

Descripción de la estructura cromosómica de los camélidos sudamericanos

Marco Espinoza^{1,*}, Nilda Oliveros², Nino Arias³

¹ IPEN, Laboratorio de Citogenética y Radiobiología, Av. Canadá 1470, Lima 41, Perú

² Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ciencias Biológicas, Lima, Perú

³ Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Medicina Veterinaria, Lima, Perú

Resumen

Se presenta el resultado de los análisis citogenéticos en 15 alpacas (*Lama pacos*), 7 llamas (*Lama glama*), 6 vicuñas (*Vicugna vicugna*) y 12 guanacos (*Lama guanicoe cacsilensis*). Para este estudio se tomó muestras de sangre entre 2 y 5 mL en cada espécimen en condiciones estériles y luego se prepararon cultivos de linfocitos de acuerdo con el protocolo estandarizado para nuestro laboratorio. Los resultados obtenidos mediante el análisis al microscopio de un número significativo de metafases por cada especie comprueban que en las cuatro especies el número cromosómico diploide es $2n = 74$. Los cromosomas de estas especies se pueden ordenar dentro de 4 grupos: 10 pares de subtelo-céntricos (cromosomas del 1 al 10), 10 pares de telocéntricos (cromosomas del 11 al 20), 9 pares de submetacéntricos (cromosomas del 21 al 29) más el cromosoma Y y 7 pares de metacéntricos más el cromosoma X (cromosomas del 30 al 36).

Abstract

Results of cytogenetic analysis in 15 alpacas (*Lama pacos*), 7 llamas (*Lama glama*), 6 vicuñas (*Vicugna vicugna*) and 12 guanacos (*Lama guanicoe cacsilensis*) are presented. Blood samples in the range of 2 – 5 mL for each specimen were collected for this study in sterile conditions. Lymphocyte cultures were set up according with the protocol routinely used in our laboratory. Results obtained by microscope analysis of a significant number of metaphases in each case show that the four species studied has a diploid number $2n = 74$. All the chromosomes of these species can be classified into four groups: 10 pairs of subtelocentric (chromosomes 1 to 10), 10 pairs of telocentric (chromosomes 11 to 20), 9 pairs of submetacentric (chromosomes 21 to 29) plus chromosome Y and 7 pairs of metacentric (chromosomes 30 to 36) plus chromosome X.

1. Introducción

Los Camélidos Sudamericanos (CSA) cumplen, un papel importante en la economía de un vasto sector de la población que habita la zona altoandina del Perú, Bolivia, Chile y Argentina. El estudio de su biología y el desarrollo de su crianza, han dependido exclusivamente del esfuerzo de un pequeño grupo de investigadores del área en estos países. Así mismo, el hecho de su relativo aislamiento y su poca dispersión hacia otras zonas del mundo, ha mantenido a estos animales fuera de los alcances de un escrutinio e interés científico internacional por muchas décadas; aunque hoy en día, el mundo no andino también va mostrando un creciente interés por hacer de este recurso una poderosa fuente de ingresos.

La falta de conocimiento de estos animales, ha devenido en los pobres resultados tecnológicos y económicos logrados, y por ello no han podido demostrar su gran potencial como fuente de sustento de grandes

masas de población, quedando relegada su utilidad al poblador de los Andes, hecho que además los ha situado muy por debajo del estatus global al cual han llegado otros rumiantes, como los bovinos, ovinos y aún los caprinos. Se debe también tener en cuenta, que la crianza animal no sólo debe ser económicamente rentable, sino, ecológicamente viable, por lo que los CSA encuadran perfectamente en lo que se ha llamado «super especies», con cualidades ecológicas y económicas.

Existen actualmente cuatro especies de CSA, dos de las cuales son silvestres: el guanaco (*Lama guanicoe*) y la vicuña (*Vicugna vicugna*), y dos son domésticas: la alpaca (*Lama pacos*) y la llama (*Lama glama*). Desde el punto de vista pecuario el mayor interés está en los domésticos alpaca y llama, ya que las especies silvestres vicuña y guanaco se encuentran protegidas (por su situación vulnerable), no existiendo actualmente la posibilidad de una explotación

* Correspondencia autor: mespinoza@ipen.gob.pe

privada de este recurso, hecho que no implica que el estado no pueda avizorar posibilidades de explotación futura a mediano o largo plazo.

La motivación para este trabajo fue el hallazgo casual de la escasez de estudios citogenéticos sobre estas especies a pesar que son relativamente fáciles de obtener y muestrear. Tras casi dos años de trabajo intenso hemos comprendido que es difícil obtener metafases que nos permitan discernir los numerosos cromosomas pequeños del cariotipo de estas especies. Creemos que si bien hemos logrado corroborar que las cuatro especies tienen $2n = 74$, aún nos falta obtener mucha información sobre sus cariotipos.

Indudablemente, uno de los factores que dificulta la obtención de metafases adecuadas para un estudio cromosómico descriptivo es el alto número cromosómico en estas especies y el pequeño tamaño que tienen 12 de los 37 pares de cromosomas [1]. Al principio tuvimos algunos problemas para cultivar las células de estos camélidos en los medios que usábamos para la citogenética humana; sin embargo, pronto fue resuelto y pasamos a la dificultad de obtener metafases lo suficientemente claras como para llegar a conclusiones exactas.

Consultando la escasa literatura existente, se habla de una similitud muy grande en la morfología de los cromosomas de las 4 especies de camélidos sudamericanos [2]. Hay incluso quienes opinan que estas 4 formas de camélidos serían en realidad una sola especie [3]. Refuerza esta creencia, además del número y morfología cromosómica, el hecho que estas especies se entrecruzan con mucha facilidad, dando lugar a híbridos que son individuos fértiles. Justamente esta situación es la que estaría llevando a la degeneración genética de las alpacas, llamas y guanacos y en menor medida a las vicuñas. En nuestra opinión se trata de cuatro especies fenotípicamente bien diferenciadas que en condiciones naturales no se cruzan y que tienen tantas características tanto físicas como etológicas que nos hace suponer la existencia de diferencias no sólo en sus configuraciones genéticas sino también en su estructura cromosómica.

2. Materiales y Métodos

2.1 Animales muestreados

Se trabajó con animales de diversa procedencia. Con relación a las alpacas, tres de ellas fueron muestreadas en Lima (APR1, APR2 y ALM1) y las otras 12 fueron muestreadas en un rebaño en Lurín. Con respecto a las llamas, una fue muestreada en el Parque Reducto N° 2 de Miraflores, Lima (LLPR1) y las otras 5 fueron obtenidas en Junín. Con relación a las muestras de vicuñas, dos de ellas (VL1-1 y VL1-2) fueron obtenidas en Junín y las otras 4 se obtuvieron de Huancavelica. Gracias a una autorización de la Comisión Nacional de Camélidos Sudamericanos (CONACS) se pudo muestrear a 12 ejemplares de guanaco que fueron trasladados desde Pampa Galeras hasta Calipuy en La Libertad en mayo del 2005.

2.2 Cultivo de Células

Las muestras fueron tomadas, en todos los casos, por un veterinario, usando el sistema Vacutainer donde la sangre es recibida directamente desde un vaso sanguíneo del cuello del animal hacia un tubo de vidrio sellado al vacío y estéril, conteniendo heparina con litio. Después de la toma de muestra la sangre se homogenizó suavemente dentro del tubo con la heparina y se transportó al laboratorio donde en algunos casos las muestras quedaron en refrigeración hasta dos días antes de su procesamiento.

El cultivo de linfocitos se hizo de acuerdo con el protocolo estándar en nuestro laboratorio que es una adaptación del cultivo de linfocitos de humanos para los linfocitos de camélidos sudamericano [4]. Brevemente podemos decir que en cada tubo de cultivo (de polipropileno con tapa rosca) se coloca 4 o 5 mL de medio RPMI-1640 suplementado con glutamina, 0.30 μ L de una solución stock de antibióticos (1 000 000 UI de benzilpenicilina y 100 μ L de sulfato de estreptomycin por mL), 1.5 a 2 mL de suero bovino fetal, entre 200 y 400 μ L de fitohemaglutinina a la concentración de 0.5 mg / mL y finalmente 800 μ L de sangre total (para este paso hay que agitar muy suavemente la sangre dentro del tubo de vidrio y destaparlo con mucho cuidado. Se debe trabajar en todo momento en condiciones de total asepsia y usando guantes quirúrgicos para no contaminar el material que se está sembrando. Los tubos de cultivo así preparados se colocan en una incubadora a 37 °C por 48 horas en total oscuridad.

A raíz de los buenos resultados obtenidos con una muestra de sangre de llama (*L. glama*) de 1.3 mL que fue cultivada con un reducido volumen de medio de cultivo y de las demás sustancias, se diseñó un protocolo de minicultivo de linfocitos que ya lo hemos probado con buenos resultados en humanos y que se detalla a continuación:

2.3 Protocolo de minicultivo de linfocitos para estudios cromosómicos

2.3.1. Muestra: Esta variación de la técnica de cultivo de linfocitos se usa cuando el volumen de la muestra está en el rango de 0.5 a 2.0 ml.

2.3.2. Siembra: En primer lugar debemos estimar con exactitud el volumen de sangre que tenemos; luego, por cada 0.5 ml de sangre medir 0.1 ml de fitohemaglutinina (SIGMA) en solución 1mg / ml y mezclar con la sangre directamente en el tubo donde vino la muestra. Dejar en reposo a 37 °C por 20 minutos. Enseguida, dar inicio al proceso de siembra con las siguientes modificaciones para cada tubo de cultivo:

- Medio de cultivo RPMI-1640 (SIGMA-ALDRICH), 1.3 ml.
- 0.01 ml de la solución de antibióticos del protocolo normal.
- No añadir Bromodesoxiuridina para minimizar la pérdida de células por toxicidad teniendo en cuenta que se tiene muy poco volumen de sangre.
- Suero Bovino Fetal (SIGMA-ALDRICH): 0.30 ml por cada cultivo.
- Homogenizando muy suavemente, colocar para cada cultivo, 0.3 ml de la sangre previamente mezclada con la fitohemaglutinina.

Luego, cerrar los tubos y agitar muy suavemente para mezclar bien la sangre con el medio de cultivo y no dañar a las células que acaban de ser puestas en él. Todo este procedimiento se hace dentro de una cámara de flujo laminar horizontal. Los tubos de cultivo se deben tapar bien para evitar la contaminación.

2.3.3. Incubación: Colocar en una incubadora a 37 °C por 46 horas en completa oscuridad.

2.3.4. Adición de colchicina: Se añade 0.08 ml de la solución de colchicina (SIGMA-ALDRICH) según el protocolo normal.

2.3.5. Tratamiento Hipotónico: Al cabo de 48 horas de incubación, centrifugar por 10 minutos a 900 rpm. Al término de lo cual, utilizando una pipeta Pasteur, se retira todo el líquido sobrenadante de los tubos y se les añade, suavemente, 1 ml de una solución de KCL 0.075 M a 37 °C en agua destilada estéril. Se tapan los tubos y se homogenizan cuidadosamente con un vortex mixer, poniéndolos a incubar por otros 15 minutos a 37 °C.

2.3.6. Fijación: Centrifugar por 10 minutos a 900 rpm. Luego, retirar el líquido sobrenadante con pipeta Pasteur y al *pellet* de células se le añade con mucho cuidado, gota a gota y usando el vortex mixer, 1.5 ml del fijador Carnoy. Con una pipeta Pasteur se hace una suave homogenización y se deja en reposo por un mínimo de 15 minutos repitiéndose el proceso otras dos veces como en el protocolo normal.

La segunda fijación se hace con un volumen de 0.5 ml de fijador y para la tercera fijación se emplea 0.3 ml de Carnoy. Al último *pellet* se le añade entre 3 y 8 gotas de fijador con una pipeta Pasteur, dependiendo de cuánto material podemos estimar que hay en el fondo del tubo después de la última centrifugación.

2.3.7. Extensión de las muestras en los portaobjetos: con una pipeta Pasteur se toma suavemente el último preparado y con la mayor precisión se deja caer una o dos gotas sobre cada portaobjetos.

2.3.8. Coloración convencional: De acuerdo con el protocolo normal.

2.3.9. Análisis: De acuerdo con el protocolo normal.

2.4 Preparación citológica

Al cumplirse 46 horas (en caso de cultivos de 48 horas) o 70 horas de cultivo (en el caso de cultivos de 72 horas) se añadió a cada tubo entre 500 µL y 1000 µL de una solución de colchicina a la concentración de 4 µL por el tiempo restante de cultivo (2 horas). Una vez cumplido el tiempo de cultivo se procedió a centrifugar los tubos a 1000 rpm por 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y al sedimento (*pellet*) se añadió 5 mL de solución hipotónica (KCl 0.075 M) previamente atemperada a 37 °C y se dejó en incubación a 37 °C por un tiempo no menor a 17 minutos ni mayor de 20 al cabo de los cuales se colocó 1 mL de solución fijadora a

cada uno de los tubos que se están trabajando y se procedió a centrifugarlos a 1000 rpm por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se añadió muy suavemente 5 mL de solución fijadora (metanol – ácido acético, 3:1) utilizando un vortex mixer y se dejó en fijación por un mínimo de 30 minutos. Después de esta primera fijación se procedió a una segunda con 2 mL de fijador y en una tercera fijación se añadió no más de 0.5 mL de fijador dependiendo del aspecto y volumen del sedimento. De este último volumen cuidadosamente resuspendido se colocó dos o tres gotas sobre un portaobjetos previamente limpiado, secado y guardado en la refrigeradora de un día para otro. Procedimiento denominado «extendido» y estos extendidos se guardaron al menos por tres días antes de su coloración con Giemsa al 3 %, pH 6.8 por 8 a 10 minutos.

2.5 *Análisis al microscopio*

Los portaobjetos con las muestras extendidas fueron teñidos con una solución de Giemsa al 3 % en una mezcla en partes iguales de buffer fosfato pH 6.8 y agua corriente. Las láminas fueron coloreadas por 10 minutos a temperatura ambiente. Fueron lavadas con agua destilada y puestas a secar en estufa. Para su visualización al microscopio se usó un microscopio ZEISS Axioscop 2.

3. Resultados

La Tabla 1 muestra de manera sinóptica todo el trabajo realizado con las 15 alpacas, 7 llamas, 6 vicuñas y 12 guanacos estudiados. Se da también el número de portaobjetos preparados y analizados. Esta información se complementa con la información sobre el número de metafases analizadas al microscopio por cada especie: 451 para alpaca, 166 para llama, 230 para vicuña y 370 de guanaco.

La Tabla 1 resume y explica el aspecto principal de este estudio, que es la identificación de los 37 pares de cromosomas en cada una de estas especies, uno por uno. El procesamiento de las fotografías tuvo una serie de dificultades derivadas del uso de una cámara fotográfica inadecuada con la consiguiente pérdida de enfoque en un gran número de preparados. Algunas de las fotografías no muestran claramente los detalles del cromosoma pero, el idiograma que acompaña a cada una de ellas (margen lateral derecho) puede ayudar en la

visualización de cada cromosoma y de cada grupo de cromosomas.

Aunque se intentó el bandeamiento G y C de los preparados, la técnica no estuvo a punto para lograr una mejor resolución de la estructura de los cromosomas. Sin embargo, para los preparados de llama, vicuña y guanaco, durante el procesamiento de la tinción convencional, se produjo una tinción espontánea que dejaba entrever el patrón de bandas G. Eso explica el aspecto discontinuado en la tinción de algunos de los cromosomas. Eso, ayudó también en la identificación de los pares de homólogos y en la ubicación de los cromosomas dentro del cariotipo. Las fotografías de los cromosomas de alpaca se tomaron con una cámara digital CANON AB80 a un aumento de 1250X en un microscopio Axioscop-2 (ZEISS). Las fotos de los cromosomas de llamas, vicuñas y guanacos se hicieron utilizando película fotográfica KODAK Tri X-Pan en blanco y negro en un microscopio JENAMED2 (ZEISS), a un aumento de 1000X.

4. Discusión

Basándonos en el análisis citogenético convencional aplicado en nuestro laboratorio se pudo comprobar la similitud morfológica de los cromosomas de los camélidos sudamericanos. El análisis de los cariotipos reveló que las semejanzas estructurales entre las cuatro especies estudiadas llegaban hasta el nivel de los brazos cromosómicos, sin signos que pudieran servir para diferenciar los cromosomas de una especie en particular. La uniformidad cariotípica observada indicaría por lo tanto que la diferenciación fenotípica alcanzada por estas especies no ha sido acompañada por reordenamientos cromosómicos fáciles de discernir [2]. Las diferencias cromosómicas que pudieran existir podrían estar fuera del poder de resolución de las técnicas de observación citológica empleadas en este trabajo.

Aunque se intentó el bandeamiento G y C de los preparados, no tuvimos éxito en las tinciones. Sin embargo, en algunos preparados de llama, vicuña y guanaco, durante el proceso de tinción, se dio espontáneamente, un bandeamiento G y pudimos aprovechar esta circunstancia para identificar con precisión los pares de homólogos en aquellas metafases. Por esta razón los cromosomas mostrados en la Tabla 1 y muchos otros observados a lo largo del análisis citogenético, presentan un esbozo de

bandas G. Esta circunstancia fue de gran ayuda para la identificación de los pares de cromosomas homólogos. Las fotografías de los cromosomas de alpaca se tomaron con una cámara digital CANON AB80 a un aumento de 1250X en un microscopio Axioscop-2 (ZEISS). Las fotos de los cromosomas de llamas, vicuñas y guanacos se hicieron utilizando película fotográfica KODAK Tri X-Pan en blanco y negro en un microscopio Jenamed2 (ZEISS) y una magnificación de 1000X.

Un siguiente paso debiera ser el uso de la citogenética molecular (hibridización in situ con fluorescencia) para establecer diferencias entre los cromosomas de las diferentes especies de CSA en base a la detección de diferencias sutiles en las cromátides [5].

Para el ordenamiento de los cromosomas dentro del cariotipo hemos seguido una combinación de lineamientos morfológicos explicados en los trabajos de Levan y col. [6], Hsu y Benirschke [7] y las pautas del último ISCN (International System for Human Cytogenetic Nomenclature 2005) [8] que son aplicables, como criterios generales, al análisis de los cromosomas de mamíferos.

Como ya se mencionó, no hemos realizado el análisis de los cromosomas con bandeamiento G y C debido fundamentalmente a razones técnicas (problemas de reproducibilidad de las técnicas ensayadas probablemente debido al uso de reactivos químicos caducados, pH del agua muy alcalino, material de vidrio inadecuado, etc.).

La mayor dificultad para la identificación de los cromosomas en estas especies es la pequeñez y similitud estructural de por lo menos 12 pares de cromosomas autosómicos. Los cromosomas sexuales son relativamente fáciles de identificar. El X es un enorme metacéntrico y el Y es un pequeño subteloecéntrico (Tabla 1).

Con 74 cromosomas por célula es difícil incluso hacer el recuento cromosómico en metafase. Sin embargo, la extensión de los cromosomas mejora mucho cuando al momento de la preparación citológica, con el portaobjetos frío y aún sin muestra, se deja caer sobre el vidrio helado una gota de ácido acético puro e inmediatamente hacer el goteo de la muestra sobre la lámina. Se obtuvieron extendidos de metafases de buena calidad en la mayor parte de las muestras procesadas de este modo.

Pese a que los estudios de bandeamiento G en CSA han mostrado ciertas diferencias en los patrones de estas bandas, las similitudes de los patrones de bandas C y G, sumadas a las similitudes en el número $2N = 74$ y la morfología cromosómica refuerzan la tesis que la Familia *Camelidae* tiene un cariotipo muy conservado en términos evolutivos [9].

5. Conclusiones

5.1 El número cromosómico obtenido del estudio citogenético de las especies estudiadas ha sido confirmado en $2n = 74, XY$.

5.2 Bajo las condiciones de este estudio, no se encontró diferencias morfológicas intraespecíficas en los cromosomas de los animales provenientes de diferentes localidades del Perú.

5.3. La similitud cromosómica de las especies de CSA refuerza los hallazgos recientes de similitudes entre secuencias del gen del citocromo b y marcadores moleculares SSR (Secuencias simples repetidas) y RAPD (marcadores anónimos polimórficos) [10].

5.4. Aunque hay pequeñas diferencias en la longitud de ciertos segmentos cromosómicos, podemos aceptar que los cromosomas del cariotipo de las especies estudiadas son muy similares, pudiendo ser agrupados en cuatro grupos: Un grupo A con 10 pares de subteloecéntricos (cromosomas del 1 al 10), un grupo B con 10 pares de telocéntricos (cromosomas del 11 al 20), un grupo C de 9 pares de submetacéntricos (cromosomas del 21 al 29) más el cromosoma Y, y, un grupo D: con 7 pares de metacéntricos más el cromosoma X (cromosomas del 30 al 36).

6. Referencias

- [1] Hare WCD, Ingh EL. Citogenética de la Reproducción Animal. Zaragoza: Editorial Acribia; 1979. p. 109-150.
- [2] Zapata Salfate OB. Diferenciación de Camélidos Sudamericanos mediante análisis cariotípico. [Tesis para optar el Grado de Magíster en Producción Animal] Santiago de Chile: Pontificia Universidad Católica de Chile. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal; 2000.
- [3] Larramendy M, Vidal L, Bianchi M, Bianchi N. Camélidos Sudamericanos: Estudios Genéticos. Informe Final. IX

Congreso Latinoamericano de Zoología. Octubre; Lima: Perú; 1983. p. 159–163.

[4] International Atomic Energy Agency. Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment. A Manual. Technical Reports Series N° 405. Vienna: Austria; 2001.

[5] Arias Cruz ND. Estandarización de una técnica molecular para el diagnóstico de sexo genotípico de alpacas. [tesis de Bachiller en Medicina Veterinaria]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Medicina Veterinaria; 2006.

[6] Levan AKF, Sandberg AA. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas (Lund) 1964; 52:201-220.

[7] Hsu TC, Benirschke K. An Atlas of Mammalian Chromosomes, Vol I, Folio 40. New York: Springer-Verlag; 1967.

[8] ISCN. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Shaffer LG, Niels Tommerup N, Editors. S. Karger Basel; 2005.

[9] Gallaguer DS, Womack JE. Chromosome conservation in the *Bovidae*. Journal of Heredity. 1992; 83:287-298.

[10] Capanna E, Civitelli MV. The chromosomes of three species of neotropical *Camelidae*. Mammalian Chromosomes Newsletter. 1965; 17:75.

Agradecimientos:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC) que subvencionó este trabajo a través del Contrato N° 552-2004.

A la Ing° Zootecnista Cindy Vanessa Ballardo Matos de la Universidad Nacional del Centro y al Biólogo José Arturo Olórtegui Livia de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por su apoyo en los momentos más difíciles del trabajo.

Al Consejo Nacional de Camélidos Sudamericanos (CONACS) por autorizar el muestreo de 12 guanacos.

Tabla 1: Estructura comparativa de los cromosomas de los camélidos sudamericanos.

CROMOSOMA	ALPACA	LLAMA	VICUÑA	GUANACO	IDIOGRAMA
1					
2					
3					
4					
5					

CROMOSOMA	ALPACA	LLAMA	VICUÑA	GUANACO	IDIGRAMA
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					

CROMOSOMA	ALPACA	LLAMA	VICUÑA	GUANACO	IDIOGRAMA
21					
22					
23					
24					
25					
26					
27					
28					
29					
30					
31					
32					
33					
34					
35					
36					
X					
Y					