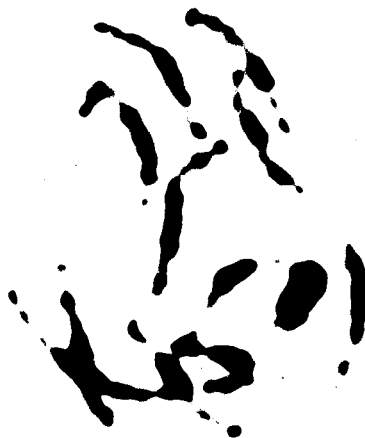


3



X

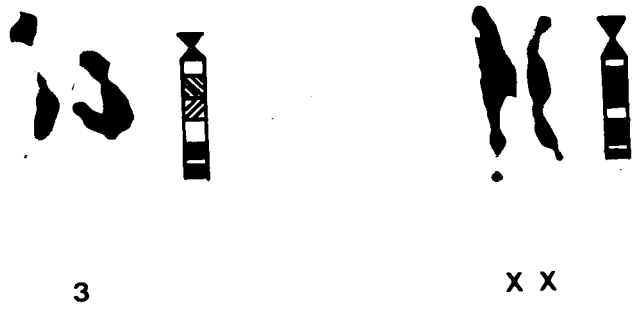
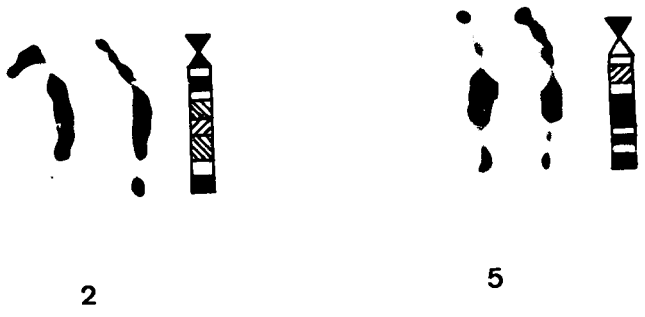
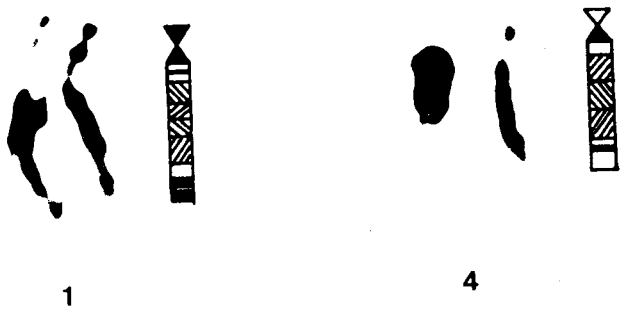




f.9

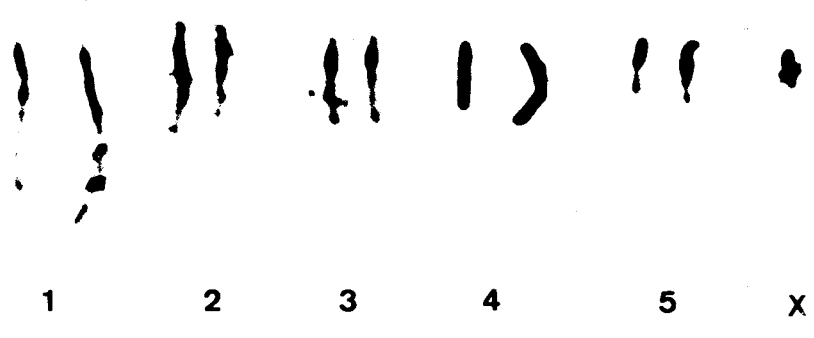
FOTOGRAFIA 9.- Metafase mitótica de una hembra de Dictyocaulus filaria.

LAMINA 9.- Cariotipo y representación esquemática del patrón de bandas G.





A



B

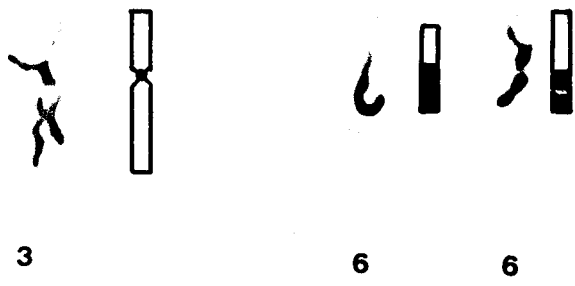
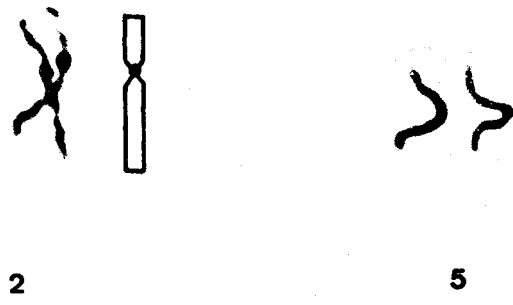
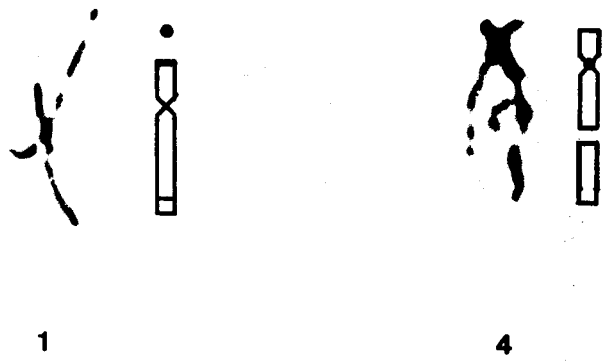
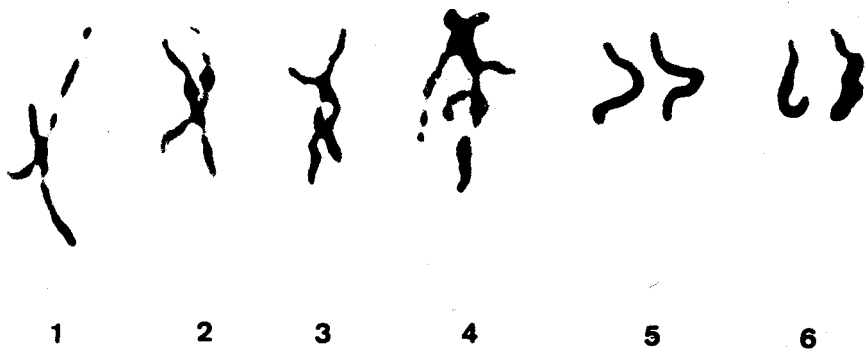
FOTOGRAFIA 10.- A.- Metafase mitótica de un núcleo masculino de D. filaria.  
B.- Cariotipo realizado según el patrón de bandas N obtenido.



**f.11**

FOTOGRAFIA 11.- Metafase mitótica de un núcleo femenino de Chabertia ovina.

LAMINA 11.-Cariotipo y representación esquemática del patrón de bandas C.



## 5.- DISCUSION.

### 5.1.- TECNICAS DE BANDEO.

#### 5.1.1.- Bandeo C.

Con el fin de estandarizar una técnica de bandeo C aplicable a los nematodos parásitos, se han ensayado varios procedimientos destinados a poder hacer una comparación, lo más completa posible, que nos haga inclinarnos por la aceptación de una u otra como técnica de rutina en el Laboratorio de Parasitología.

El primer paso a llevar a cabo antes de la aplicación de este proceso de bandeo es la fijación de los cromosomas. Atendiendo a Comings (1978) (7) quien destaca la necesidad de una fijación con metanol-acético (3:1) para poder obtener un patrón de bandas C, se ha considerado oportuno la utilización de este fijador y no de otros ( como podría ser formaldehído) como fijador estándar en cualquiera de las técnicas aplicadas. No obstante, ha sido considerado oportuno ensayar distintos tiempos de fijación.

Comings y Avelino (1974) (6) concluyen que para poder obtener bandeo C es necesario el tratamiento ácido, a fin de extraer las histonas. McKenzie y Lubs (1973) (36) indican que "solamente el tratamiento con ácido Clorhídrico 0,2N durante 15-30 min. da bandas C satisfactorias". Por ello se ha considerado oportuno incluir este paso en todas las técnicas A de bandeo C, respetando el tiempo dado

por Sumner (1972) (62).

El paso más crítico de esta técnica (según Sumner, 1972) (62) es el tratamiento con hidróxido de Bario al 5%, debido que a 60°C requiere tiempos muy breves de exposición, lo cual hace muy difícil un control exacto. Por contra, un tratamiento a 37°C permite una mayor maniobrabilidad obteniéndose resultados equiparables. Por ello han sido ensayadas ambas temperaturas.

Como último paso las preparaciones han sido sometidas a una solución salina (2xSSC).

Con respecto a la tinción con colorante se han ensayado distintos tiempos.

A la vista de los resultados obtenidos tras la aplicación de la técnica A y sus modificaciones (A.1, A.2) no podemos inclinarnos a favor de ninguna de ellas, pues el patrón de bandas que se observa es similar y equiparables en todos los casos.

La supresión, tanto del tratamiento con ac. Clorhídrico como de la incubación con hidróxido de Bario, considerados como pasos importantes para la obtención de bandas C, y su sustitución por un tratamiento con Tripsina no varía en nada las estructuras observadas con las técnicas derivadas de la de Sumner. Siguiendo la técnica de Luciani y col. (1975) (33) el patrón de bandas C obtenido es comparable al conseguido con las técnicas A, pero es de destacar como esta técnica, ejecutada por su autor para la obtención de bandas G,

pone de relieve en los cromosomas de D. filaria bandas C. Para asegurar la aparición de bandas C introducimos una modificación (B.2) basada en el trabajo publicado por Merrick y col. (1973) (39), los cuales obtienen un patrón de bandas C en cromosomas humanos, mediante la prolongación del tratamiento con Tripsina, se puede observar la presencia de bandas G en algunos cromosomas del complemento (Lam. 2.C), en tanto que en otros si se observan bandas C.

En función de los resultados conseguidos mediante la aplicación de las distintas técnicas de bandeo, podemos afirmar que el patrón de bandas C obtenido en los cromosomas de D. filaria es muy semejante en todos los casos.

Nosotros consideramos que ninguna de las técnicas ensayadas presenta grandes ventajas en cuanto al manejo en el laboratorio, pues si bien, la técnica A.2 supone un ahorro relativo en el tiempo de realización de la misma, la técnica B.2 requiere menos pasos en su ejecución, pero posee el inconveniente de lo costoso del reactivo, poco margen de maniobrabilidad y mayor consumo de tiempo.

#### 5.1.2.- Bandeo G.

Las técnicas de bandeo G ensayadas han sido las de Schnedl (1974) (55) (Técnica C), Galdimore y Richardson (1973) (19) (Técnica D) y Comings y Avelino (1974) (6) (Técnica E).

La técnica C (Schnedl) fue elegida en un principio debi



do a su sencillez ya que se basa en el tratamiento con hidróxido de Sodio 0,07N e incubación en buffer Sorensen; a la vista de los resultados obtenidos con esta técnica (Fig. 3) no parece ser la más indicada para la obtención de un buen patrón de bandas G en D. filaria, ya que como se puede observar, algunos cromosomas del complemento presentan zonas teñidas equiparables con las obtenidas tras la aplicación de las técnicas de bandeado C.

Gallimore y Richardson (1973) (19) probaron las distintas técnicas de bandeado Giemsa existentes sobre Rattus norvegicus, obteniendo resultados pocos satisfactorios debido a la pérdida de la morfología cromosómica o a la ausencia de bandas claras (distintas); por ello, desarrollaron una técnica basada en la exposición de las preparaciones a 2xSSC y Tripsina, que es la utilizada por nosotros.

El paso previo a la ejecución de las técnicas de bandeado G es la realización de una tinción convencional con Giemsa al 1% durante 15-20 minutos, ya que parece estar comprobado que cromosomas tratados con soluciones muy diluidas de Giemsa durante un tiempo prolongado, presentan bandas G (McKay, 1973) (35). Nosotros tomamos las coordenadas más interesantes, así obtenidas, para aplicarles la técnica D, siendo previamente desteñidas las preparaciones según se indica en Material y Metodos.

Los resultados obtenidos con la técnica D no se presen-

tan homogéneos, pues en algunos casos el patrón de bandas G es muy similar al de la tinción convencional por lo que cabría decir que no ofrece muchas ventajas; no obstante, en otros casos se pueden visualizar verdaderas bandas G en los cromosomas de D. filaria. los factores más importantes a tener en cuenta en esta técnica son la concentración de la solución de Tripsina y la temperatura de incubación de la misma. Así, parece ser, que los mejores resultados de bandeo G se obtienen a una concentración de Tripsina del 1% a 10°C de temperatura. Esto quizás sea la causa que al aplicar la técnica de Luciani y col. (Tripsina 0.25%, 18°C) a los cromosomas de D. filaria se observara bandeo C en algunos de ellos.

Posteriormente a la aplicación de esta técnica las preparaciones son deteñidas para aplicarles la técnica E (Comings y Avellino, 1974) (6), en la que se introduce un tratamiento previo con ac. Clorhídrico 0,2N. Las placas observadas posteriormente a este tratamiento, muestran los cromosomas, en algunos casos, hinchados e incluso, en muchos casos, se llega a la desaparición de los cromosomas.

#### 5.1.3.- Bandeo N.

La técnica de bandeo N desarrollada por Matsui y Sasaki en 1973 (38), se basa en el tratamiento con ac. Tricloroacético (TCA) al 5% y ac. Clorhídrico a altas temperaturas, con el fin de eliminar

selectivamente ADN, ARN e histonas de las preparaciones citológicas. No obstante, estos autores ya reseñaban que el tratamiento con ácido Clorhídrico frecuentemente producía la destrucción de la morfología detallada de los cromosomas, lo que enmascaraba el perfil de bandas N.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, tras la aplicación de esta técnica (F), concuerdan en gran parte con los dados anteriormente por estos autores, ya que se puede observar como los cromosomas de D. filaria sufren alteraciones morfológicas que hacen prácticamente imperceptible la localización de la región organizadora del nucleolo (RON) (Fig. 7.A). No obstante, este hecho, si bien fue el más frecuente, no se presenta en todos los casos, pudiéndose encontrar algunas placas en las que los cromosomas exhiben regiones concretas teñidas selectivamente con esta técnica.

En resumen, con las técnicas ensayadas para la obtención de bandas C, G y N en nematodes parásitos se han conseguido los objetivos propuestos, determinar los patrones de bandas C, G y N en este material cromosómico. Pero los resultados obtenidos en todos los casos coinciden en dos aspectos: la heterogeneidad de los mismos, incluso dentro de una misma placa cromosómica, y la influencia que sobre los resultados ejerce la propia fase en que se encuentran los cromosomas.

Esto significa que para la obtención de bandas C, G y N, aplicando cualquiera de los metodos ensayados, es imprescindible re

coger y estudiar una gran cantidad de material parasitológico para de esta manera, encontrar placas suficientes en condiciones óptimas de estudio. A modo de ejemplo de lo anteriormente indicado diremos que para conseguir los resultados genéticos reflejados más adelante, ha sido necesario el estudio una gran cantidad de placas cromosómicas, y la realización de centenares de microfotografías, entre las que se ha seleccionado material suficiente para la realización de los correspondientes cariotipos.

Este problema que presentan las técnicas de bandeo aplicadas a la genética de nematodes quedaría, con toda seguridad, resuelto cuando se pueda disponer de material cromosómico estandarizado tal como ocurre con los estudios cariológicos de mamíferos y otros grupos de seres. Es decir, cuando se disponga de técnicas de cultivo celular de nematodes, cultivos que si permitirían la homogeneización del material celular a utilizar, pero de los que aun se está lejos en cualquier laboratorio parasitológico.

## 5.2.- GENETICA.

### 5.2.1.- D.filaria.

#### 5.2.1.1.- Bando C.

Las técnicas de bandeo C ponen de manifiesto la heterocromatina constitutiva, siendo definida esta como la forma común de

heterocromatina que, normalmente, no cambia su naturaleza, es redundante y se encuentra presente en las proximidades de los centrómeros, telómeros y en las regiones organizadoras del nucleolo (Schulz-Schaeffer, 1980) (56).

La nomenclatura seguida en el presente trabajo ha sido la de Levan y col. (1964) (32); estos autores proponen el uso de los términos mediano y terminal tanto para puntos exactos, como regiones y los designa con letras capitales; mientras que los términos sub-mediano y subterminal, que siempre designan regiones, son designados con letras minúsculas.

La descripción de las bandas se ha realizado atendiendo a Santos y col. (1983) (52), que diferencian entre bandas C positivas y bandas C negativas; dentro de las primeras distinguen entre bandas paracentroméricas, bandas terminales y bandas intersticiales.

Haciendo un estudio comparativo del patrón de bandas C obtenido en el estadio de profase mitótica de ejemplares hembras de D. filaria hay que reseñar que se han observado bandas C positivas paracentroméricas, intersticiales y terminales; así como bandas C negativas en algunos de los cromosomas del complemento. En el caso de D. filaria hay que hablar de una distribución equilocal de la heterocromatina puesto que la heterocromatina de los cromosomas no homólogos tiende a estar localizada en regiones similares con bastante regularidad. Este hecho ha sido reseñado por King y John (1980)

(29) para los cariotipos de algunas plantas, así como en diferentes especies del género Drosophila.

Las bandas C paracentroméricas han sido observadas como dos regiones fuertemente teñidas entre las cuales se observa una constricción, que se ha interpretado como el lugar del centrómero y que en todos los cromosomas se localiza en las regiones terminales, son por tanto t-cromosomas (Levan y col., 1964) (32).

Por otra parte, se han observado dos tipos de bandas C intersticiales: uno de ellos representado por pequeñas bandas, localizadas tanto en zonas cercanas al centrómero, como distalmente, y por lo general débilmente teñidas, el otro por grandes bloques de heterocromatina constitutiva situados, normalmente, en posición media. Los bloques heterocromáticos no presentan en todos los casos un tamaño uniforme, pudiéndose apreciar variaciones cuantitativas incluso dentro del mismo par de homólogos. Este hecho ha sido comentado por otros autores (Santos y col., 1983; King y John, 1980) (52) (29) en cromosomas de acridoideos aludiendo a la naturaleza dinámica de este tipo de heterocromatina, que hace que puedan observarse tanto variaciones cuantitativas como cualitativas.

La existencia de bandas C negativas se ha podido constatar en los pares 1 y 2 (Lam. 1 y 2) y esta característica no es siempre observable, tal como ocurre en el par 1 representado en la Lam. 1, lo que puede ser debido a un efecto de condensación que impida su

visualización. Estas bandas se localizan subterminalmente, distales respecto al bloque, y parecen corresponderse con las regiones organizadoras del nucleolo (Scmid, 1978 a y b) (53 y 54). Esta correlación entre bloques C y regiones organizadoras del nucleolo, detectadas en D. filaria, coincide con las observaciones de Mandahl (34) quien sugiere que al menos en algunos de los cromosomas los NOR están localizados distalmente respecto a los bloques C.

Las bandas terminales, también denominadas teloméricas, se encuentran presentes en todos los pares de homólogos excepto en el par 4.

Las bandas C observadas en núcleos masculinos y femeninos en el estadio de metafase mitótica presentan un patrón muy similar entre sí y semejante al obtenido en profase. No obstante, las bandas intersticiales, débilmente teñidas en profase mitótica, en metafase se hacen imperceptibles. Este hecho es debido a una mayor condensación cromosómica que puede dar lugar a la pérdida de resolución de bandas finas o también a la unión de bandas estrechamente asociadas (Ray y Venketeswaran, 1978) (47). Es por ello, por lo que en algunos homólogos se ha representado el centrómero con una sola banda paracentromérica, en lugar de dos, atendiendo estrictamente a lo observado en la microfotografía.

El cromosoma X en el macho de D. filaria presenta el bloque heterocromático en la región intersticial. En los núcleos femeninos este cromosoma se presenta heterocigótico en algunas de las

placas observadas (Lam. 4 y 5).

No se han observado bandas C negativas en este estadio de metafase mitótica.

El estudio del bandeo C en el estadio de diacinesis se ha llevado a cabo, en base a que, al parecer, existe una gran relación entre la localización de este tipo de bandas y la del quiasma dentro del bivalente. Según Santos y Giráldez (1978) (51) se puede distinguir dos tipos de quiasmas: proximal (entre la banda intersticial y el centrómero) y distal (entre la banda intersticial y el telómero). En el caso de D. filaria los quiasmas se localizan distalmente y en posición terminal o subterminal. La heterocromatina C intersticial se puede observar como grandes bloques situados en las cercanías del quiasma. Parece ser que la presencia de grandes bloques de heterocromatina es causa de la reducida frecuencia de quiasmas. De hecho, se ha demostrado que la heterocromatina influye en el crossing-over en un gran número de seres vivos (John y Miklos, 1979) (28).

Hutchinson y col. (1972) (27) resaltan una estrecha relación entre baja frecuencia de quiasmas y grandes bloques heterocromáticos, aunque indican que deben existir otros factores que también influyen en la frecuencia de quiasmas. Este mismo hecho ha podido ser comprobado en D. filaria, este nematode parásito presenta los quiasmas en posiciones terminales y subterminales y desarrolla siem



pre un solo quiasma por bivalente, por lo que tiene una baja frecuencia de quiasmas (Cutillas y col., 1985, c) (11) asociada a la existencia de grandes bloques heterocromáticos.

Por otra parte King y John (1980) aseguran que la escasez de bandas C en las regiones intersticiales de muchas especies, puede también encontrar alguna relación al hecho de que los sitios principales de recombinación en éstas están dentro de tales regiones.

En los bivalentes 1 y 3 (Lam. 6) se puede observar la presencia de satélites unidos al resto del bivalente por regiones débilmente teñidas. Estas regiones se han considerado como organizadoras del nucleolo.

#### 5.2.1.2.- Bando G.

El estudio de las bandas en D. filaria se ha realizado en los estadios de profase y metafase mitótica; en el primer caso en núcleos masculinos, en el segundo en núcleos masculinos y femeninos.

El patrón de bandas G en D. filaria en el estadio de profase mitótica se puede observar en la Lámina 7. Hay que resaltar la presencia de los grandes bloques de heterocromatina en cada uno de los miembros del conjunto cromosómico. Los cromómeros se pueden ver a manera de cuentas de un collar distribuidos a lo largo de la longitud del cromosoma.

En metafase mitótica es posible hacer un estudio comparativo del núcleo masculino y femenino, manifestandose una gran similitud entre las bandas G correspondientes a los mismos pares de homólogos. Este hecho ha sido puesto de manifiesto por Schnedl (1974) (55) quien afirma que los patrones de bandeo Q, G o R de las cromátidas son bastantes constantes en la evolución. La relativa constancia del comportamiento de las bandas Q, G o R en la evolución sugiere al autor que las mismas encierran un alto significado genético.

A lo largo de la historia, muchos autores han discutido sobre la interpretación y significado de las bandas G. Puesto que las bandas G corresponden a los patrones cromoméricos meióticos en paquitene (Okada y Comings, 1974) (40), no hay duda que este tipo de bandeo refleja una organización estructural inherente normal del cromosoma (Burkholder y Duczek, 1982). Por otra parte Luciani y col. (1975) (33) afirman que la equivalencia de los cromómeros y los patrones de bandas G sugiere que estos últimos corresponden a una ordenación y repartición de las fibras nucleoproteicas en el estadio nativo y no son necesariamente inducidas por tratamientos pos-fijación.

Haciendo un estudio comparativo del patrón de bandas observado en profase y metafase mitótica en D. filaria se puede apreciar que el número de bandas presentes no es el mismo y esto es debido a que "el número de bandas G presentes en los cromosomas en metafase temprana es superior al detectable en el estadio de meta-

fase tardía. Dado que la contracción cromosómica progresa, las bandas parecen unirse en forma que una banda de gran tamaño presente en un cromosoma en metafase tardía puede ser el resultado de la unión de tres bandas más pequeñas claramente visibles, en el mismo cromosoma, en metafase temprana" (Gallimore y Richardson, 1973) (19).

#### 5.2.1.3.- Bando N.

Cuando los cromosomas en profase o metafase son teñidos con colorantes clásicos tales como Giemsa u Orceína acética, normalmente aparecen dos tipos de constricciones: la primera es la constricción primaria o centrómero, la segunda, la constricción secundaria, que es altamente variable en número y localización de especie a especie, pero dentro de un cariotipo dado, es relativamente constante (Hsu y col., 1967) (26). Hoy día se sabe que muchas constricciones secundarias representan la localización de ADNr.

Puesto que las técnicas de "bandas N" envuelven la extracción de macromoléculas, dejando solamente las proteínas no histonas, se interpreta que ciertas proteínas residuales específicamente ligadas al organizador nucleolar son selectivamente teñidas (Matsui y Sasaki, 1973) (38). La constante detección de regiones teñidas diferencialmente (bandas N) tanto en núcleos metabólicamente activos como inactivos, lleva a la conclusión de que representan un elemento estructural más que un producto primario de genes (Funaki, 1974) (37).

El estudio de las bandas N en un núcleo masculino de D. filaria revela la existencia de heterocromatina constitutiva, que se visualiza como regiones densamente teñidas en todos los cromosomas del complemento. Estas regiones se han identificado como las regiones organizadoras del nucleolo, tanto activas como inactivas, siendo su localización dentro de un mismo par de homólogos constante, y muy fácilmente identificable..

#### 5.2.2.- Ch. ovina.

El estudio de los cromosomas en núcleos femeninos de Ch. ovina revela un número diploide  $2n= 12$ . Este hecho concuerda con el dato dado por Lejambre (1968) (31). Este autor manifiesta que los seis pares de cromosomas de esta especie parecen ser similares en tamaño y forma durante la metafase y que en ese estado son indistinguibles unos de otros. Este hecho ha podido ser subsanado tras la aplicación de las técnicas de bandeado C, pues los cromosomas se presentan con características definidas que hace que se pueda realizar el cariotipo correspondiente , de acuerdo con éstas.

El par nº1 se ha definido como un sm-cromosoma atendiendo a la localización del centrómero en la región submediana. La zona terminal posee una banda C negativa, que hemos considerado correspondiente con la región organizadora del nucleolo. Esta región también se puede observar en el par nº4 (sm-cromosoma) en contacto con

el nucleolo, pero localizada en una zona por debajo del punto medio del cromosoma.

Los pares nº2 y 3 son tambien sm-cromosomas, mientras que el par nº5 no manifiesta ninguna región teñida diferencialmente.

El par nº6 presenta variabilidad en cuanto a las bandas C observadas.

## 6.- CONCLUSIONES.

- 1.- Ninguna de las modificaciones introducidas a las técnicas originales de Sumner y de Luciani y col. (prolongación del tratamiento con hidróxido de Bario, variación de la temperatura del mismo, tiempo de tinción, incubación en 2xSSC y prolongación del tratamiento con Tripsina), mejoran los resultados obtenidos en la consecución de bandas C, en el material parasitológico utilizado, por eso se concluye que la técnica original de Sumner puede ser aplicada a estudios sistemáticos del material cromosómico de nematodos parásitos.
- 2.- La técnica de Schnedl aplicada al estudio de bandeo G en nematodos parásitos no permite, en este material, la consecución de un patrón de bandas G, por lo que pensamos no debe aplicarse en este tipo de estudio. Lo mismo cabe decir de la técnica de Comings y Avelino, en este caso por las graves alteraciones morfológicas producidas en el material cromosómico, al menos en las condiciones de nuestro estudio.
- 3.- La técnica de bandeo G desarrollada por Gallimore y Richardson y aplicada a nuestro material, sí permite la obtención en él de patrones de bandas G suficientemente marcados, siendo esta técnica la recomendada a la vista de los resultados experimentales.
- 4.- La técnica de Matsui y Sasaki para bandeo N,da, al aplicarse a cromosomas de nematodos parásitos, resultados comparables a los

- obtenidos por los autores anteriormente mencionados en cultivos celulares de diversos mamíferos. Por lo que cabe indicar la posibilidad de utilización de esta técnica.
- 5.- En general, las diferentes técnicas de bandeo C, G y N ensayadas en el presente trabajo sobre material cromosómico de nematodos parásitos, cumplen los objetivos para los que originalmente fueron desarrolladas, permitiendo la obtención de patrones de bandas C, G y N suficientemente claros. No obstante, en todos los casos, la calidad de los resultados obtenidos se ha visto muy influenciada por la etapa de la división en la que se encuentra el propio material cromosómico. Siendo necesario la continuación de estos estudios, a fin de desarrollar una técnica específica para la estandarización de los procesos mitóticos en el material a estudiar.
- 6.- Las técnicas de bandeo C ensayadas en el caso de D. filaria ponen de manifiesto la existencia de bandas C paracentroméricas, localizadas en las regiones subterminales de todos los cromosomas del complemento, son t-cromosomas; bandas C terminales en todos los pares de homólogos, excepto en el par 4; bloque heterocromático localizado en la zona intersticial y existencia de bandas C negativas en los pares 1 y 2 del conjunto cromosómico.
- 7.- Dado que la heterocromatina constitutiva de los cromosomas no homólogos se localiza en regiones similares con bastante regu-

laridad, cabe concluir que existe una distribución equilocal de la heterocromatina.

- 8.- Los quiasmas desarrollados por los bivalentes en el estadio de diacinesis son siempre distales para todos ellos, localizándose el bloque heterocromático en las regiones anexas a aquéllos.
- 9.- Las técnicas de bandeo G ensayadas en cromosomas de D. filaria revelan el patrón cromomérico en los pares de homólogos del conjunto cromosómico y los resultados obtenidos ponen de manifiesto, claramente, la influencia que sobre la calidad de los patrones de bandas G obtenidos tiene el estadio mitótico en que se encuentren los cromosomas, siendo especialmente favorable para estos fines el estadio de profase mitótica.
- 10.- La aplicación de las técnicas de bandeo N al conjunto de cromosomas de D. filaria revelan la existencia de regiones organizadoras del nucleolo tanto metabólicamente activas como inactivas en todos los cromosomas del complemento, siendo esta técnica la que más fácilmente permite la identificación de los homólogos en un cariotipo.
- 11.- Las técnicas de bandeo C ensayadas sobre Chabertia ovina manifiestan el carácter submediano de cuatro pares de cromosomas (sm-cromosomas), mientras que el quinto par no manifiesta dicho carácter. A su vez hay que resaltar la existencia de constricciones secundarias en dos pares de homólogos que hemos definido



como cromosomas organizadores del nucleolo.

12.- Como conclusión general hemos de indicar que las técnicas de bandeo permiten la fácil realización del cariotipo en nematodos parásitos, que por los resultados experimentales obtenidos existe estrecha correlación entre morfología cromosómica y especie, y por otra parte, claras diferencias entre los cariotipos de especies distintas, lo que resalta el valor taxonómico de estas técnicas entre los nematodos parásitos.

7.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ARRIGHI, T. E. y T. C. HSU. 1971. Localisation of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics* 10: 81-86.
2. BORING, A. M. 1909. A small chromosome in *Ascaris megalcephala*. *Arch. Zellf.* 4: 120-131.
3. BOVERI, T. 1911. Uber das verhalten der geschlechtschromosomen bei hermaphroditismus. *Verh. Phys. Med. Ges. Wurzburg* 41: 83-97.
4. BURKHOLDER, G. D. y L. L. DUCZEK. 1982. The effect of the chromosome banding techniques on the histone and nonhistone proteins of isolated chromatin. *Canadian J. of Biochem.* 60: 328-337.
5. CARAGNA, S. y C. A. REDI. 1984. Influence of the C-banding procedure on DNA and proteins of mouse chromosomes: I. A microdensitometric study. *Bas. Appl. Histochem.* 28: 67-80.
6. COMINGS, D. E. y E. AVELINO. 1974. Mechanisms of chromosome banding II. Evidence that histones are not involved. *Exp. Cell. Res.* 86: 202- 206.
7. COMINGS, D. E. 1978. Mechanisms of chromosome banding and implications for chromosome structure. *Ann. Rev. Genet.* 12: 25-46.
8. CORTES, F. 1984. Bando de cromosomas. *Investigación y Ciencia* 97: 20-29.
9. CUTILLAS, C., A. VALERO, C. ARIZA Y D. C. GUEVARA. 1985a. Estudio cariológico de *Subulura Brumpti* López Neyra 1922-44. *Rev. Iber. Parasitol.* 45: 175-176.

10. CUTILLAS, C., A. VALERO, J. GONZALEZ-CASTRO y D. C. GUEVARA.  
1985b. Oogenesis en Hammerschmidtella diesingi (Hammerschmidt, 1838) Chitwood, 1932 y Leidynema appendiculata (Leidy, 1850) Chitwood, 1932 (Nematoda, Oxyuroidea). Rev. Iber. Parasitol. 45.
11. CUTILLAS, C., A. VALERO, J. GONZALEZ-CASTRO y D. C. GUEVARA.  
1985c. The spermatogenesis of Dictyocaulus filaria (Nematoda, Trichostrongyloidea). J. Parasitol. 71: 500-503.
12. CHUPREVICH, T. W., L. F. MEISNER y S. L. INHORN. 1973. Mechanism of trypsin chromosome banding. The Lancet 1: 484.
13. DMITRIEVA, T. I. 1977. The chromosomes in mitosis and gametogenesis of 2 nematodes from the genus Dictyocaulus. Ped. Inst. im. m. Gor'Kogo: 33-40.
14. DRETS, M.E. y M. W. SHAW. 1971. Specific banding patterns of human chromosomes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68: 2073-2077.
15. DUTRILLAUX, B. y J. LEJEUNE. 1971. Sur une nouvelle technique d'analysis du caryotype humain. C. R. Acad. Sci. Paris Ser. D. 272: 2638-2640.
16. EDWARDS, C. L. 1910. The sex-determining chromosomes in Ascaris. Science, N. S. 31: 514-515.
17. EDWARDS, C. L. 1911. The sex chromosomes in Ascaris felis. Arch. f. Zellforsch. 7: 309-313.

18. FERGUSON-SMITH, M. A. y B. M. PAGE. 1973. Pachytene analysis in human reciprocal translocation. *J. Med. Genet.* 10: 283-286.
19. GALLIMORE, P. H. y C. R. RICHARDSON. 1973. An improved banding technique exemplified in the karyotype analysis of two strain of rats. *Chromosoma* 41: 259.
20. GERICHTER, CH. B. 1951. Studies on the long nematodes of sheep and goats in the Levant. *Parasitology* 3-4: 166-183.
21. GONZALES, J. C. y M. C. MALMANN. 1970. Cromosomas de algunas especies de nematodos parásitos de ovinos y bovinos do Rio Grande do Sul Brasil. *Rev. de Med. Veter. Sao Paulo.* 6: 132-139.
22. GROSSMAN, A. I., R. MCKENZIE y G. D. CAIN. 1980. Sex heterochromatin in *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 66: 368-370.
23. HIRAI, H., Y. SAKAGUDHI y H. T. IMAI. 1981. C-band polymorphism in a japanese lung fluke *Paragonimus ohirai* (Trematoda; Platyhelminthes). *Heredity* 47: 249-252.
24. HOWELL, W. M. y T. C. HSU. 1979. Chromosome core structure revealed by silver staining. *Chromosoma* 73: 61-66.
25. HOWELL, W. M. 1982. Selective staining of nucleolus organizer regions (NORs). *The Cell Nucleus* 2: 89.
26. HSU, T. C., B. R. BRINKLEY y F. E. ARRIGHI. 1967. The structure and behaviour of the nucleolus organizers in mammalian cells. *Chromosoma* 23: 137-153.

27. HUTCHINSON, J., T. E. MILLER, J. JAMIER y K. W. SHEPHERD. 1982. Comparison of the chromosomes of Triticum timopheevi with related wheats using the techniques of C-banding and in situ hybridization. *Theor. Appl. Genet.* 64: 31-40
28. JOHN, B. y G. L. G. MIKLOS. 1979. Functional aspects of satellite DNA and heterochromatin. *Int. Rev. Cytol.* 58: 1-114.
29. KING, M. y B. JOHN. 1980. Regularities and restrictions governing C-band variation in acridoid grasshoppers. *Chromosoma* 76: 123-150.
30. LAPAGE, G. 1971. *Parasitología veterinaria. Continental Méjico.*
31. LEJAMBRE, L. 1968. The chromosome numbers of Oesophagostomum columbianum Curtice and Chabertia ovina Fabricius (Nematoda, Strongylata). *Trans. Amer. Microsc. Soc.* 87: 105-106.
32. LEVAN, A., K. FREDGA y A. A. SANDBERG. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
33. LUCIANI, J. M., M. R. MORAZZANI y A. STAHL. 1975. Identification of pachytene bivalents in human male meiosis using G-banding technique. *Chromosoma* 52: 275-282.
34. MANDAHL, N. 1978. Variation in C-stained chromosome regions in European hedgehogs (Insectivora, Mammalia), *Hereditas* 89: 107-128.
35. MCKAY, R. D. G. 1973. The mechanism of G and C banding in mammalian metaphase chromosomes. *Chromosoma* 44: 1-114.

36. MCKENZIE, W. H. y M. A. LUBS. 1973. An analysis of the technical variables in the production of C-bands. *Chromosoma* 41: 175-182.
37. MATSUI, S. 1974. Structural proteins associated with ribosomal cistrons in *Xenopus laevis* chromosomes. *Exp. Cell. Res.* 88: 88-94.
38. MATSUI, S. y M. SASAKI. 1973. Differential staining of nucleolus organizers in mammalian Chromosomes. *Nature* 246: 148-150.
39. MERRICK, S., R. S. LEDLEY y H. A. LUBS. 1973. Production of G and C banding with progressive trypsin treatment. *Pediatr. Res.* 7: 39-44.
40. OKADA, T. A. y D.E. COMINGS. 1974. Mechanisms of chromosome banding III. Similarity between C-bands of mitotic chromosomes and chromomeres of mitotic chromosomes. *Chromosoma* 48: 65-71.
41. PARDUE, M. L. y J. G. GALL. 1970. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science* 168: 1356-1358.
42. PATIL, S. R., S. MERRICK y H. A. 1971. Identification of each human chromosome with a modified Giemsa stain. *Science* 173: 821-822.
43. PODGORNOVA, G. P., V. Y. TROFIMENKO, T. I. DMITRIEVA, U. V. LOMAKIN, A. V. SHLIKAS y V. A. SHOL . 1979. The karyology of some adenophorea and secernentea nematodes. *Trudy Gel'mintol. Lab.* 29: 112-118.

44. PRETEL, A., A. VALERO, J. ROMERO y C. CUTILLAS. 1982. Estudio citogenético de Haemonchus contortus Rudolphi, 1803. Rev. Iber. Parasitol. 42: 177-184.
45. PRETEL, A y A. VALERO. 1984a. Estudio citogenético de Graphidium strigosum(Dujardin, 1845) (Nematoda). Rev. Iber. Parasitol. 44: 75-81.
46. PRETEL, A. y A. VALERO. 1984b. Estudio citogenético en Nematodirus abnormalis (Nematoda). Rev. Iber. Parasitol. 44: 315-321.
47. RAY, J. H, y S. VENKETESWARAN. 1978. Constitutive heterochromatin distribution in monocentric and polycentric chromosomes. Chromosoma 66: 341-350.
48. ROMERO, J. 1972. Panorama nacional de los parásitismos de la ganadería (especies parásitas denunciadas en España). Supl. Cien. Inform. Consejo Gral. Colegios Veterinarios de España. 193:61-90.
49. ROSS, A. y I. P. GORMLEY. 1973. Examination of surface topography of Giemsa banded human chromosomes by light and electron microscopy. Exp. Cell. Res. 81: 79-86.
50. SALAZAR, M., D. GONZALEZ y A. SAMANO. 1962. Cromosomas de Onchocerca volvulus. Salud Públ. México 4: 983-984.
51. SANTOS, J. L. y R. GIRALDEZ. 1978. The effect of C-heterochromatin in chiasma terminalisation in Chorthippus biguttulus L. (Acrididae, Orthoptera). Chromosoma 70: 59-66.

52. SANTOS, J. L., P. ARANA y R. GIRALDEZ. 1983. Chromosome C-banding patterns in Spanish acridoidea. *Genetica* 61: 65-74.
53. SCHMID, M. 1978a. Chromosome banding in Amphibia I. Constitutive heterochromatin and nucleolar organizer regions in Bufo and Hyla. *Chromosoma* 66: 361-338.
54. SCHMID, M. 1978b. Chromosome banding in Amphibia II. Constitutive heterochromatin and nucleolar organizer regions in Ranidae, Micropylidae and Racophoridae. *Chromosoma* 68: 131-148.
55. SCHNEDL, W. 1974. Banding patterns in chromosomes. *Inst. Rev. Cytol. Suppl.* 4: 237-272.
56. SCHULZ, J y R. SCHAEFFER. 1980. Gross morphology of chromosomes in "Cytogenetics" (Springer-Verlag, ed.) pp. 33-51.
57. SEABRIGHT, M. 1971. A rapid banding technique for human Chromosomes. *Lancet* 2: 971-972.
58. SHORT, R. B. y A. I. GROSSMAN. 1981. Conventional Giemsa and C-banded Karyotypes of Schistosoma mansoni and Schistosoma rodhaini. *J. Parasitol.* 67: 661-671.
59. SOULSBY, E. J. L. 1982. Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals. 7<sup>a</sup> Ed. (Bailliére Tindall, ed.). London.
60. STRUCKMANN, C. 1905. Ei und sumenbildung und befruchtung bei Strongylus filaria. *Zool. Jahrb.* 22: 577-628.



61. SUMNER, A. T., H. J. EVANS y R. A. BUCKLAND. 1971. New technique for distinguish between human chromosomes. *Nature new Biol.* 232: 31.
62. SUMNER, A. T. 1972. A simple technique for demostrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell. Res.* 75: 304-306.
63. VALERO, A y A. PRETEL. 1979. Estudios cariológicos en Marshallagia marshalli Ransom, 1907 (Nematoda, Trichostrongylidae). *Rev. Iber. Parasitol.* 39: 119-122.
64. VALERO, A., J. ROMERO, A. PRETEL y D. C. GUEVARA. 1982a. Estudios cariológicos de Gongylonema pulchrum Molin, 1857. *Rev. Iber. Parasitol.* 42: 33-43.
65. VALERO, A., A. PRETEL, J. ROMERO y J. GONZALEZ. 1982b. Estudio citogenético de Heterakis spumosa Schneider, 1886. *Ars Pharm.* 23: 443-448.
66. VALERO, A., A. PRETEL, J. ROMERO y D. C. GUEVARA. 1982c. Estudios cariológicos de Ostertagia circumcincta, Ostertagia trifurcata y Ostertagia occidentalis. *Rev. Iber. Parasitol.* 42: 45-52.
67. VALERO, A., A. PRETEL, J. CASTRO y J. ROMERO. 1982c. Estudio de la meiosis espermatogonial de Nematodiroides zembrae Bernard, 1965. *Rev. Iber. Parasitol.* Vol. extra: 235-242.
68. VALERO, A., A. PRETEL y J. ROMERO. 1983. Estudio citogenético comparativo de Trichuris suis (Schrank, 1788) y Trichuris ovis

- (Abildgaard, 1795) (Nematoda). *Rev. Iber. Parasitol.* 43: 51-59.
69. WALTON, A. C. 1923. Studies on nematode gametogenesis. *Z. f. Zellen* 1: 167-239.
70. WALTON, A. C. 1959. Some parasites and their chromosomes. *J. Parasitol.* 45: 1-20.
71. WANG y JUURLINK. 1979. En CORTES, F. 1984. Bando de cromosomas. *Ivestigación y Ciencia* 97: 20-29.
72. YUNIS, J. J. y O. SANCHEZ. 1973. G-banding and chromosome structure. *Chromosoma* 44: 15-23.