

CARIOTIPO CITOGENÉTICO DE LA GUAGUA (*Agouti paca*)

Juan Bautista López Ortiz¹, María Elena Márquez Fernández²
y Diego Hoyos Duque³

RESUMEN

El presente trabajo reporta la dotación cromosómica de Agouti paca, una especie considerada en vía de extinción. Además, se muestra la estandarización de la técnica para la obtención de cromosomas en sangre periférica y el tiempo óptimo del pulso terminal de 5-bromo-2'deoxiuridina (BrdUrd) para la obtención de bandas R-replicas de alta resolución. También, se compara el cariotipo obtenido usando tinción convencional de Giemsa, con el realizado utilizando bandeado replicativo de alta resolución.

El análisis de la morfología cromosómica del cariotipo de Agouti paca, muestra 29 pares de cromosomas subtelocéntricos, 2 cromosomas acrocéntricos y 5 pares cromosómicos metacéntricos. De todo el cariotipo, el cromosoma X es el más grande y lo clasificamos como: submetacéntrico. El cromosoma Y es el más pequeño y lo consideramos acrocéntrico. Además, al igual que en todas las hembras de mamíferos, la hembra de guagua exhibe un cromosoma X inactivo de replicación tardía.

¹ Profesor. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Apartado 1779.

² Profesora. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Apartado 1779.

³ Profesor Asociado. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Apartado 1779.

Con base en los resultados obtenidos, se determina el número cromosómico $2n = 74$. De acuerdo con la ISCN (1995), propusimos una clasificación en 5 grupos: grupo A del 1 al 10, grupo B del 11 al 20, grupo C del 21 al 29, grupo D del 30 al 31 y grupo E de 32 al 36, además del parsexual (XX si es hembra, XY si es macho).

Estos hallazgos posibilitarán en el futuro, establecer la correlación entre anomalías cromosómicas y cambios fenotípicos o trastornos reproductivos de la especie; además, servirá como parámetro citogenético en la comparación de Agouti paca con otros Hystricomorfos relacionados.

Este resultado se constituye en el primer cariotipo de Agouti paca (guagua), reportado; además, es el primer estudio citogenético donde se realizan bandas R-replicativas de alta resolución para cariotipar especies animales promisorias.

Palabras Clave: Agouti paca, cariotipo, guagua, citogenética.

ABSTRACT

CYTOGENETIC KARYOTYPE OF Agouti paca

This work reports the karyotype of Agouti paca, a species considered in extinction warning in Colombia. In addition, it have standardized the conventional citogenetic technique for obtention of metaphasic chromosome in peripheric blood and the optimal period of terminal pulse of 5-Bromide-2'deoxyuridine for high resolution R-replicative bands.

Agouti paca showed 74 chromosomes: twenty-nine pairs of subtelocentric chromosomes, two acrocentric chromosome pairs, and five metacentric chromosome pairs. Submetacentric X chromosome is the biggest one of the total karyotype and acrocentric chromosome Y is the smallest one. In addition, Agouti paca like other mammalian females shows one inactive late replication X-chromosome.

According to ISCN (1995), it was proposed a classification consisting of five groups: group A (from chromosome 1 to 10), group B (from chromosome 11 to 20), group C (from 21 to 29), group D (chromosomes 30 and 31) and group E (from chromosome 32 to 36 and a sexual pair, female: XX or male: XY).

Cariotipo citogenético....

This findings will permit to correlations between chromosomal abnormalities and phenotypic changes or reproductive disorders of the specie. In addition, this karyotype would facilitate cytogenetic comparations of Agouti paca with other relatives Hystricomorphs.

This is the first Agouti paca's karyotype reported and the first study where high resolution R-replicative chromosomal bands methodology for karyotyping promissore species has been used.

Key words: Agouti paca, karyotype, guagua, cytogenetic.

INTRODUCCIÓN

En Colombia, una de las especies consideradas en vía de extinción es la guagua, debido a la actividad humana que genera la destrucción y/o desequilibrio de los hábitats naturales de especies silvestres y por la caza preferencial de este espécimen, por lo apetecido de su carne.

Lo anterior se podría considerar como un aspecto socio-económico y cultural para justificar no solo su conservación, sino también que sea tenida en cuenta como futura fuente de producción de proteína con alta posibilidad de aceptación en el medio o en cualquier mercado.

Dentro del reino animal, la guagua pertenece a la clase Mamífera, orden Rodentia, familia Agoutidae, género *Agouti* y especie *paca*.

El conocimiento básico, a nivel fisiológico y genético de la fauna silvestre en nuestro medio es muy escaso y superficial. Esto dificulta las posibilidades de adelantar programas estratégicos con miras a conservar la biodiversidad en general, especialmente de aquellas especies que son actualmente consideradas en vía de extinción (Mares y Ojeda, 1981).

Uno de los parámetros básicos de gran importancia dentro de los aspectos genéticos, es el conocimiento de la dotación cromosómica o cariotipo, el cual posibilita una relación taxonómica entre grupos morfológicamente relacionados y podría permitir posibilidades de manejo genético-reproductivo entre grupos emparentados (Garber, 1972; Giannoni, 1988), con fines de explorar el potencial zootécnico de diversas especies.

Otro aspecto que podría ser refortalecido, una vez se establezca el cariotipo, es la detección de anomalías cromosómicas presentes en la población, tales como las aneuploidías y los rearrreglos estructurales, los cuales podrían influir en la expresión fenotípica o en la capacidad reproductiva (Nicholas, 1990).

Hasta la década de los años 70, los cariotipos se realizaban con coloración homogénea, pero las técnicas citogenéticas modernas han desarrollado métodos que permiten la inducción de bandas en la estructura cromosómica.

Estas bandas se pueden agrupar en dos categorías:

El bandeo en el que se induce un limitado número de bandas, tales como RON (región organizadora del nucléolo), bandas C y bandas G₁₁ con las que se puede lograr información sobre polimorfismos intra e interespecíficos.

La otra categoría es el bandeo cromosómico (Q, G y R) distribuido a través de todo el cromosoma, con los cuales se pueden agrupar de manera precisa, los pares homólogos y compararlos entre especies relacionadas (International System for Human Cytogenetic

Nomenclatura, CSN, 1995).

En este trabajo, para realizar la evaluación cromosómica, se seleccionó el método de bandeo R-replicativo, para lo cual fue fundamental estandarizar el cultivo de linfocitos de *Agouti paca*, y el tiempo óptimo del pulso terminal de 5-BrdU utilizado para la inducción de bandas de alta resolución, importantes en la evaluación del cariotipo.

METODOLOGÍA

Toma de Muestra. El ejemplar se rasuró y desinfectó en el área de la piel de los miembros anteriores, donde se localiza la vena cefálica. De ésta, se recolectan 5 ml de muestra usando jeringa estéril con 0.1 ml de Heparina (5000 U) y con aguja 21.

A continuación, se llevó la muestra al Laboratorio de Citogenética del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias-Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, para su respectiva siembra.

Obtención de Extendidos Cromosómicos. Cada cultivo se realizó en condiciones asépticas con 1 ml de sangre periférica heparinizada en 9 ml de medio Ham

F-12 completo (20% de SFB, 100 U de Penicilina y 100 ug/ml de Estreptomycin) y 0.1 ml de Fito-hemaglutinina.

Luego de sembrada la muestra, los cultivos se incubaron a 37°C, durante 48, 54, 60 y 66 horas.

Para la cosecha de los cultivos, éstos se dividieron en dos grupos: grupo 1 y grupo 2, a los que se le adicionó respectivamente 100 m μ l de BrdU(2 μ g/ml) ó deoxitimidina(TdR), (10⁻⁵M) a las 4, 5, 6, 7 u 8 horas antes del proceso de cosecha. 30 minutos antes de finalizar el tiempo de cultivo, se le adiciona Colcemid (100 μ g/ml).

Proceso de Cosecha. El procesamiento de todos los cultivos, se hizo de acuerdo con la técnica citogenética convencional para análisis cromosómico (36, 20) como se describe a continuación (Moorhead, 1960; Hungerford, 1965).

Los cultivos en suspensión se transfieren a un tubo cónico, se centrifugan a 200g durante 7 min, se descarta el sobrenadante y el celular se resuspende, y se le agrega 5-6 cc de solución hipotónica (KCl 0.075 M). Se incuban a 37°C durante 5 min, se centrifugan de nuevo a 200 g por 7 min, se descarta el

sobrenadante y se resuspenden vigorosamente antes de iniciar la fijación.

La fijación de la muestra se lleva a cabo agregando gota a gota, y con agitación fuerte, fijador fresco (3:1 Metanol/Ácido Acético) hasta completar 1 ml. Luego se adiciona más fijador hasta completar un volumen de 5-7 ml. Los tubos se dejan reposar a temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente, mediante centrifugación y descarte, el fijador se cambia dos veces.

Finalmente, el botón celular se resuspende en 0.3-0.5 ml. de fijador fresco. Una fracción de esta suspensión se "gotea" a una altura de 45-55 cm sobre portaobjetos previamente sumergidos en agua (4°C) y prelavados con Metanol. Las preparaciones se dejan escurrir 20-30 segundos en posición ligeramente inclinada y luego se flamean levemente para incrementar la expansión cromosómica y reducir el trasfondo citoplásmico.

La primera placa preparada de esta manera, se revisa al microscopio de contraste de fase, en el cual se evalúa el grado de dilución y de esparcimiento. Por último, las placas se almacenan en cajas plásticas, hasta el momento de ser

coloreadas.

Coloración Diferencial para Bandas Cromosómicas R-Replicativas. El principio usado en este trabajo para realizar el cariotipo de *Agouti paca* con bandas R-replicativas de alta resolución, mediante pulso terminal de BrdU, se basó en el método establecido por Camargo y Cervenka (1982) para evaluar la cronología en la replicación de cromosomas humanos.

Este método permite clasificar la Fase S del ciclo celular en períodos I, II, III, IV, V y VI, según el patrón de bandas que muestren sus cromosomas (Camargo y Cervenka, 1982; López y Camargo, 1984). El estadio III del cariotipo de una especie, revela un patrón de bandas cromosómicas altamente similar a las bandas G reversas de esta especie. Esto nos permite establecer las bandas R-replicativas de alta resolución, dependiendo del grado de compactación de los cromosomas.

A las láminas con los extendidos cromosómicos obtenidos de cultivos expuestos a BrdU, se les aplica el tratamiento para inducir bandas R-replicativas, usando modificaciones efectuadas en el Laboratorio de Citogenética del Departamento de Biología (Universidad Nacional) del

método inicialmente descrito por Camargo y Cervenka (1982), tal como se describe a continuación:

Se toman láminas entre 0-30 días después de "goteadas" y se sumergen en solución bis BENZIDIMIDE (*Hoechst* 33258) 0.3 $\mu\text{g/ml}$ durante 10 min.

Se lavan con agua destilada en dos pasos sucesivos y se secan suavemente, hasta remover el agua. A cada lámina en posición horizontal, se le agregan 0.3 ml de solución 2 x SSC y se cubre con una laminilla de 2.2 x 60 mm.

Cada lámina, se expone a iluminación con una lámpara *Sylvania Capsylite* 75w, 120w PAR 30, a 60°C, durante 40 minutos. Se remueve la laminilla, de tal forma que no haya deslizamiento.

Cada lámina se lava con agua destilada y se seca, agitando suavemente al aire.

Luego, se le agrega solución de Giemsa diluida al 5% en agua corriente, durante dos minutos.

Por último, la preparación permanente se realiza cubriendo la muestra con *Permout*, protegido con una laminilla.

Las láminas que contienen extendidos cromosómicos, que no fueron expuestas a pulso terminal de BrdU, se tiñen directamente con Giemsa diluida al 5% en agua corriente, durante cinco minutos.

Análisis Microscópico y Fotografía. El análisis con microscopio directo se inicia con un recorrido general de la lámina en 10X, para identificar zonas que contengan los mejores extendidos. Estas zonas se referencian para posteriormente efectuar el análisis cromosómico detallado en 50 mitosis seleccionadas, usando objetivo de inmersión (100X).

Para detallar cada una de las mitosis, se comienza evaluando el número cromosómico por metafase, seguido de una comparación mental entre pares homólogos; además, se identifica el par de cromosomas sexuales.

Las mejores mitosis analizadas en estadios III que muestren excelente calidad y/o detalles especiales, se seleccionan para fotografía. Estas fotografías se toman en un microscopio *Olympus* BMK 40, con sistema automático, usando película Kodalith Orthofilm 6556 ASA 8. y se llevan a positivas, usando papel *Forte* FPSI.

Para mostrar la bondad de la técnica de bandeado, algunas de las placas obtenidas de cultivos expuestos a BrdU, se colorearon con tinción convencional Giemsa, se fotografiaron, se decoloraron y posteriormente, fueron sometidas al procedimiento de tinción para bandas R-replicas.

De las fotografías impresas, se recorta cada uno de los cromosomas y se ordenan en números ascendentes como pares homólogos, siguiendo las recomendaciones de la Conferencia de París (1995).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los mejores resultados para el cultivo de linfocitos de sangre periférica de *Agouti paca*, se lograron con un tiempo de incubación de 60 horas y en el caso de cultivos para bandas R-replicas, el mejor tiempo para el pulso terminal de BrdU, fue de seis horas.

De cada organismo, macho y hembra, se analizaron inicialmente 50 metafases en cada una de las preparaciones cromosómicas teñidas con Giemsa, en donde se determinó el número y la morfología cromosómica (Figura 1). El número diploide de cromosomas observados fue de $2n = 74 XX$ para ejemplares

hembras o XY para ejemplares machos. Una vez determinado el número cromosómico, se procedió a identificar los pares homólogos en



FIGURA 1. Metafase con tinción convencional Giemsa de un ejemplar hembra *Agouti paca* de, donde se muestran 74 cromosomas.

metafases de estadios III de replicación (Figuras 2A y 3A) en preparaciones coloreadas para bandas R-replicativas. Los pares homólogos son clasificados por su patrón de bandas y posición de centrómeros en metacéntricos, acrocéntricos y submetocéntricos. Posteriormente los cromosomas se

distribuyeron en cuatro grupos ordenados de mayor a menor tamaño (Figuras 2B y 3B).

De acuerdo con la morfología, ubicación del centrómero y tamaño relativo, se propone la siguiente clasificación para los cromosomas de la *Agouti paca*:

Número del Cromosoma	Ubicación del Centrómero	Tamaño Relativo
1 a 29	Subtelocéntricos	medio
30, 31	Acrocéntricos	medio
32 a 36	Metacéntricos	medio
Y	Acrocéntrico	menor
X	Sumetacéntrico	mayor



FIGURA 2. Metafase de una hembra de Agouti paca con bandas R-replicas en estadio III de replicación.

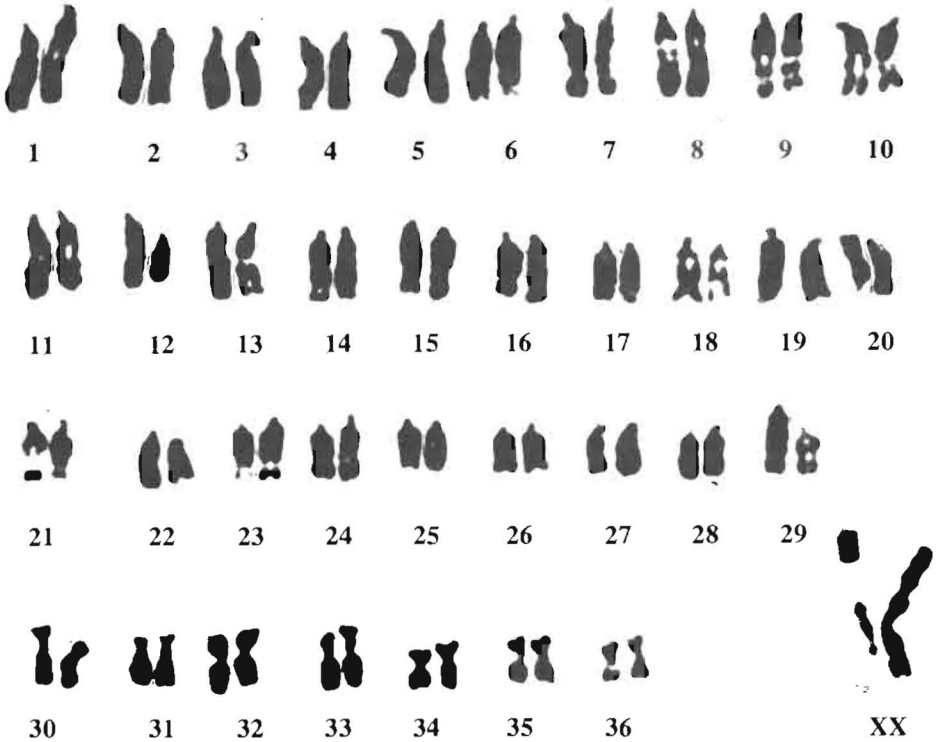


FIGURA 3. Cariotipo de una hembra de Agouti paca con bandas R de replicación.

Los cromosomas 1 a 29 son clasificados como **subtelocéntricos**, los cromosomas 30, 31 y Y, se pueden considerar como **acrocéntricos**. Los cromosomas 32 a 36, se clasifican como metacéntricos y el cromosoma X, que es el más grande del genoma, se clasifica como **submetacéntrico**.

Es de anotar que uno de los

cromosomas X de la hembra de *Agouti paca*, igual que el de todas las hembras de mamíferos, es de **duplicación tardía**, por lo cual, se podría inferir su carácter de inactivo (Figura 4). Por su parte el cromosoma Y, se presenta como el más pequeño del genoma con un brazo *p* activo y con el brazo *q* totalmente pálido, lo que sugiere su carácter inactivo.



FIGURA 4. Metafase de un macho de Agouti paca con bandas R-replicasivas en estadio III de replicación.

CONCLUSIONES

Se estandariza la técnica de cultivo de linfocitos de sangre periférica de *Agouti paca* para obtener extendidos cromosómicos, también el pulso terminal de BrdU para la obtención de estadios III replicativos para análisis de bandeo cromosómico de alta resolución. De otro lado, se establece un procedimiento simplificado para la inducción de bandas R-replicasivas.

Además, se propone el primer cariotipo de *Agouti paca*, utilizando un método de bandeo cromosómico de alta resolución.

Para realizar un ordenamiento cromosómico más preciso, se pueden utilizar técnicas de medición que muestren la longitud relativa real de cada uno de los cromosomas y un scanner por computador para detallar la estructura y morfología cromosómica.

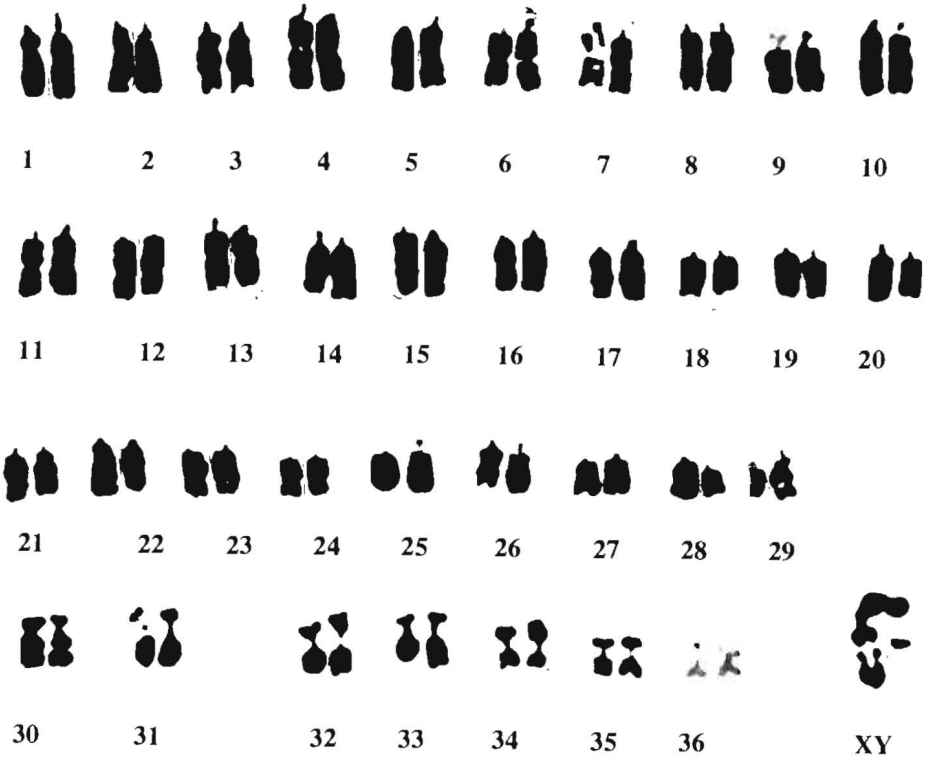


FIGURA 5. Cariotipo de un macho de Agouti paca con bandas R de replicación.



FIGURA 6. Metafase en estadio III de replicación de una hembra de Agouti paca donde se señala con flecha el cromosoma X inactivo.

BIBLIOGRAFÍA

CAMARGO M. and CERVENKA J. Patterns of DNA replication of Human chromosomes. Part 2: Replication Map and Replication Model. *En: American Journal of Human Genetic.* Vol. 34 (1982); p.757-780.

CANO, A. L. y Smith A. H. Una aproximación a la evaluación del eyaculado la especie *Agouti paca* (guagua). Medellín, 1994, 94p. Trabajo de grado (Zootecnista). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias.

GARBER, E.D. Cytogenetics: an introduction. New York: McGraw Hill, 1972. 180p.

GIANNONI M.L. Y LUI J. Cito-genética y su aplicación na seleção de reproductores equinos. Joboticaba, Brasil: Legis Summa. Funep, 1988. 265p.

HUNGERFORD D.A. Leukocytes cultured from small inocula of whole blood an the preparation of metaphase chromosome by treatment with hypotonic KCl. *En: Stain Technology*. Vol. 40 (1965); p.333-338.

INTERNATIONAL SYSTEM FOR CITOGENETIC NOMENCLATURA. ISCN. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. 1995.

LYON, M.F. Gene action in the X-Chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *En: Nature*. Vol. 190 (1961); p.372-373.

LÓPEZ J.B. y CAMARGO M. Estudio del efecto de una base análoga (Fd Urd) en la replicación cromosómica en linfocitos humanos. Medellín, 1984. 120p. Tesis (Magister en Biología). Universidad de Antioquia. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

_____ y _____ Evaluación de Freemartin mediante análisis de cromosomas metafásicos. *En: Revista ACCB*. Vol.3, No.5 (1986); p.17-21.

MARES, M. and OJEDA, R. Patterns of diversity and adaptation in south American hystricgnath rodents. New York: Maturing Laboratory of Ecology, 1981. p.393-398.

MOORHEAD P.S. *et al.* Chromosome preparations of leukocytes cultures from human peripheral blood. *En: Experiment Cell Research*. Vol. 210 (1960); p.613-616.

NICHOLAS, F.W. Genética Veterinaria. Barcelona: Acribia, 1990. 705p.

(Recibido: Abril de 1997).