



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIA



**ESTABLECIMIENTO DE UN BANCO GENETICO DE
CELULAS FIBROBLASTICAS DE UN EJEMPLAR GÜIÑA
(*Oncifelis guigna*)**

RODRIGO ANDRES CASTRO SANCHEZ

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Clínicas

PROFESOR GUIA: DRA. MARIANA ROJAS RAUCO

SANTIAGO, CHILE
2007



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIA



ESTABLECIMIENTO DE UN BANCO GENETICO DE CELULAS FIBROBLASTICAS DE UN EJEMPLAR GÜIÑA (*Oncifelis guigna*)

RODRIGO ANDRES CASTRO SANCHEZ

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Clínicas

NOTA FINAL :

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUIA	: MARIANA ROJAS RAUCO
PROFESOR CONSEJERO	: ESTEFANIA FLORES PAVEZ
PROFESOR CONSEJERO	: MONICA DE LOS REYES SOLOVERA

SANTIAGO, CHILE
2007

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres, José Manuel Castro Torrejón y Elvira Sonia Del Carmen Sánchez Solar, personas nobles y de buen corazón que con mucho esfuerzo supieron cimentar lo que hoy comienza, mi vida profesional.

Querido padre y madre, esta es una forma de reconocer cada uno de sus sacrificios, por los cuales estaré eternamente agradecido.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente la labor desempeñada por mi profesora guía, Dra. Mariana Rojas Rauco, quien me acogió en su laboratorio, de manera fraternal e incluso maternal, incorporándome desde un comienzo en su grupo de trabajo más cercano y entregándome las herramientas necesarias para desenvolverme a futuro, lo cual agradezco de corazón. Deseo agradecerle por cada una de las palabras de aliento recibidas y la orientación oportuna en el momento indicado.

También agradezco a mi profesora consejera, Dra. Estefanía Flores Pavez, por su constante y abnegado apoyo durante el desempeño de este estudio, conformando un equipo de excelencia junto a la Dra. Rojas, lo cual fue un pilar fundamental en esta tesis.

Deseo agradecer a los doctores: Gino Cattaneo, Pilar Soto, Sebastián Celis, Jorge Beamín y Felipe Venegas por la ayuda otorgada en la obtención de muestras dérmicas, así como también al Dr. Ignacio Idalsoaga por permitir la manipulación del ejemplar *Oncifelis guigna* en cautiverio y la utilización de las dependencias del Buin Zoo.

Agradezco a los doctores Arturo Ferreira y Cesar Romero por permitirme utilizar el Laboratorio de Criogenia de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y a la Dra. Laura Walker por el apoyo en las técnicas citogenéticas. También agradezco al Dr. Eduardo Bustos-Obregón por la formación recibida y las oportunidades otorgadas.

Finalmente, agradezco de manera muy especial el apoyo constante e incondicional que he recibido por parte de mi núcleo familiar y el de mi pareja, compañera y colega, Andrea Núñez Bustamante, quien a base de amor y amistad mantiene despierto en mí la inquietud por ser cada día mejor persona y profesional.

A todos ellos, muchas gracias.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
INDICE DE ILUSTRACIONES Y CUADROS	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	8
INTRODUCCION	9
CAPITULO 1: La güiña, <i>Oncifelis guigna</i> (Molina, 1782)	11
1.1 El gato güiña.....	11
1.2 Descripción física del gato güiña.....	12
1.3 Taxonomía	13
1.4 Distribución y hábitat.....	14
1.5 Dieta.....	15
1.6 Situación actual.....	16
CAPITULO 2: Alternativas biotecnológicas de la reproducción	19
2.1 Biotecnología reproductiva en la conservación de especies en peligro...	19
2.2 Criopreservación.....	22
CAPITULO 3: Cultivo celular	25
3.1 Historia y generalidades del cultivo celular.....	25
3.2 Biología de la célula en cultivo.....	26
3.3 Evolución de las líneas celulares.....	27
3.4 El medio de cultivo celular.....	28
3.5 El fibroblasto.....	32
CAPITULO 4: Descripción citogenética	35
4.1 Citogenética.....	35
4.2 Descripción citogenética en felinos.....	38
OBJETIVO GENERAL Y ESPECIFICOS	39
MATERIAL Y METODO	40
Material biológico.....	40
Toma de Muestras.....	40

Valoración del estudio: Morfología y proliferación celular.....	43
Valoración del estudio: Estudio inmunohistoquímico de doble marcaje.....	45
RESULTADOS	47
1) DMEM como medio de cultivo fibroblástico para el gato güiña.....	47
2) Comparación de proliferación y sobrevida celular entre los cultivos fibroblásticos del gato güiña y 3 gatos domésticos.....	47
3) Descripción inmunohistoquímica de fibroblastos obtenidos.....	54
4) Descripción citogenética de la güiña muestreada.....	56
DISCUSION	58
CONCLUSIONES	62
BIBLIOGRAFIA	63

INDICE DE ILUSTRACIONES Y CUADROS

Página.

IMAGENES

Imagen 1: El gato güiña <i>Oncifelis guigna</i>	12
Imagen 2: Hábitat característico de la güiña.....	15
Imagen 3: Primer gato doméstico clonado.....	22
Imagen 4: Morfologías cromosómicas según posición del centrómero.....	37
Imagen 5: Resumen gráfico del material y método.....	46
Imagen 6: Primeros estados del cultivo fibroblástico (96 horas).....	49
Imagen 7: Evolución del cultivo celular (diversos estados de confluencia).....	50
Imagen 8: Confluencia celular y repicaje.....	51
Imagen 9: Microscopía confocal de las células fibroblásticas obtenidas.....	55
Imagen 10: Colocalización del marcaje filamentoso y nuclear de fibroblastos...	55
Imagen 11: Linfocito de <i>Oncifelis guigna</i> detenido en metafase.....	57
Imagen 12: Cariotipo propuesto para la güiña muestreada.....	57

TABLAS

Tabla 1: Datos morfométricos de <i>Oncifelis guigna</i>	13
Tabla 2: Componentes del medio de cultivo celular DMEM.....	31
Tabla 3: Nomenclatura cromosómica según ubicación del centrómero e IC.....	37
Tabla 4: Concentración celular por placa de cultivo e individuo al 4° repicaje....	53
Tabla 5: Cuadro resumen de la morfología de los cromosomas de la güiña muestreada, por pares cromosómicos según Índice Centromérico calculado.....	56

GRAFICOS

Gráfico 1: Promedios de concentración celular en placa de cultivo al 4° repicaje según individuo.....	53
--	----

RESUMEN

En este trabajo se inicia un banco genético del gato güiña (*Oncifelis guigna*), felino endémico de Chile y Argentina en peligro de extinción. Líneas de células fibroblásticas obtenidas desde una biopsia dérmica extraída de la oreja de un ejemplar güiña y cultivada bajo condiciones adecuadas de temperatura y CO₂, fueron congeladas con nitrógeno líquido (-196°C), permitiendo preservar su información genética para futuras investigaciones en clonación heteroespecífica como alternativa biotecnológica para la reproducción de especies en peligro. Además, la sobrevivencia y proliferación celular de cultivos fibroblásticos de tres gatos domésticos (*Felis domesticus*), especie en la que ya se han logrado crías viables por medio de estas técnicas, son comparados con el cultivo del gato güiña, determinando así la factibilidad de su uso en el medio nacional. Se describe el cariotipo de la güiña muestreada, aportando con información no disponible para la especie y de valor en una segunda etapa experimental.

ABSTRACT

In the present work a genetic bank is started for guigna, “kodkod” (*Oncifelis guigna*), endangered felid endemic for Chile and Argentina. For this purpose, fibroblastic cells lines obtained from dermic biopsy taken from the ear of a guigna and cultured in a known medium under adequate conditions of temperature and CO₂, were frozen in liquid nitrogen (-196°C), thus allowing preserved its genetic information and providing material for future research in nuclear transfer as a biotechnological option for reproducing endangered species. Moreover, the cell survival and proliferation of fibroblastic cultures of three domestic cats (*Felis domesticus*), species in which viable newborns have been obtained with these techniques, are compared with guigna cultures. Hence, the factibility of pursuing this method in our country can be established. The karyotype of *Oncifelis guigna*, not as yet described, was determined for our guigna, thus contributing to the next experimental step of this research.

INTRODUCCION

La deforestación y fragmentación de los bosques nativos, sumado al reemplazo de sus especies arbóreas por otras de carácter comercial y la llegada de asentamientos humanos, han generado cambios en el paisaje nacional, lo cual ha reducido enormemente la disponibilidad de hábitat para los animales que en ellos viven. La capacidad para adaptarse a las nuevas características del entorno va en relación inversa al grado de vulnerabilidad que muestra cada especie ante los cambios ocurridos. El alto grado de especificidad de hábitat y la reducida capacidad de adaptación, que posee la güiña (*Oncifelis guigna*), uno de los felinos nativos endémicos de nuestro país, ha generado que se vea seriamente afectada al punto de ser considerada una de las especies en peligro de extinción. La limitada información disponible en la literatura actual y los escasos esfuerzos en pro de su conservación conforman un panorama incierto para la especie.

Se han realizado estudios referentes a la obtención “*in vitro*” de embriones de animales vulnerables o en riesgo de extinción, utilizando técnicas de clonación heteroespecífica por medio de la transferencia de núcleos somáticos, provenientes de células aisladas desde la especie de interés, a ovocitos enucleados de una especie donante. De esta manera se han logrado embriones viables capaces de ser implantados en el útero de una hembra receptora para continuar con las etapas del desarrollo y finalmente obtener una cría con la información genética de la especie de interés. El objetivo es proporcionar una alternativa reproductiva, en base a procedimientos biotecnológicos, que ayuden a los programas de conservación animal. Esto ha generado nuevas líneas de investigación en los mamíferos chilenos amenazados, entre los cuales destaca el pudú (*Pudu pudu*) y el huemul (*Hippocamelus bisulcus*), sin embargo no hay antecedentes concretos en líneas investigativas con respecto al gato güiña (*Oncifelis guigna*).

En este estudio se establecieron líneas celulares fibroblásticas de un gato güiña, en base a cultivo celular primario, comenzando con biopsias dérmicas obtenidas desde el pabellón auricular externo, las cuales fueron incubadas en un ambiente apropiado con medio de cultivo definido y sometidas a sucesivos pasajes celulares. Posteriormente se congelaron en nitrógeno líquido, iniciando un banco genético de la especie, el cual podrá ser utilizado en etapas futuras de experimentación que consideren a la transferencia nuclear como alternativa reproductiva. Además, se determinó el cariotipo de la güiña muestreada y se describió citogenéticamente, aportando con información no disponible aún en la literatura y que es de importancia fundamental para una segunda etapa de esta investigación.

También se muestreó y cultivó dermis proveniente de orejas de tres gatos doméstico (*Felis domesticus*), especie en la que ya se reportan éxitos reproductivos utilizando cultivo celular y posterior transferencia nuclear. Los resultados obtenidos fueron comparados con la experiencia en el ejemplar güiña, bajo criterios de proliferación y sobrevivencia celular. De esta forma se obtuvo información valiosa referente al comportamiento de los fibroblastos, de un felino endémico de nuestra región, cultivados con medio definido mediante técnica estandarizada, sentando un precedente para futuras investigaciones.

Se enfatiza en que el objetivo de este estudio fue aportar información y apoyar a los programas de conservación del gato güiña (*Oncifelis guigna*), contribuyendo de esta manera, a preservar la biodiversidad y el patrimonio genético chileno. Las técnicas utilizadas no dañaron a los ejemplar muestreado ni les causaron sufrimiento alguno. El genoma de la güiña fue preservado y no hubo manipulación genética, así como tampoco se alteró el ecosistema.

CAPITULO 1

La güiña, *Oncifelis guigna* (Molina, 1782)

1.1 El gato güiña.

El gato güiña (*Oncifelis guigna*) es uno de los representantes de las 10 especies de felinos no domésticos existentes en Sudamérica, grupo que representa el 28% del total mundial (Lucherini *et al.*, 2004). Este ejemplar está caracterizado por ser uno de los felinos silvestres más pequeños y menos conocidos a nivel mundial, habita solamente en las áreas boscosas con vegetación arbustiva densa y tiene la particularidad de ser endémico del centro sur de Chile y Argentina, por lo cual no se encuentran ejemplares, en estado silvestre, en ninguna otra parte del mundo. Fue descrito, por primera vez, en el año 1782 por el abate Molina y la mayoría de los datos recopilados, que se tienen de la especie, son de carácter anecdótico o poco actualizados (Nowell y Jackson, 1996; Acosta, 2001; Sanderson *et al.*, 2002; Dunstone *et al.*, 2002a; Freer, 2004).

Se le conoce con los nombres de kodkod (Inglaterra), chat du chili (Francia), güiña (España), gato de Santa Cruz o gato güiña (Argentina) y huiña (Chile). El origen del nombre kodkod no es claro y se postula que nace del dialecto mapuche “colocolo” en posible referencia al gato de las pampas, *Oncifelis colocolo*, quedando “kodkod” como una corrupción del vocablo “colocolo” (Nowell y Jackson, 1996).

Actualmente, *Oncifelis guigna* se encuentra en peligro de extinción debido a los profundos cambios que el hombre ha generado en su hábitat y a la baja capacidad de adaptación que la especie ha mostrado ante estos (Acosta, 2001).

1.2 Descripción física del gato güiña.

Según los registros morfométricos realizados por Sanderson *et al.*, (2002), en la isla grande de Chiloé, sobre un número de 5 güiñas adultas, las características métricas del cuerpo de la *Oncifelis guigna*, dan cuenta de un ejemplar similar al gato doméstico, en tamaño y peso, registrando los siguientes datos en milímetros macho / hembra: Circunferencia craneana 196,3 / 170, longitud del cuerpo 467,4 / 440, largo de cola 233,3 / 217,5 y masa corporal 2,2 / 1,7 Kg. Por su parte Dunstone *et al.*, (2002b), publican una serie de mediciones realizadas en el Parque Nacional Laguna San Rafael y Parque Nacional Queulat sobre un número de 13 ejemplares adultos, proporcionando registros que se expresan en rangos para macho / hembra: Masa corporal de 1,4 - 1,9 / 1,3 - 1,55 Kg., largo de la cola de 19,5 - 23 / 19 - 21,1 cm. y longitud total de 59 - 66 / 57,5 - 61 cm., según los siguientes datos resumidos en la Tabla nº 1.

El color base de su pelaje va desde el gris amarillento a un café rojizo, con pequeñas manchas negras que se distribuyen en la parte trasera y en los flancos, la cola se presenta anillada con círculos oscuros y en muchos individuos se aprecian rayas negras atravesando cara y cuello. La incidencia de melanismo aumenta a medida que se avanza hacia el sur (Freer, 2004). (Imagen 1).



Imagen 1: Gato güiña (*Oncifelis guigna*) en cautiverio, Buin Zoo, Santiago de Chile. 2007.

Tabla n°1: Datos morfométricos de *Oncifelis guigna*, Parque Nacional Queulat y Parque Nacional Laguna San Rafael.

Género y edad	Peso (Kg.)	Largo total (cm.)	Largo de cola (cm.)
Macho adulto	1,9	64,0	21,3
Macho adulto	1,9	59,0	19,5
Macho adulto	1,9	66,5	23,0
Macho adulto	1,8	62,0	22,5
Macho adulto	1,4	61,0	20,5
Macho adulto	1,8	62,0	20,0
Macho adulto	1,7	61,0	20,5
Hembra adulta	1,5	59,8	21,1
Hembra adulta	1,4	59,8	21,0
Hembra adulta	1,3	60,0	20,3
Hembra adulta	1,5	60,5	20,0
Hembra adulta	1,4	57,5	19,0
Hembra adulta	1,4	61,0	21,0

Dunstone *et al*, 2002b

1.3 Taxonomía.

Taxonómicamente, este animal se clasifica dentro del Phylum cordado, Clase mamífera, Orden carnívoro y Familia felidae, siendo su nombre científico *Oncifelis guigna* (IUCN, 2004). Se han propuesto dos subespecies de *O. guigna* en base al color del pelaje, tamaño corporal y distribución geográfica, *O. guigna guigna* y *O. guigna tigrillo*, la primera se caracterizaría por un pelaje más brillante, tamaño pequeño y de mayor presencia en el bosque lluvioso templado del sur de Chile y Argentina, en cambio *O. guigna tigrillo* sería de mayor tamaño, pelaje pálido y asociada fundamentalmente al bosque costero de Chile central. Hasta el momento no hay una explicación con base genética que confirme la existencia de subespecies dentro de la especie *guigna* (Freer, 2004).

Evolutivamente, la güiña se asocia al linaje del ocelote o linaje neotropical, establecido hace unos 3 a 8 millones de años, del cual deriva el grupo denominado pequeños felinos de Sudamérica y que está conformado por 7 representantes: ocelote (*Leopardus pardalis*), tigrina (*Leopardos tigrinus*), margay (*Leopardos wiedii*), gato andino (*Oreailurus jacobita*), colocolo (*Oncifelis colocolo*), gato de Geoffroy (*Oncifelis geoffroyi*) y el gato güiña (*Oncifelis guigna*) (Pecon Slattey *et al.*, 1994; Masuda *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 1998, 1999, 2006).

1.4 Distribución y hábitat.

Esta especie presenta una de las distribuciones geográficas más restringidas del mundo, encontrándose únicamente en el territorio chileno y argentino. En Chile se ubica entre los meridianos 70° a 75° O y los paralelos 30° a 48° S, es decir, entre la IV y la XI región, aunque sus avistamientos recientes sólo la describen desde la provincia de Santiago hasta el sur de la isla grande de Chiloé, las Guaitecas y el parque nacional Laguna San Rafael, desde el nivel del mar hasta el límite de la vegetación. Su hábitat comprende zonas de bosque nativo y arbustivo de alta densidad, evitando transitar por espacios abiertos e intervenidos por el hombre (Nowell y Jackson, 1996; Quintana *et al.*, 2000; Yensen y Seymour, 2000; Sanderson *et al.*, 2002; Freer, 2004). (Imagen 2).

La densidad poblacional y el rango de movimiento espacial han sido establecidos por Dunstone *et al.*, (2002b), en base al estudio telemétrico efectuado sobre 6 ejemplares marcados con radio collares en el área sur del país. Así se estimó que la densidad poblacional es de 0,97/Km², pudiendo llegar a ser de 3,3/Km², debido al avistamiento de ejemplares, durante el estudio, que no contaban con el dispositivo. El área media de movimiento espacial fue de 288 hectáreas para machos y de 240 hectáreas para hembras, lo cual es un espacio territorial muy reducido, considerando su condición de carnívoro y más aún, esta área se puede ver disminuida ante la presencia de competidores o predadores oportunistas dados los cambios ocurridos en su hábitat (Dunstone *et al.*, 2002b).



Imagen 2: Hábitat característico de la güiña, bosque nativo de vegetación densa. Reserva nacional Los Queules VII Región, Chile 2007.

1.5 Dieta.

Su alimentación es en base a pequeños roedores, aves silvestres y domésticas, lagartijas y ocasionalmente material vegetal (Dunstone *et al.*, 2002a; Sanderson *et al.*, 2002). Posee un comportamiento preferentemente nocturno y su facilidad para trepar le permite cazar presas, tanto en los árboles como en la superficie terrestre (Sanderson *et al.*, 2002).

El estudio de las fecas, publicado por Correa y Roa en el año 2005, permite determinar que la dieta de *Oncifelis guigna*, en la zona central de Chile, está compuesta, principalmente, por pequeños mamíferos (65% de las presas) seguida de pequeños invertebrados (25,8%) y de semillas. El mamífero más consumido fue la laucha de pelo largo (*Abrothrix longipilis*) (27,3%) y el artrópodo más frecuente fue la madre de la culebra (*Acanthinodera cummingi*) (62,5% de los invertebrados). En el 88,2% de las

fecas se encontraron restos de mamíferos, mientras que en el 41,2% se evidenció el consumo de artrópodos y sólo en dos fecas se hallaron semillas de maqui (*Aristotelia chilensis*) y *Pinus radiata*, sin encontrarse restos de aves. Por su parte, Sanderson *et al.*, (2002) sí reportó la caza de aves como el tordo (*Turdus falklandii*), chucao tapaculo (*Scelorchilus rubecula*), huet-huet (*Pterotochos tarnii*) e incluso aves de corral como la gallina doméstica.

1.6 Situación actual.

La gran especificidad de hábitat y la baja capacidad de adaptación a los cambios del paisaje, mostrados por *Oncifelis guigna*, han hecho que la creciente deforestación y fragmentación del bosque nativo nacional afecten, enormemente, a esta especie (Acosta, 2001; Acosta y Simonetti, 2004). El bosque nativo ha experimentado un progresivo reemplazo de su flora por una de carácter comercial, como lo son las coníferas (ej. *Pinus radiata*), este tipo de plantaciones se ha extendido preferentemente en el bosque costero de Chile central, donde se reportó un reemplazo de más del 31% del bosque nativo, durante el período 1978 – 1987 (Donoso y Lara, 1996).

A los cambios ya mencionados se les asocian una serie de otras alteraciones que ponen en riesgo a las especies endémicas de los bosques nativos, entre estas están:

a) La reducción en el número de presas disponibles: El estudio publicado por Vergara y Simonetti (2003), expone que los nidos de las aves pertenecientes a la familia de los Rinocriptidos, caracterizadas por poner sus nidos a nivel del suelo y que conforman parte de la dieta de *Oncifelis guigna*, son predados tres veces más en los territorios intervenidos que en los territorios de bosque nativo, poniendo en riesgo su disponibilidad. En general, las poblaciones de predadores responden a los cambios en la disponibilidad de las presas, ya sea alterando su número (baja en tasa reproductiva, muerte o migración) o cambiando a presas alternativas (Angerbjorn *et al.*, 1999). La población del gato Geoffroy (*Oncifelis geoffroyi*) aumentó considerablemente su área de

acción y declinó en número cuando estuvo sometida a estrés alimentario por disminución en la disponibilidad de roedores durante un período de sequía (Pereira *et al.*, 2006).

b) Aislamiento de las subpoblaciones por fragmentación del ambiente: La pérdida y la fragmentación del hábitat han sido identificadas como las principales amenazas para la supervivencia de la güiña. Once metapoblaciones de *Oncifelis guigna* fueron identificadas en los bosques costeros de Chile central. Se entiende por metapoblación al grupo de subpoblaciones conectadas, entre sí, por individuos que transitan entre ellas. Al proyectar su viabilidad, en el tiempo, en base a la estimación del tamaño territorial, número de individuos, intensidad del talaje y posibilidad de conexión entre subpoblaciones, se determinó que teóricamente sólo la metapoblación Nahuelbuta podría ser capaz de mantenerse, por sí misma, en el mediano plazo, el resto estaría destinado a desaparecer (Acosta *et al.*, 2003).

Todo este panorama ha contribuido a que hoy en día la güiña haya sido considerada en peligro de extinción (Glade, 1993) e incluida en el apéndice II de CITES y en la “red list” de la International Union for Conservation of Nature (IUCN, 2004) formando parte de las especies vulnerables, basándose en la reducida distribución geográfica que presenta y en la estimación poblacional desarrollada, la cual indica que el número efectivo de individuos maduros no supera los 10.000 ejemplares, con una tendencia a la disminución debido a la pérdida de hábitat y a la persecución por parte del hombre. Sumado a esto, se calcula que no existirían subpoblaciones con más de 1.000 individuos maduros (IUCN, 2004). Es así como Cofré y Marquet (1999), le asignan a la güiña y a su entorno, uno de los más altos valores dentro del Índice de prioridad de conservación calculado para los mamíferos terrestres chilenos.

El interés científico por desarrollar líneas de investigación en la conservación de los felinos sudamericanos, ha experimentado un fuerte auge a nivel mundial durante la

última década. Así se han establecido bases sólidas en los conocimientos de áreas como: gametología, embriología, endocrinología y criobiología, para la mayoría de las especies de la región, pensando en ser aplicados a programas de reproducción asistida, sin embargo ninguno de estos estudios ha sido realizado tomando como ejemplo al gato güiña (Swanson y Brown, 2004).

La urgente necesidad por generar información, referente al comportamiento ecológico y biológico de *Oncifelis guigna*, queda de manifiesto en el estudio publicado por Lucherini y colaboradores en el año 2004. En este, se establece un ranking de prioridad en investigación, dentro de los felinos sudamericanos existentes en Argentina, en base a la evaluación de los esfuerzos científicos tanto regionales como mundiales y a las características de vulnerabilidad y especificidad de hábitat mostradas por cada especie. Debido al menor número de publicaciones y al fuerte grado de vulnerabilidad mostrado, la güiña obtuvo el primer lugar dentro de las prioridades de investigación.

Recientes publicaciones efectuadas por autores nacionales y extranjeros, han permitido conocer más en detalle el comportamiento de la güiña dentro de su hábitat, detallando su distribución espacial, territorialidad, interacción con su entorno y dieta, reconociendo así fortalezas y debilidades ante la intervención antrópica (Acosta, 2001; Dunstone *et al.*, 2002ab; Simonetti *et al.*, 2002; Sanderson *et al.*, 2002; Freer, 2004), sin embargo no se han desarrollado avances en el conocimiento de las variables biológicas en cuanto a su estrategia reproductiva, información indispensable para reforzar los programas de conservación.

Sólo se ha logrado estimar que un ejemplar puede llegar a vivir 11 años y que poseería un ciclo reproductivo clasificado como poliéstrico estacional de días cortos con un largo gestacional que variaría entre 72 a 78 días pariendo camadas que van entre 1 a 4 cachorros (Freer, 2004).

CAPITULO 2

Alternativas Biotecnológicas de la Reproducción

Las biotecnologías reproductivas comprenden técnicas que permiten aumentar la eficiencia reproductiva de los animales. Entre estas se encuentran: Inseminación artificial, congelación de semen, sincronización e inducción de la ovulación, superovulación, transferencia embrionaria y congelación de embriones, clonación de animales por medio de transferencia nuclear, determinación y selección del sexo de embriones y espermatozoides, producción "*in Vitro*" de embriones, micromanipulación de embriones para producir mellizos homocigotos y quimeras. Cada una de estas técnicas tiene importancia "*per se*", pudiendo ser utilizadas en forma individual o combinadas entre sí (Palma y Brem, 2001).

2.1 Biotecnologías reproductivas en la conservación de especies en peligro.

Muchas especies de animales silvestres están en peligro de extinción por introducción de especies competidoras, pérdida de sus hábitats naturales o por caza indiscriminada. Aunque la reproducción natural debiera ser el método de elección para incrementar el número poblacional de una determinada especie, cuando esta se encuentra reducida en número disminuye la probabilidad de encuentro, por lo cual las alternativas biotecnológicas de la reproducción podrían ser un aporte de valor a la hora de trabajar en la conservación de animales en riesgo (Holt *et al.*, 1996; Holt y Pickard, 1999; Fernández, 1999; Holt *et al.*, 2004).

La reproducción de especies en peligro de extinción o en estado vulnerable, podría favorecerse por el uso de material genético almacenado, el cual provendría de parques zoológicos, reservas naturales y universidades (Wildt *et al.*, 1997). Las técnicas a utilizar incluyen inseminación artificial, transferencia de embriones, fecundación "*in vitro*", inyección intracitoplasmática ICSI (Comizzoli *et al.*, 2000; Pope, 2000) y clonación por transferencia nuclear (Wells *et al.*, 1998; Fernández, 1999; Wells, 2000).

El proyecto argentino titulado “Asistencia a la Reproducción y Conservación Animal” (ARCA), de la Fundación Bioandina Argentina, mantiene un banco genético que almacena espermatozoides, ovocitos, embriones y tejidos de diversas especies en peligro, para desarrollar técnicas de reproducción asistida. Esto ha permitido la obtención de tres crías de Muflón Corso (*Ovis musimon*) mediante inseminación artificial con semen congelado a -196°C , comprobando la utilidad del banco y los beneficios que brinda a favor de la conservación de especies silvestres. Sin embargo, no se reporta el almacenamiento de células o tejidos de güiña (Bioandina Argentina, 2003).

Se ha considerado la restitución de especies en peligro de extinción, en base a clonación por transferencia nuclear, técnica que requiere el establecimiento de bancos genéticos que consideren la criopreservación de células somáticas (diploides) obtenidas a partir de biopsias, raspados de mucosa bucal o folículos pilosos. Posteriormente, la técnica considera la transferencia de uno de estos núcleos a un oocito, previamente enucleado, donado por la misma especie u otra cercana, obteniendo un embrión capaz de continuar con las etapas posteriores del desarrollo en el útero de una hembra receptora tratada hormonalmente para tales efectos (Wells *et al.*, 1998; Fernández, 1999; Comizzoli *et al.*, 2000; Rojas *et al.*, 2004 y 2006).

Actualmente, son numerosos los casos en los que se han conseguido crías a través de clonación por transferencia nuclear de una célula somática a un ovocito enucleado, por ejemplo, se han logrado crías de la raza bovina Enderby Island, adaptada a condiciones climáticas extremas, transfiriendo núcleos de células de la granulosa a oocitos enucleados, de vaca doméstica (Wells, 2000); Así también se han obtenido crías vivas de conejos (Yang, 2005), cerdos (Onishi *et al.*, 2000), equinos (Hinrichs *et al.*, 2006) y perros (Jang *et al.*, 2007) mediante la transferencia de un núcleo fibroblástico a un ovocito enucleado. Se ha diagnosticado preñez luego de implantar un embrión obtenido por transferencia nuclear somática desde una célula de argali (*Ovis ammon*) a un ovocito enucleado de oveja doméstica (*Ovis aries*) (White *et al.*, 1999) y utilizando

las mismas técnicas se han reportado la obtención de blastocistos de oso panda gigante (*Ailuropoda melanoleuca*) en oocitos de conejo (Chen, 1999) y blastocistos de pudú (*Pudu pudu*) en oocitos de vaca (Venegas *et al.*, 2006), este último es un ejemplo más cercano ya que fue realizado por científicos de la Universidad de Chile en un grupo liderado por la Dra. Mariana Rojas.

El cultivar y almacenar células fibroblásticas, extraídas desde una biopsia dérmica de la especie de interés, permite el establecimiento de un banco genético de ésta, el cual puede ser utilizado en técnicas de transferencia de núcleos somáticos. Actualmente, se han establecido bancos de líneas celulares fibroblásticas de gatos domésticos, tras sucesivos pasajes celulares de muestras de tejido fetal, 14 días post fecundación y de tejido dérmico abdominal adulto, incubados con medios de cultivo apropiados, utilizando como base al DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Médium) adicionado con 10% de suero fetal bovino (Kitiyanant *et al.*, 2003).

El año 2002 Shin *et al.*, comunicó el nacimiento del primer gato doméstico (*Felis domesticus*) clonado mediante transferencia nuclear, desde células fibroblásticas de gato a ovocitos enucleados de la misma especie. Así se obtuvo un embrión viable capaz de continuar con las etapas del desarrollo, el cual fue transferido al útero de una gata doméstica receptora (Imagen 3).

La transferencia de núcleos fibroblásticos a ovocitos enucleados, como alternativa de reproducción para las especies en peligro de extinción, ya ha sido introducida en especies de felinos silvestres. Es así como se han obtenido embriones del gato africano silvestre (*Felis silvestris libica*) a partir de la fusión de uno de sus fibroblastos con un ovocito enucleado de gata doméstica (Gómez *et al.*, 2003), clonación heteroespecífica cuyo desarrollo genera alternativas ventajosas para el trabajo con especies vulnerables o en peligro, pues su reducido número poblacional complica la utilización de sus ejemplares.

Estos últimos informes sientan las bases a seguir en las especies felinas y darían un futuro auspicioso para el establecimiento de un banco genético de *Oncifelis guigna*, en base a líneas fibroblásticas obtenidas mediante cultivo celular.



Imagen 3: Primer gato doméstico clonado a) Gata donante del núcleo somático b) gato clonado junto a la hembra receptora (madre sustituta). Shin *et al.*, 2002

2.2 Criopreservación.

Los pequeños núcleos poblacionales de especies animales en peligro, son más vulnerables al riesgo de extinción y por lo tanto, a la pérdida del ADN contenido en el núcleo celular, atentando contra la diversidad genética. La congelación de sus gametos, embriones o células, ofrece la potencialidad de preservar el genoma animal mediante la creación de bancos de recursos genéticos, donde se mantengan a bajas temperaturas (-196°C), en forma indefinida (Vázquez *et al.*, 1998), proporcionando material biológico a los programas reproductivos basados en inseminación artificial, transferencia embrionaria o clonación por transferencia nuclear (Long *et al.*, 2003).

La congelación de tejidos biológicos es un proceso fisicoquímico complejo de intercambio de calor y agua entre las células y el medio externo que culmina en un cambio de fase líquida a sólida (Aller *et al.*, 1995). La utilización de temperaturas lo suficientemente bajas hace posible la conservación de células vivas a través del cese de las reacciones químicas inducidas térmicamente (Cabodeviña y Taruel, 2001) y de los procesos de envejecimiento y degeneración celular (Vázquez *et al.*, 1998).

Los procesos de congelación y posterior descongelación someten a las células a eventos altamente estresantes, causando daños tanto a la membrana celular como a los organelos citoplasmáticos y al citoesqueleto. El daño directo, que el congelamiento causa en las células, ha sido explicado por dos mecanismos: a) Formación de hielo intracelular y b) Efecto de solución, actuando uno o el otro dependiendo de la tasa de enfriamiento del sistema (Cabodeviña y Taruel, 2001; Han y Bischof, 2004; Moore *et al.*, 2006). Las tasas de enfriamiento excesivamente rápidas cristalizan el agua intracelular dañando organelos y citoesqueleto, si a esto se suma una descongelación lenta, los cristales sufren un crecimiento adicional, provocando un daño mecánico que compromete la vida celular. Por el contrario, cuando se utilizan tasas de enfriamiento muy lentas se produce el efecto de solución, ya que al iniciarse el descenso de la temperatura comienza a formarse hielo en la solución extracelular con la consecuente concentración de sales en la fracción no congelada, la diferencia de presión osmótica genera la deshidratación celular pues esta cede agua al medio externo, generando disminución del volumen celular y destrucción de la membrana plasmática. Todo esto hace necesario deshidratar, parcialmente, los tejidos antes de su congelación, mediante la incorporación de agentes crioprotectores a la solución de congelación, los cuales protegen a las células antes y durante la congelación (Han y Bischof, 2004; Moore *et al.*, 2006). Los crioprotectores son sustancias de bajo peso molecular que pueden penetrar o no a través de la membrana plasmática. Entre los crioprotectores que si penetran la membrana plasmática se encuentran: Glicerol, dimetilsulfóxido, propilenglicol y etilenglicol. Dentro de los crioprotectores que no penetran la membrana plasmática se

encuentran distintos azúcares, entre estos: Sucrosa, trealosa, glucosa y rafinosa; Además de macromoléculas como: Polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico y hialuronidato. Si bien cada crioprotector tiene mecanismos propios de acción, sus efectos generales son estabilizar las membranas celulares, producir la salida de del agua intracelular y reducir la concentración de electrolitos del medio extracelular (Cabodeviña y Trael, 2001).

La congelación convencional, a -196°C , considera 4 etapas comunes en las distintas técnicas: La primera etapa contempla la exposición, del material biológico a congelar, a concentraciones molares crecientes de los agentes crioprotectores, promoviendo la salida del líquido celular. Una segunda etapa considera el enfriamiento desde temperaturas fisiológicas hasta temperaturas que causan el cese de todas las reacciones químicas inducidas térmicamente. La tercera etapa guarda relación con el calentamiento desde la temperatura de conservación a temperaturas fisiológicas. Finalmente, la cuarta etapa consiste en la extracción del crioprotector. Los tejidos alcanzan un equilibrio osmótico antes de comenzar el descenso de la temperatura y lo mantienen durante el enfriamiento, esto se lleva a cabo lentamente permitiendo al tejido contraerse y ceder agua, en respuesta del incremento gradual de la concentración de la solución extracelular (Cabodeviña y Trael, 2001).

La eficiencia de la clonación, mediante técnicas de transferencia nuclear, depende de múltiples factores. Entre estos, son de crucial importancia los protocolos escogidos para la congelación y mantención del banco genético, pues tasas de enfriamiento no adecuadas podrían dañar las membranas biológicas, afectando la fusión del núcleo somático con el oocito enucleado. Así, el proceso de congelamiento es un paso crítico para el éxito de esta técnica (Hayes *et al.*, 2005).

CAPITULO 3

Cultivo celular

3.1 Historia y generalidades del cultivo celular.

Actualmente se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten la división, crecimiento y mantención *in vitro* de un tipo de células, preservando al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas, mediante la replicación de las condiciones de tonicidad, pH, temperatura y nutrientes del medio extracelular *in vivo*, así como también busca asimilar las influencias de las señales químicas, hormonales y factores de crecimiento que permiten su desarrollo en forma controlada (Alberts *et al.*, 1996; Smith y Wood, 1996; Reina, 2003a).

El cultivo de tejidos animales tiene sus orígenes en 1907, con el zoólogo R. Harrison, quien fue el primer autor en utilizar técnicas *in vitro* para el estudio de fenómenos *in vivo* (Reina, 2003a). Este científico trató de comprobar la hipótesis conocida como teoría neuronal, la cual afirmaba que cada fibra nerviosa es una prolongación de una sola célula y no el producto de la fusión de varias de ellas. Para esto, colocó pequeños fragmentos de médula espinal de rana, en plasma coagulado, dentro de una cámara húmeda y caliente, al cabo de un día pudo observar al microscopio que las distintas células nerviosas emitían prolongaciones largas y finas hacia el plasma coagulado, demostrando la teoría neuronal y estableciendo las bases de la revolución del cultivo celular (Alberts *et al.*, 1996; Reina, 2003a).

En general, bajo condiciones adecuadas, los distintos tipos celulares, tanto animales como vegetales, sobreviven, se diferencian e incluso expresan propiedades diferenciales en un cultivo (Alberts *et al.*, 1996; Smith y Wood, 1996). Salvo las células asociadas a fluidos biológicos, como los linfocitos sanguíneos, la mayoría de las células derivadas de tejidos animales no están adaptadas a crecer en suspensión, de forma que

necesitan una superficie sólida sobre la cual poder crecer y dividirse, por lo tanto, se les llama células dependiente de anclaje. Actualmente esta superficie de soporte está mayormente representada por material de plástico (poliestireno) en formas de botellas o placas (Alberts *et al.*, 1996; Smith y Wood, 1996).

Los cultivos preparados directamente a partir de los tejidos de un organismo, con o sin fraccionamiento previo, reciben el nombre de cultivos primarios. En la mayoría de los casos, las células de los cultivos primarios pueden recuperarse de las placas de cultivo y utilizarse para formar un gran número de cultivos secundarios. De esta forma las células pueden ser subcultivadas repetidamente durante semanas o meses. A menudo estas células muestran propiedades diferenciadas típicas de sus orígenes, así por ejemplo, los fibroblastos continúan segregando colágeno (Alberts *et al.*, 1996).

3.2 Biología de la célula en cultivo.

En el proceso de establecimiento de un cultivo celular se seleccionan las células que crecerán según numerosos criterios, así sólo formarán el cultivo aquellas células que sean capaces de superar el proceso de disgregación y de adherirse al sustrato para proliferar en forma de monocapa. Las células dependientes de anclaje no iniciarán su proliferación hasta encontrarse adheridas a una superficie. Cuando un cultivo es mantenido en el tiempo se establece una nueva selección, aumentando en número aquellas células que tienen una mayor tasa de crecimiento. En el momento en que se alcanza la confluencia, en general, las células detienen su crecimiento. Así pues, se ha de entender el cultivo como un ente dinámico en el que las proporciones relativas de los diferentes elementos que lo conforman varían en el tiempo en función de la presión selectiva a la que estén sometidos (Reina, 2003a).

Las células animales en cultivo experimentan tres fases distintas: 1) Fase de retardo: Es un período de crecimiento “cero” cuando el explante o las células han sido recién incluidas en el medio de cultivo. El tiempo transcurrido en esta fase depende del

tipo celular y del estado metabólico, de éste, al momento de iniciado el cultivo. 2) Fase de crecimiento exponencial: Período de continuas divisiones celulares, en esta etapa el número de células animales normalmente se duplica en 15 a 25 horas. 3) Fase estacionaria: Período después del crecimiento exponencial, no hay cambios en la densidad del cultivo celular y ocurre por disminución en la concentración de nutrientes, por acumulación de metabolitos inhibitorios o por confluencia celular. Un continuo recambio de medio de cultivo o la creación de subcultivos celulares (repicajes) puede mantener la fase de crecimiento exponencial por una mayor cantidad de tiempo (Smith y Wood, 1996; Cristofalo *et al.*, 2004).

3.3 Evolución de las líneas celulares.

La mayoría de las células de los vertebrados demuestra una capacidad limitada de divisiones en cultivo, manifestando en las últimas etapas del cultivo, una reducción gradual de sus propiedades de crecimiento y en el potencial de replicación, para luego morir tras un paso finito de divisiones, así se describe una senescencia de la replicación celular (Cristofalo *et al.*, 2004), la cual es posible determinar por un fenotipo característico, que en los fibroblastos incluye un alargamiento y flacidez celular con un concomitante aumento en el tamaño de los núcleos y nucléolos, incremento en el número de lisosomas y Golgi, aparición de vacuolas en citoplasma y retículo endoplásmico, junto con el incremento de microfilamentos citoplasmáticos.

Las líneas celulares eucarióticas constituyen una fuente ampliamente utilizada para la obtención de células homogéneas. Las células cutáneas humanas en cultivo sobreviven durante algunos meses, dividiéndose únicamente entre 50 y 100 veces antes de morir. Se sugirió que esta vida limitada estaba relacionada con la vida limitada del animal del que derivan las células, sin embargo en cultivos, ocasionalmente, surgen algunas células que han sufrido algún cambio genético que las hace realmente inmortales, estas células proliferan indefinidamente y pueden propagarse como una línea celular (Alberts *et al.*, 1996; Smith y Wood, 1996). Las líneas celulares, tanto

transformadas como no transformadas resultan extremadamente útiles para la investigación celular como fuente de un número muy elevado de células de un tipo uniforme, especialmente porque se pueden guardar en nitrógeno líquido a -196°C durante un período indefinido de tiempo y después de descongeladas todavía son viables. Sin embargo, es importante reconocer que las células de ambos tipos de líneas celulares casi siempre difieren de sus células progenitoras de los tejidos de las que derivan, en características fenotípicas o en las tasas de replicación (Alberts *et al.*, 1996; Smith y Wood, 1996).

3.4 El medio de cultivo celular.

El cultivo celular se realiza en medios artificiales preparados mediante la mezcla de componentes purificados o de soluciones orgánicas complejas, en el interior de instrumentos que mantienen las condiciones físico-químicas adecuadas y sobre soportes o recipientes que los contienen y aíslan del medio exterior. Por ello, los elementos principales del medio de cultivo son: 1) La naturaleza del sustrato o fase en que crecen las células. 2) Las condiciones fisicoquímicas y fisiológicas del medio. 3) La naturaleza y composición de la fase gaseosa. 4) Las condiciones de incubación, especialmente humedad y temperatura (Reina, 2003b).

Dentro de las propiedades físicas del medio de cultivo se encuentran: pH, osmolaridad, temperatura y viscosidad (Reina, 2003b).

- pH: En general, el pH óptimo de crecimiento, para la mayoría de los tipos celulares, es de 7,4 y como indicador se utiliza el rojo fenol, el cual vira su coloración dependiendo del pH del medio, así presenta coloración rojiza a pH 7,4, naranja a pH 7, amarillo a pH 6,5, azul-rojo a pH 7,6 y púrpura a pH 7,8. Un componente tamponador es generalmente utilizado para evitar cambios bruscos de pH, entre estos se menciona al tampón bicarbonato y al HEPES.

- Osmolaridad: La mayoría de los tipos celulares crece adecuadamente dentro de un rango de 260 a 320 mOsm/Kg, con pequeñas variaciones dependiendo del tipo celular. Se recomienda utilizar medios ligeramente hipotónicos para compensar la evaporación durante el período de incubación.
- Temperatura: La temperatura tiene gran influencia en la tasa de crecimiento de las células dada la regulación que esta ejerce en los procesos metabólicos, por lo cual, debe mantenerse cercana a los 38°C.
- Viscosidad: Está determinada fundamentalmente por los componentes del medio, no tiene gran influencia en la tasa de crecimiento celular, pero si es importante para evitar el daño celular en la agitación del cultivo (menor daño a mayor viscosidad).

En cuanto a la fase gaseosa, sus componentes más significativos son el oxígeno (O₂) y el dióxido de carbono (CO₂). Para la mayoría de los cultivos celulares, las necesidades de oxígeno son cubiertas por la tensión atmosférica (95% de O₂), sin embargo es necesario mantener un control más detallado de la tensión de CO₂ atmosférico, ya que juega un complejo papel dentro de medio de cultivo, debido a que influye en el pH y en la cantidad de iones HCO₃⁻ disueltos en él, por lo tanto es recomendable que se mantenga estable y cercana al 5% (Smith y Wood, 1996; Reina, 2003b).

La mayoría de los medios de cultivo están formados por los siguientes elementos (Reina, 2003b):

- a) Soluciones salinas equilibradas: Es una mezcla de sales inorgánicas que incluye usualmente bicarbonato sódico y suplementada con glucosa. Se utilizan para

diluir medios más complejos o para incubaciones cortas que requieren un medio isotónico no completo nutricionalmente.

- b) Aminoácidos: Se hace indispensable la presencia de los aminoácidos esenciales que cubran los requerimientos celulares, normalmente se suplementa con glutamina.
- c) Suplementos orgánicos de bajo peso molecular: Dependiendo del medio pueden ser piruvato, lípidos o nucleósidos intermediarios del ciclo de Krebs.
- d) Hormonas y factores de crecimiento: En los medios no definidos suelen ser aportados por el suero (Ej: Suero fetal bovino) el cual, a pesar de tener una composición conocida, posee componentes en cantidades variables que pueden influir notablemente en el cultivo, por lo cual su utilización puede ser problemática (Smith y Wood, 1996).
- e) Inhibidores del crecimiento de los contaminantes: Antibióticos y antifúngicos deben ser adicionados bajo estricto control para evitar efectos nocivos sobre el cultivo, esto debe ir acompañado de una cuidadosa manipulación aséptica para asegurar un bajo riesgo de contaminación (Smith y Wood, 1996).

Vitaminas y glucosa también son suplementos frecuentes en los medios de cultivo, la limitación de vitaminas se manifiesta en la supervivencia de las células y en la reducción de la tasa de crecimiento. La glucosa, que constituye la fuente de energía en muchos medios de cultivos es metabolizada, preferentemente, vía glucólisis hacia piruvato, el cual puede ser convertido en lactato o acetoacetato que entra en el ciclo de Krebs (Reina, 2003b).

Uno de los medios de cultivo celular, más ampliamente utilizado, es el DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) que incluye una mezcla compleja de

carbohidratos, aminoácidos, sales, vitaminas, hormonas y factores del crecimiento (Smith y Wood, 1996). Contiene cuatro veces la concentración de aminoácidos y vitaminas que el medio basal de Eagle (Reina, 2003b) (Ver Tabla N° 2).

Tabla n° 2: Componentes del medio de cultivo celular DMEM

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	powder (mg/L)
Inorganic Salts	
CaCl ₂ (anhyd.)	200.00
Fe(NO ₃) 9H ₂ O	0.10
KCl	400.00
MgSO ₄ (anhyd.)	97.67
NaCl	6400.00
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	125.00
Other Components	
D-Glucose	4500.00
Phenol Red	15.00
Sodium Pyruvate	110.00
Amino Acids	
L-Arginine HCl	84.00
L-Cystine 2HCl	63.00
L-Glutamine	584.00
Glycine	30.00
L-Histidine HCl H ₂ O	42.00
L-Isoleucine	105.00
L-Leucine	105.00
L-Lysine HCl	146.00
L-Methionine	30.00
L-Phenylalanine	66.00
L-Serine	42.00
L-Threonine	95.00
L-Tryptophan	16.00

L-Tyrosine 2Na 2H ₂ O	104.33
L-Valine	94.00
Vitamins	
D-Ca pantothenate	4.00
Choline Chloride	4.00
Folic Acid	4.00
i-Inositol	7.20
Niacinamide	4.00
Riboflavin	0.40
Thiamine HCl	4.00

Smith y Wood, 1996

3.5 El fibroblasto.

Es la célula principal o más abundante del tejido conectivo que se caracteriza por elaborar los precursores de los componentes de la matriz extracelular (MEC), de este hecho se desprende que su nombre signifique “formador de fibras” (Fawcett, 1986; Paniagua *et al.*, 1997; Geneser, 2000).

Este tipo celular se encuentra distribuido a lo largo del tejido conectivo, entre los paquetes de las fibras colágenas, generalmente presenta un aspecto fusiforme, ahusado y evidenciando proyecciones citoplasmáticas o procesos filamentosos de grosor variable, pero también se le puede apreciar estrellada, aplanada y con numerosas prolongaciones delgadas (Fawcett, 1986; Paniagua *et al.*, 1997; Geneser, 2000). Teñidas con Hematoxilina-Eosina y observadas bajo microscopía óptica, presentan un citoplasma usualmente eosinofílico, pero tan débilmente teñido que apenas se visualiza, por lo tanto sólo se ve un núcleo ovoide, conteniendo uno o dos nucléolos y escasa cromatina. Utilizando microscopía electrónica se puede observar un escaso retículo endoplásmico rugoso (RER) y un pequeño aparato reticular de Golgi, estas características describen a un fibroblasto no activo (Geneser, 2000). En condiciones de estimulación, por ejemplo heridas, los fibroblastos inician la elaboración de componentes extracelulares, su

citoplasma aumenta en cantidad y se torna de coloración basófila, el RER y el aparato de Golgi se desarrollan y evidencian numerosas cisternas, así el fibroblasto adquiere la apariencia de una célula glandular activa ocupada en la síntesis y secreción de productos extracelulares (Fawcett, 1986; Geneser, 2000).

La estimulación también puede inducir su proliferación mediante divisiones mitóticas que son mediadas por un factor de crecimiento llamado “factor de crecimiento fibroblástico” (FGF), el cual es secretado por macrófagos y desarrolla su acción uniéndose a receptores específicos en la superficie de las membranas fibroblásticas, ejerciendo un poderoso efecto mitógeno. Además, existe estimulación por parte de vitaminas y hormonas, así como también de otros factores de crecimiento, tales como: Factor de crecimiento de células epiteliales (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento similares a la insulina, tipo I y II (IGF-I, también llamado somatomedina C, e IGF-II) y los factores de crecimiento transformantes, alfa y beta ($TGF-\alpha$ y $TGF-\beta$) (Paniagua *et al.*, 1997).

Los fibroblastos no abandonan el tejido conectivo pero si pueden desplazarse por él, mediante movimientos ameboides, para ello son fundamentales los filamentos de actina (fibrillas del citoesqueleto). El movimiento se inicia cuando un lado de la célula emite pseudópodos, los cuales se desarrollan por polimerización de actina, presentando un elevado contenido de ella. Los pseudópodos se denominan lamelopodios cuando las evaginaciones son anchas y filopodios cuando son delgadas. Una vez desarrollada la evaginación, el pseudópodo se fija a la superficie en lugares llamados “adherencias focales” cuyo tamaño es de alrededor de 1 μm , para ello la prolongación cuenta con receptores para la fibronectina presente en la MEC, posteriormente se desarrolla un proceso de contracción citoplasmática en dirección del pseudópodo, lo cual efectúa el movimiento celular. La dirección del movimiento es determinada por el fenómeno de quimiotaxia que define la capacidad celular de desplazarse en dirección de un atrayente o de alejarse de un repelente (Geneser, 2000).

Los fibroblastos son células completamente diferenciadas que ordinariamente no se diferencian en otro tipo de células pero la evidencia dice que bajo ciertas condiciones pueden llegar a ser células de hueso o adipocitos por acumulación de lípidos (Fawcett, 1986; Paniagua *et al.*, 1997).

Para establecer un cultivo fibroblástico, a partir de un tejido dérmico, las células deben ser aisladas de la matriz de tejido organizado en que se encuentran *in vivo*, para esto se fragmenta la muestra en pequeñas partes, las cuales son puestas en una placa petri que contenga un medio de cultivo apropiado. Los fibroblastos son células dependientes de anclaje, es decir, requieren de un sustrato para desarrollarse y multiplicarse. Una vez anclados formarán una monocapa celular de alta densidad en el fondo de la placa, evento denominado confluencia, en este momento es posible desarrollar el pasaje celular o repicaje para formar subcultivos (Smith y Wood, 1996).

CAPITULO 4

Descripción citogenética

La citogenética es una disciplina que, entre otros objetivos, se preocupa de describir y caracterizar la organización nuclear y cromosómica de las especies, pudiendo también establecer comparaciones entre cariotipos de especies pertenecientes a un mismo grupo y proponer explicaciones para los cambios nucleares y cromosómicos ocurridos durante la evolución (Spotorno, 1985; Walker, 1993).

La determinación del cariotipo de una especie se realiza en base a la descripción y presentación ordenada de sus cromosomas, considerando el número, la morfología y el tamaño de los mismos (Spotorno, 1985; Walker, 1993). Actualmente, para la mayoría de las especies de mamíferos se ha descrito su cariotipo, permitiendo la realización de estudios comparativos con otras especies y el establecimiento de relaciones de parentesco evolutivo entre ellas (Spotorno, 1985), sin embargo, no hay publicaciones que describan citogenéticamente a la güiña.

4.1 Citogenética.

Es la disciplina que se ocupa de estudiar la organización molecular y estructural del núcleo y de los cromosomas, estableciendo relaciones entre éstas estructuras y las funciones génicas. También se ocupa de caracterizar los cariotipos de animales y plantas, los tipos y frecuencias de cambios cromosómicos en poblaciones celulares y la evolución de éstas en el tiempo (Walker, 1993; Blood y Studdert, 1993).

La citogenética inicia su desarrollo con la formulación de la teoría cromosómica de la herencia, que pone de manifiesto el paralelismo existente entre dos fenómenos hasta ese momento no relacionados: La forma de transmisión de los factores que transmiten los caracteres postulados por Mendel (genes) y el comportamiento de los cromosomas en mitosis, meiosis y fecundación (Walker, 1993).

El material genético de los eucariontes, organizado como cromatina, está contenido en el núcleo durante la interfase y en los cromosomas mitóticos y meióticos durante las respectivas divisiones celulares. En la metafase de la mitosis, los cromosomas, generalmente constantes en número y morfología para todas las células somáticas del individuo y de la especie, alcanzan su máxima condensación, se hacen visibles al microscopio óptico y son posibles de individualizar y de caracterizar. La descripción sistematizada del conjunto de cromosomas del individuo y de la especie se denomina cariotipo (Walker, 1993). Por extensión, también se define como cariotipo a la microfotografía de los cromosomas ordenados numéricamente (Blood y Studdert, 1993). El cariotipo es un carácter diagnóstico de importancia en la identificación de especies, constituyendo las semejanzas y diferencias cariotípicas entre especies cercanas, buenos estimadores de sus grados de parentesco (Spotorno, 1985).

Los descriptores básicos del cariotipo son el número de los cromosomas ($2n$) y brazos cromosómicos (NF) o nombre fundamental, así como también el tamaño y la morfología de estos en metafase mitótica (Spotorno, 1985; Walker, 1993). Se ha encontrado gran variabilidad para el número de cromosomas en las especies hasta ahora caracterizadas. En mamíferos placentados la distribución de los números cromosómicos genera una curva normal, siendo los más frecuentes $2n = 38, 42$ y 48 . El tamaño de los cromosomas varía entre un valor promedio de 5 a $6 \mu\text{m}$, en el cariotipo de la mayoría de las especies. Los cromosomas de un cariotipo, generalmente, presentan variaciones graduales de tamaño, sin embargo, algunos organismos presentan cariotipos bimodales, con cromosomas de gran tamaño o macrocromosomas y cromosomas muy pequeños o microcromosomas (Walker, 1993). La morfología cromosómica queda determinada por la posición del centrómero o constricción primaria, región de menor grosor que el resto del cromosoma, que divide al cromosoma en dos segmentos o brazos, este puede localizarse en cualquier posición a lo largo del cromosoma: Medial, submedial, subterminal o terminal, originando cromosomas llamados metacéntricos, submetacéntricos, subtlocéntricos y telocéntricos, respectivamente (Levan *et al.*, 1964)

(Imagen 4). Las categorías morfológicas de los cromosomas se delimitan según índices que estiman la posición del centrómero. El índice centromérico, “IC”, está dado por la proporción entre la longitud del brazo corto (s) y la suma del brazo largo (l) con el corto, según la siguiente fórmula: $IC = [s / s + l] \times 100$ (Spotorno, 1985).

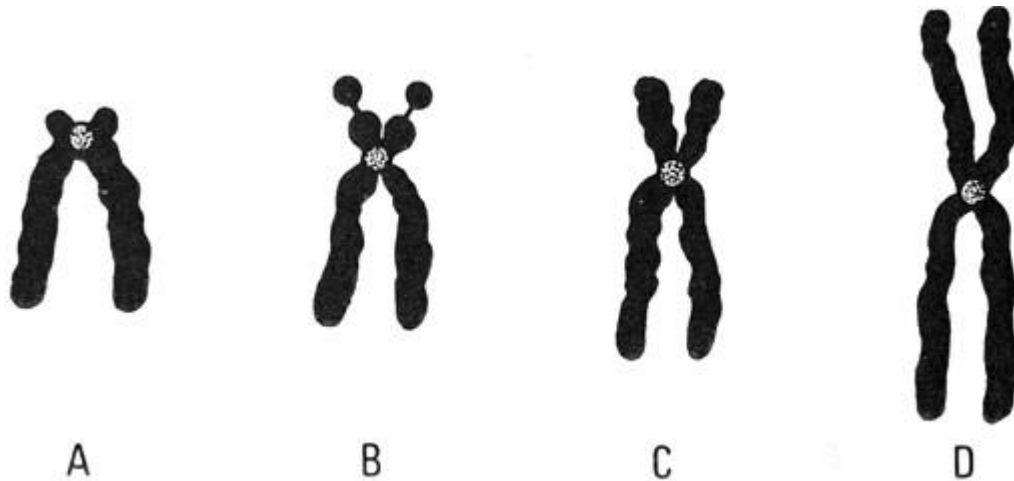


Imagen 4. Morfologías cromosómicas según la posición del centrómero. Cromosomas A) Telocéntrico, B) Subtelocéntrico, C) Submetacéntrico, D) Metacéntrico. Modificado de Teutonico, D. s.f. La genética del pollo, criteri di classificazione dei cromosoma. [en línea].

Tabla nº 3: Nomenclatura cromosómica según ubicación del centrómero e Índice centromérico.

Localización centrómero	Nombre cromosómico	IC
Terminal absoluta	Telocéntrico (T)	1
terminal	telocéntrico (t)	1 – 12,5
subterminal	subtelocéntrico (st)	12,5 – 25
submedial	submetacéntrico (sm)	25 – 37,5
medial	metacéntrico (m)	37,5 – 50
Medial absoluta	Metacéntrico (M)	50

Modificado de Levan *et al.*, 1964

4.2 Descripción citogenética en felinos.

Varios integrantes de la familia Felidae ya han sido estudiados citogenéticamente, lo que ha permitido detectar el alto grado de conservación de su patrón cariotípico (Hsu *et al.*, 1963; Würster-Hill y Gray, 1973; Dutrillaux y Couturier, 1983; Ledesma *et al.*, 2004). Así, dieciséis de los diecinueve pares cromosómicos encontrados en *Felis domesticus* están presentes en todas las otras especies de felinos (Nie *et al.*, 2002). De las especies estudiadas, hasta ahora, la mayoría presenta un número diploide que varía entre $2n=34$ y $2n=38$, presentando cromosomas sexuales de morfología y tamaños similares (Würster-Hill y Benirshke, 1968).

Entre los antecedentes con que actualmente se cuenta para explicar el origen y evolución de los cariotipos de los felinos sudamericanos, grupo al cual pertenece la güiña, están los aportados por Pecon Slattery *et al.*, 1994. Estos investigadores realizaron una reconstrucción filogenética de este grupo en base a los resultados de electroforesis de proteínas, sugiriendo que el origen del mismo habría sido monofilético, con un ancestro en común, el cual a través de un proceso de reducción cromosómica habría pasado de $2n = 38$ a $2n = 36$.

El hecho de no contar con la descripción citogenética de *Oncifelis guigna* ha impedido realizar estudios evolutivos comparativos y filogenéticos con especies cercanas a ella. Además, conocer el cariotipo de la güiña es de fundamental importancia en una segunda etapa del presente trabajo, ya que es una de las características a considerar para la determinación de normalidad celular. Evento de especial relevancia a la hora de elegir la línea de fibroblastos desde la cual se obtendrán los núcleos somáticos a transferir en un futuro programa de clonación por transferencia nuclear.

OBJETIVO GENERAL

Aislar, caracterizar y cultivar células fibroblásticas de la dermis de un ejemplar de güiña (*Oncifelis guigna*), para conservarlas mediante criopreservación en nitrógeno líquido e iniciar un banco genético de la especie.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar si el medio de cultivo DMEM permite un desarrollo adecuado de las células fibroblásticas del ejemplar *Oncifelis guigna*.
- Evaluar y comparar las características de proliferación y sobrevivencia entre las células fibroblásticas del ejemplar güiña y de gato doméstico, en un medio de cultivo definido.
- Describir inmunohistoquímicamente las características de las células fibroblásticas obtenidas en el cultivo celular, al terminar el cuarto pasaje.
- Conocer y describir el cariotipo del gato güiña (*Oncifelis guigna*) muestreado.

MATERIAL Y METODO

Material Biológico

Se utilizó una hembra de güiña (*Oncifelis guigna*) perteneciente al jardín zoológico Buin-Zoo, Santiago de Chile y tres gatas domésticas (*Felis domesticus*) jóvenes, sin signos clínicos de enfermedad.

Toma de Muestras

La cirugía y toma de muestras, de las gatas, se realizó en los pabellones del Servicio de Cirugía de Animales Pequeños de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Chile. Los animales fueron anestesiados mediante un protocolo en base a premedicación con sulfato de atropina (0,1% solución inyectable ampolla de 1ml, Sanderson) en dosis de 0,04 mg/Kg IM, e inducción con Zoletil® IV administrado a efecto (Ampolla contiene 125mg de Zolazepan y 125 mg de Tiletamina, liofilizados para reconstituir en 5ml de solución estéril, Veterquímica). La mantención anestésica se realizó con Isoflurano (frasco de 100 ml, Bestpharma). Los procedimientos con la güiña fueron realizados en los pabellones quirúrgicos del Buin-Zoo, donde la inducción y mantención anestésica se hicieron directamente con Isoflurano (Imagen 5A).

Una vez anestesiados se obtuvo una biopsia dérmica, desde el pabellón auricular externo, mediante el uso de un biopunch de 8 mm de diámetro (Imagen 5B) (Biopunch Fray®). Las heridas quirúrgicas fueron ocluidas mediante sutura a puntos simples separados con Supramid® y desinfectadas localmente durante 7 días, momento en que se extrajeron los puntos. De la güiña se obtuvieron, además, 3ml de sangre periférica desde la vena cefálica, ésta se mantuvo en un hemo tubo estéril con heparina.

Las biopsias se trasladaron al laboratorio de Embriología Comparada del Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, transportándolas en un tubo de fondo cónico, Orange Scientific® 50 ml,

esterilizado con radiación gamma, el cual contenía 45 ml del medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium 4,5 g/l de glucosa (DMEM GIBCO®, 11995-065) enriquecido con antibióticos (penicilina-estreptomicina-glutamina, GIBCO® 10378-016), nistatina (Sigma®, N1638) como fungicida y suero fetal bovino (GIBCO® 16000-0369) (ver preparación al final de este capítulo). Una vez en el laboratorio, las biopsias fueron colocadas en placas de cultivo de 60 mm de diámetro, se rasuraron con una hoja de bisturí y se lavaron con PBS (GIBCO® 14190-136), bajo una lupa estereoscópica (Zeiss® Stemi DV4). Luego, en otras placas de cultivo de 60 mm y bajo una campana de flujo laminar (Heal Force® HF SAFE -1200c) las biopsias se fragmentaron con hoja de bisturí y se les adicionó 1,5 ml del medio DMEM al borde de cada placa de cultivo, utilizando una pipeta estéril de 5 ml montada en una pro pipeta electrónica (Ver imágenes 5D y E), para luego ser colocadas en incubadora (Heal Force® HF151 UV), a 38°C y bajo una atmósfera de 5% de CO₂ (Vignon *et al.*, 1998; Bourc'his *et al.*, 2001). A las 48 horas se agregaron 500 µl de DMEM. Al tercer día (72 horas) se cambió el medio de cultivo por 2 ml sin utilizar y comenzó la observación diaria de las placas, con un microscopio invertido (Leica® DMIL), registrando morfología, estados de confluencia y replicación celular. Al sexto día, de iniciado el cultivo, se agregó 3 ml de DMEM, a las placas (completando 5 ml) cuyas células estuvieran adheridas al fondo de la placa, si no, se esperó 1 o 2 días antes de agregar los 3 ml de medio.

Alrededor de los 10 días de incubación y con un estado de confluencia celular del 80 %, las placas de cultivo se trasladaron a la cámara de flujo laminar y se realizó el repicaje, para esto se extrajo el medio de cultivo y se lavaron dos veces con PBS a 37°C, luego de eliminar el PBS se adicionó 1 ml de tripsina (tripsina 0,25% - EDTA 0,02% GIBCO® 25200-056) para despegar las células adheridas al fondo y romper las uniones intercelulares. Al completar 3 minutos (tiempo que selecciona el despegue de fibroblastos), se detuvo la reacción agregando 3 ml del medio DMEM. La suspensión celular se volvió a sembrar, para esto, se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos, en tubo con fondo cónico estéril de 15 ml, el precipitado resultante fue resuspendido en 3

ml de DMEM y sembrado en dos placas de cultivo de 60 mm de diámetro (1,5 ml en cada placa) y se continuó incubando. Al día siguiente se observaron las placas, bajo microscopio invertido, para determinar la adhesión celular en sus fondos. La mantención de los cultivos continuó con el mismo protocolo señalado hasta los próximo repicajes.

Al término de este estudio (4 pasajes celulares) las células fueron congeladas, para esto se centrifugó el contenido de cada placa, según el protocolo explicado y el precipitado celular se resuspendió en 4 ml del agente crioprotector Dimetil Sulfóxido (DMSO) (Sigma® D2650) al 10 % en suero fetal bovino. Cuatro criotubos fueron cargados con 1 ml de la suspensión, para cada uno. La congelación se realizó lentamente a -20°C por 1 hora, luego pasaron a -80°C por 1 hora. Finalmente, las células fueron colocadas en nitrógeno líquido a -196°C, iniciando así el banco genético del gato güiña.

En el Laboratorio del Servicio de Genética del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, se procedió al cultivo de los linfocitos presentes en la muestra de sangre periférica (3 ml) del gato güiña, a fin de determinar el cariotipo del animal. Se utilizó el protocolo descrito por Moorhead *et al.*, (1960) con modificaciones: La sangre muestreada se dejó sedimentar y se tomó la porción del plasma rica en linfocitos para ponerla en un tubo que contenía 5 ml de medio de cultivo GIBCO 199 adicionado con 0,8 ml de suero fetal bovino y 0,15 ml de fitohemoaglutinina (como estimulante de la mitosis linfocítica). Luego de 72 horas a 37°C y recostado en ángulo de 45° se agregó 0,1 ml de colchicina (GIBCO 15212012), para interrumpir la formación de microtúbulos y detener las mitosis en la etapa de metafase. Se esperó 40 minutos y se centrifugó a 1200 rpm, luego se resuspendió en KCl 0.05M y se mantuvo 20 minutos a baño maría (37°C), para luego centrifugar nuevamente, sacar el sobrenadante y resuspender en 10ml de ácido acético al 4 %. Se volvió a centrifugar y se resuspendió en 10 ml de líquido fijador, compuesto de Metanol y ácido acético a razón de 3:1, se esperó 20 minutos a 4°C, se centrifugó y sacó el sobrenadante, dejando un poco para resuspender el pellet. Se colocó una gota de la suspensión en un porta objeto y se tiñó con el colorante Giemsa.

En el Laboratorio de Citogenética Evolutiva del Programa de Genética Humana de la Facultad de Medicina, la muestra fue observada en un microscopio óptico Nikon Labophot y las metafases, de buena calidad, fueron fotografiadas con una cámara digital Nikon Coolpix 4500 acoplada al microscopio, hasta completar un número de 100. Los cromosomas de las fotografías fueron contados y clasificados según forma y tamaño en la pantalla de un computador, utilizando el software Adobe Photoshop 7.0. Posteriormente se determinó el valor modal del número de cromosomas por célula y se propuso el número diploide de cromosomas (2n) de la gúñia muestreada.

Para el análisis morfométrico, de los cromosomas, se escogieron 12 fotografías de metafases con óptima coloración y morfología. Los cromosomas fueron clasificados y apareados, según forma (en base a la ubicación de la constricción primaria), para esto se les calculó el Índice Centromérico (IC) utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{IC} = \frac{p_i}{p_i + q_i} \times 100$$

Donde :

p_i = Longitud media del brazo corto del i -ésimo cromosoma

q_i = Longitud media del brazo largo del i -ésimo cromosoma

Las mediciones se realizaron utilizando el software Image Tool v 3.0 sobre imágenes digitalizadas y procesadas previamente con el Software Adobe Photoshop 7.0.

Valoración del Estudio

- Morfología y proliferación celular.

En cada pasaje las células fibroblásticas fueron observadas bajo el microscopio invertido de contraste de fases, donde se analizaron características morfológicas y se registraron los tiempos transcurridos hasta lograr confluencias celulares. En el último pasaje se determinó la concentración celular, en cada placa, mediante cámara de

Neubauer y se calculó la concentración media para cada uno de los cuatro grupos de placas (güiña y los tres gatos domésticos). La existencia de diferencia estadística entre las concentraciones medias celulares para los grupos, se determinó a través del análisis de varianzas entre medias muestrales, mediante el estadígrafo F (ver recuadro), utilizado para variables con distribución normal. Las hipótesis formuladas fueron las siguientes:

Hipótesis nula: H_0 : No existe diferencia entre las medias grupales.

Hipótesis alternativa: H_1 : Al menos un par de medias muestrales es distinto.

$F = \frac{C.M(E)}{C.M(D)} \sim F(k-1, n-k)$	<p style="text-align: right;">Donde :</p> $C.M(E) = S.C(E) / G.L(E)$ $C.M(D) = S.C(D) / G.L(D)$ $S.C.(E) = \sum n_i (\bar{X}_i - \bar{X})^2$ $S.C.(D) = \sum (n_i - 1) \cdot S_i^2$ $G.L(E) = k - 1$ $G.L(D) = n - k$
--	---

(E) = Entre grupos; (D) = Dentro de grupo; C.M = Cuadrado medio; S.C = Suma de cuadrados; G.L = Grados de libertad; n_i = Número de elementos del *i-ésimo* grupo; X_i = Media aritmética del *i-ésimo* grupo; \bar{X} = Media aritmética de las medias de cada grupo; S_i^2 = Varianza muestral del *i-ésimo* grupo; k = Número de tratamientos; n = Número de elementos totales.

H_0 fue rechazada si el valor de F calculado resultaba superior al valor F correspondiente en la tabla de distribución F acumulativa con grados de libertad 3 y 28, considerando un $\alpha = 5\%$, ($F_{3,28} = 2,946$).

El valor de F fue calculado con el software Stata 8.0, empleando el comando computacional “oneway concentracióncelular grupo, tab”. En el caso de rechazar H_0 , Se efectuó la comparación múltiple de Bonferroni, mediante el comando computacional “oneway concentracióncelular grupo, tab bon” para determinar entre qué grupos existió diferencia estadística.

- Estudio inmunohistoquímico de doble marcaje.

En el tercer pasaje se colocó un cubre objeto en el fondo de una de las placas de cultivo del gato güiña, para que las células se adhirieran a él y facilitar la técnica a desarrollar. En el cuarto pasaje se extrajo el cubre objeto y se sumergió, durante 6 minutos, en una placa petri, de 60 mm de diámetro, conteniendo metanol a -20°C y posteriormente 1 minuto en acetona, a la misma temperatura, para luego pasarlo por (PBS) tampón fosfato durante 5 minutos y cubrirlo con suero de cabra 1/10 en PBS-BSA al 2% dejándolo en una cámara húmeda por 1 hora. En el doble marcaje se utilizó, como anticuerpo primario, antivimentina (Dako) 1/100, para destacar los filamentos intermedios de los fibroblastos, dejándolo toda una noche en refrigeración. Luego, como anticuerpo secundario se utilizó IgG Souris Rouge Texas (Vector) al 1/200 y para evidenciar los núcleos celulares de color azul se empleó el anticuerpo Hoechst 33258 (Polysciences) 1/500. Para reconocer la presencia de células epiteliales (Keratinocitos) se utilizó, como anticuerpo primario la anticitokeratina 8-18 (Zymed) y como anticuerpo secundario IgG Souris (Vector) 1/10. Se lavó en PBS-BSA al 0.2 % dos veces por 10 minutos y se montó sobre un porta objeto con Moviol® (Propyl Gallate). La observación se realizó en un microscopio confocal del CESAT de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, donde se evaluaron características morfológicas evidenciadas por las técnicas inmunohistoquímicas. Se utilizó como control negativo, una muestra sometida al protocolo, ya descrito, pero sin la incorporación del anticuerpo primario.

PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO UTILIZADO.

- 1) DMEM 4.5 g/l de glucosa (GIBCO®, 11995-065).
- 2) Suero fetal bovino (GIBCO® 16000-036): 10% v/v.
- 3) Penicilina-Streptomicina-Glutamina (GIBCO® 10378-016): 100 UI/ml.
- 4) Nistatina (Sigma®, N1638): 24 ml/L.



Imagen 5: Resumen gráfico del material y método. A) Güiña anestesiada en base a Isoflurano B) Obtención de biopsia dérmica desde oreja rasurada, mediante el uso del Biopunch. C) Material básico para procesar la muestra dérmica, pipetas, placas de cultivo, tubos eppendorf y tubos de fondo cónico, hojas de bisturí, pinzas. D) Fragmentación de la biopsia dérmica en placa de cultivo con ayuda de la hoja de bisturí. E) Adición del medio de cultivo DMEM utilizando pipeta y micropipeta. F) Toma de muestra sanguínea desde vena cefálica para descripción citogenética de la güiña.

RESULTADOS

1) DMEM como medio de cultivo fibroblástico para el gato güiña.

El medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), enriquecido con 10% de suero fetal bovino y suplementado con Nistatina más la asociación antibiótica de Penicilina - Estreptomina, fue de utilidad en el establecimiento del cultivo primario de células fibroblásticas del gato güiña, provenientes de una biopsia dérmica tomada desde el pabellón auricular externo, fragmentada y mantenida a 37°C con 5 % de CO₂ atmosférico. Los componentes del DMEM satisficieron los requerimientos nutricios de los fibroblastos de güiña, permitiendo un adecuado anclaje celular, al fondo de la placa de cultivo y una posterior replicación, manteniéndolos viables durante el tiempo que duró la experiencia. Junto con lo anterior, DMEM permitió una correcta conservación de la biopsia dérmica durante el traslado de la muestra, al utilizarse como medio de transporte desde el lugar de obtención del tejido hasta el laboratorio para su procesamiento.

2) Comparación de proliferación y sobrevida celular entre los cultivo fibroblásticos del gato güiña (*Oncifelis guigna*) y 3 gatas domésticas (*Felis domesticus*).

La experiencia llevada a cabo consideró cultivos celulares, en paralelo, de biopsias dérmicas provenientes desde el pabellón auricular externo de un ejemplar hembra de güiña (*Oncifelis guigna*) y tres gatas domésticas (*Felis domesticus*). Estos fueron monitoreados bajo microscopio invertido de contraste de fases, considerando las características morfológicas de los fibroblastos, proliferación celular, tiempo transcurrido en lograr estados de confluencia celular del 10, 30, 60 y 80 %, comportamiento post repicaje y la concentración celular al término del 4º pasaje. Al considerar como día 0 el inicio del cultivo primario celular, es decir, la fragmentación

del tejido dérmico y distribución de los trozos en la placa de cultivo, más la adición de 1,5 ml de medio DMEM suplementado, podemos afirmar que:

- 1) Tanto para *Oncifelis guigna* como para las tres gatas domésticas (*Felis domesticus*) se pueden observar las primeras replicaciones de células fibroblásticas a partir del 4º día de cultivo (96 horas). Estas células sólo se encuentran en las regiones cercanas a los borde de los tejidos dérmicos y ya se aprecian firmemente adosadas al fondo de las placas, además presentan finas proyecciones citoplasmáticas o filopodios (Imagen 6).
- 2) Ambas especies alcanzan una confluencia celular del 10 % al 5º día de cultivo (120 horas) observándose fibroblastos cada vez más alejados del tejido dérmico del cual provienen, sin embargo, aún es posible identificar desde qué tejido se origina cada célula. Además de los filopodios se observan proyecciones citoplasmáticas de mayor grosor o lamelopodios. (Imagen 7).
- 3) Tanto para las gatas domésticas como para la güiña, se alcanza una confluencia celular del 30 %, en el fondo de la placa de cultivo, al 6º día de cultivo (144 horas).
- 4) Una confluencia celular del 60 % es lograda al 8º día de cultivo (192 horas) en las placas de ambas especies.
- 5) Las placas de cultivo presentan un 80 % de confluencia celular al 10º día de cultivo, disminuyendo notoriamente la tasa de replicación fibroblástica, esto es válido para ambas especies. En este estado de confluencia se realiza el primer repicaje celular, según el protocolo señalado. (Imagen 8).

- 6) Las células fibroblásticas, recién repicadas, no presentan las proyecciones citoplasmáticas mencionadas, se pueden ver totalmente esféricas y no se encuentran adheridas al fondo de la placa.
- 7) Ya sea en *Oncifelis guigna* o en *Felis domesticus*, las células repicadas comienzan a generar filopodios recién transcurrida 1 hora desde realizado el repicaje, sin embargo, aún no se encuentran adosadas al fondo de la placa.
- 8) A las 24 horas de realizado el repicaje, las células ya se encuentran firmemente adheridas a la placa y han reiniciado su actividad mitótica, visualizándose en un estado de confluencia celular del 40 % para ambas especies. Se hace evidente tanto la presencia de lamelopodios como de filopodios.
- 9) Al 6° día, de efectuado el repicaje, las células nuevamente han alcanzado un 80 % de confluencia, en cada placa, lo cual permite realizar el 2° repicaje. Este comportamiento fue similar en todos los pasajes efectuados durante la etapa experimental (4 para cada ejemplar).

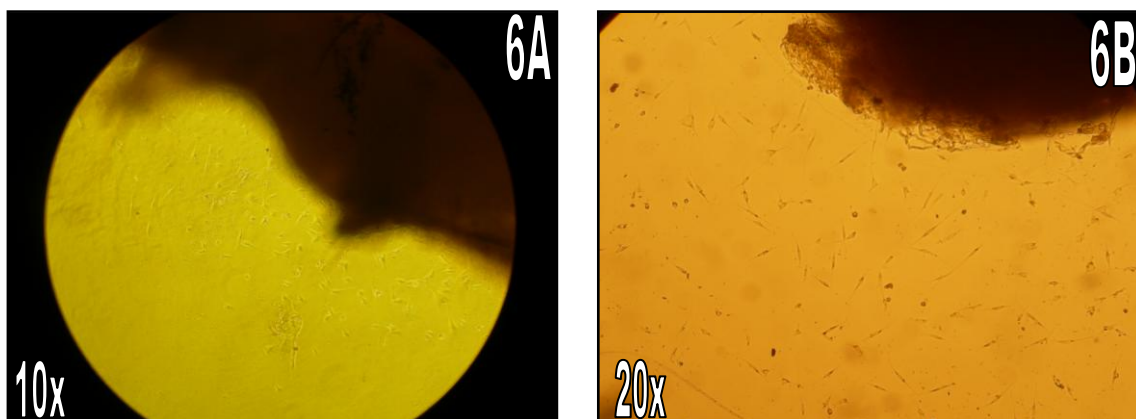


Imagen 6: Imagen microscópica de los primeros estados de cultivo fibroblástico (96 horas). Se observan las primeras replicaciones celulares tanto para *Oncifelis guigna* (6A) como para *Felis domesticus* (6B). Las células se distribuyen cercanas a los borde de los tejidos dérmicos.

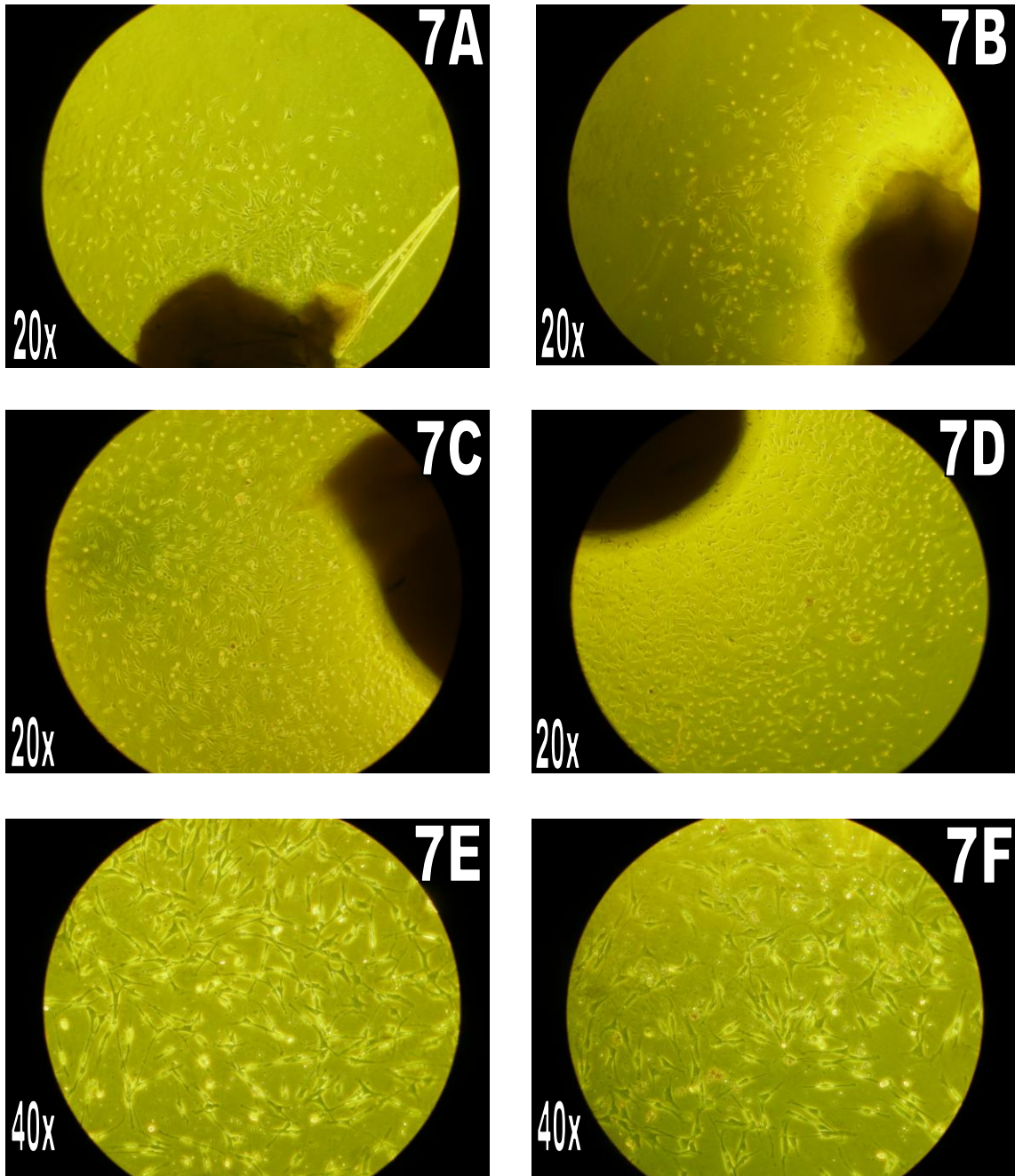


Imagen 7: Imágenes microscópicas de la evolución del cultivo fibroblástico en distintos estados de confluencia celular para gato güiña y gato doméstico. Se aprecia un 10 % de confluencia celular al 5° día de cultivo, tanto para gato güiña (7A) como para gato doméstico (7B) y en ambos las células fibroblásticas originadas se mantienen cercanas a los tejidos de origen. Al 6° día la confluencia celular alcanzada es del 30 % para güiña (7C) y gato doméstico (7D) abarcando cada vez más espacio en el fondo de la placa. El 60 % de confluencia celular se logra al transcurrir 8 días de cultivo (güiña 7E y gato doméstico 7F) con este aumento es posible visualizar claramente las proyecciones citoplasmáticas de los fibroblastos.

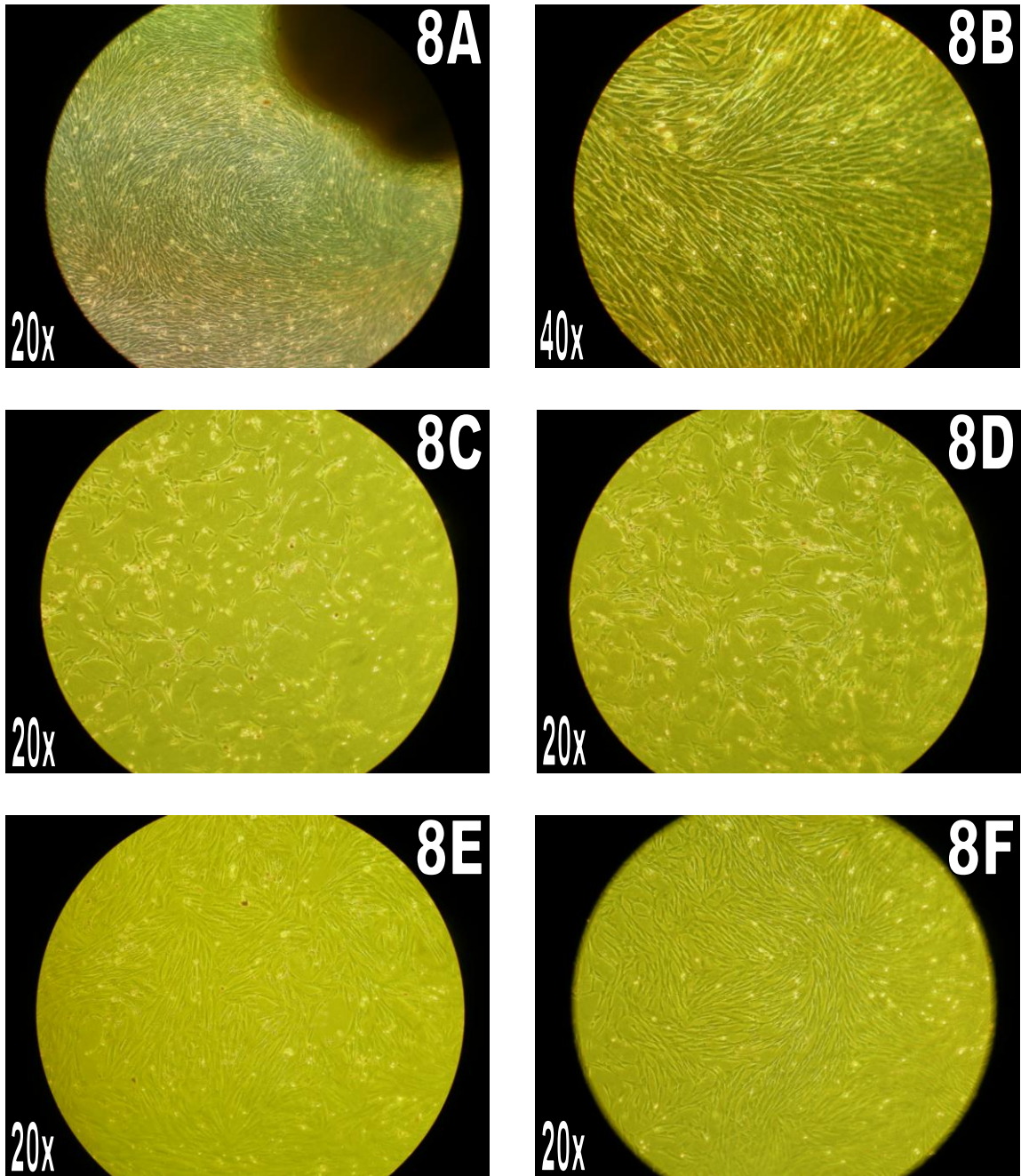


Imagen 8: Imágenes microscópicas de Confluencia celular y repicaje. Al 10° día de cultivo las células han alcanzado un 80% de confluencia, tanto para güiña (8A) como para gato doméstico (8B), estado apto para realizar el primer repicaje celular. En las imágenes 8C y 8D, para güiña y gato doméstico, respectivamente, se pueden ver los fibroblastos 24horas post repicaje, los cuales ya se encuentran en un estado del 40% de confluencia celular. Al 6° día post repicaje las células vuelven a alcanzar un 80% de confluencia, momento indicado para realizar un 2° repicaje (8E güiña y 8F gato doméstico)

10) El análisis de varianza para la concentración celular media entre grupos, al momento del 4° repicaje, generó un valor del F calculado de **0,1**. Este, al resultar menor que el F en tabla ($F_{3,28,.95} = 2,946$) determinó no rechazar la hipótesis nula H_0 . Así, no existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones celulares de los individuos considerados y ésta sólo tiende a ser mayor en el gato 2. El análisis estadístico, realizado en el software Stata 8.0, es resumido a continuación.

. oneway concentracióncel grupo, tab

Summary of concentracióncel			
grupo	Mean	Std. Dev.	Freq.
güiña	1.6250	.10350983	8
gato 1	1.6125	.08345232	8
gato 2	1.6375	.11877348	8
gato 3	1.6125	.11259916	8
Total	1.6218	.10075321	32

Análisis de Varianza

Fuente de variación	SC	GL	CM	F	Prob > F
Between groups	.003437496	3	.001145832	0.10	0.9576
Within groups	.311249985	28	.011116071		
Total	.31468748	31	.010151209		

F calculado $0,1 < F$ en tabla 2,946.

TABLA n° 4 Concentración celular (millones / ml) por placa de cultivo al 4° repicaje, según individuo.

N° de placa	Guiña	Gato 1	Gato 2	Gato 3
1	1,5 x10 ⁶	1,6 x10 ⁶	1,5 x10 ⁶	1,7 x10 ⁶
2	1,6 x10 ⁶	1,5 x10 ⁶	1,8 x10 ⁶	1,5 x10 ⁶
3	1,7 x10 ⁶	1,7 x10 ⁶	1,6 x10 ⁶	1,5 x10 ⁶
4	1,5 x10 ⁶	1,6 x10 ⁶	1,7 x10 ⁶	1,7 x10 ⁶
5	1,8 x10 ⁶	1,7 x10 ⁶	1,6 x10 ⁶	1,5 x10 ⁶
6	1,7 x10 ⁶	1,5 x10 ⁶	1,6 x10 ⁶	1,8 x10 ⁶
7	1,6 x10 ⁶	1,6 x10 ⁶	1,8 x10 ⁶	1,6 x10 ⁶
8	1,6 x10 ⁶	1,7 x10 ⁶	1,5 x10 ⁶	1,6 x10 ⁶
Promedio	1,625 x10⁶	1,6125 x10⁶	1,6375 x10⁶	1,6125 x10⁶

Calculado mediante cámara de Neubauer utilizando un factor corrector de 50.000.

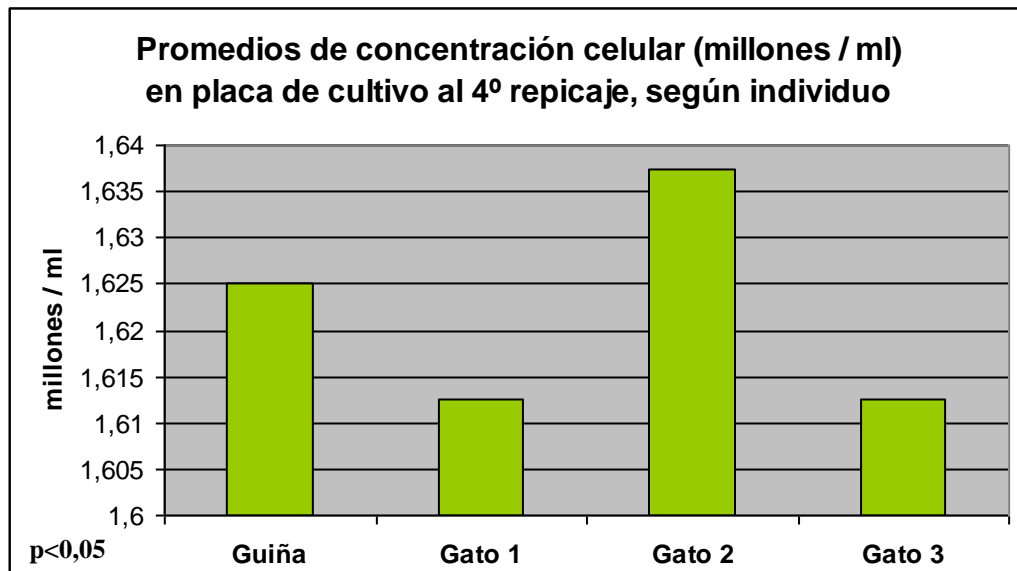


Gráfico n° 1. No existe diferencia estadísticamente significativa, entre individuos, al comparar los promedios de concentración celular en las placas de cultivo al 4° repicaje.

3) Descripción inmunohistoquímica de fibroblastos obtenidos al 4º pasaje.

La observación, bajo microscopio confocal, de las muestras celulares obtenidas en el cuarto pasaje de cultivo y tratadas con técnicas inmunohistoquímicas de doble marcaje para evidenciar filamentos intermedios, además del antiuerpo Hoechst 33258 para visualizar los núcleos celulares, permite describir la morfología celular. En primera instancia se estudiaron las imágenes por separado, según los distintos fluoróforos utilizados y el color del haz lumínico que estos emitieron en una determinada longitud de onda. Posteriormente las imágenes fueron colocalizadas, obteniendo una imagen que entregó mayor información posicional de cada una de las estructuras resaltadas. (Imágenes 9 y 10). Así, es posible describir que:

Los filamentos intermedios, destacados en las células fibroblásticas, se distribuyeron en la totalidad del área celular conformando un patrón reticular que permite la clasificación morfológica de estas. Los fibroblastos presentaron variadas formas y tamaños, destacando formas ahusadas, fusiformes y estrelladas. El núcleo se apreció ovoide o esférico, ubicándose tanto en el centro como en la periferia celular.

Las prolongaciones citoplasmáticas o pseudópodos, que se visualizaron, fueron de distinta magnitud o desarrollo, encontrándose la presencia de finas proyecciones (filopodios), así como también evaginaciones mayores (lamelopodios).

Fue posible determinar diversos estados de diferenciación celular, pues se apreciaron células esféricas y pequeñas, resultantes de divisiones mitóticas recientes que aún no comenzaban la emisión de prolongaciones citoplasmáticas.

A pesar de que se utilizaron marcadores anticitokeratina, para evidenciar la presencia de queratinocitos, estos no fueron visualizados, así como tampoco otros tipos celulares presentes en la dermis.

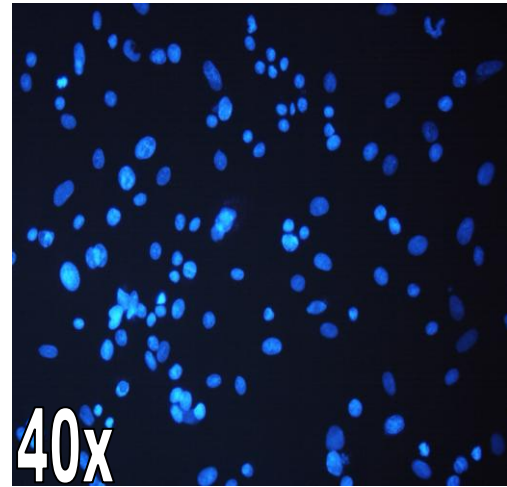
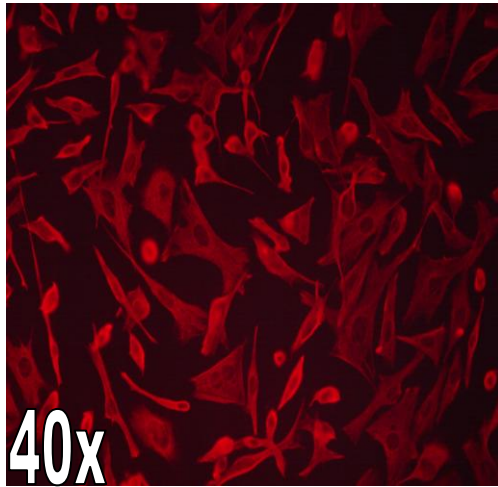


Imagen 9: Células fibroblásticas observadas mediante microscopía confocal. A) Se aprecia el inmunomarcaje de los filamentos intermedios, coloración rojiza B) Núcleos celulares fibroblásticos evidenciados de cloración azul tras la inmunomarcación con Hoechst 33258 (Polysciences).

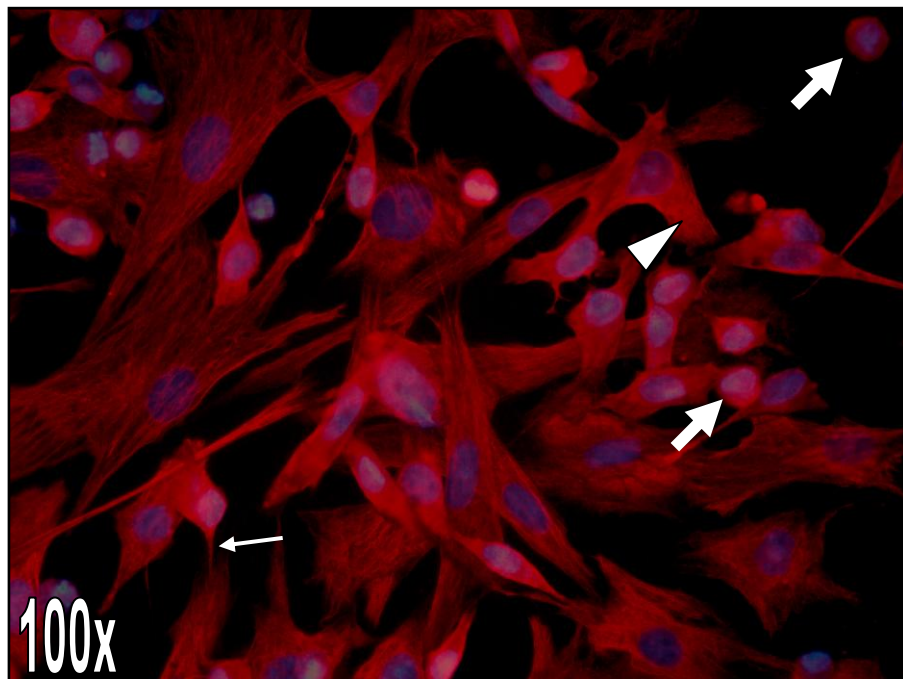


Imagen 10: Colocalización del marcaje filamentoso y nuclear de células fibroblásticas. Se aprecian células con distinta forma y tamaño, emitiendo prolongaciones citoplasmáticas o pseudópodos en forma de filopodio (flecha delgada) o lamelopodio (cabeza de flecha). Las flechas gruesas muestran células en estados tempranos de diferenciación, de tamaño pequeño y esféricas que carecen de proyecciones citoplasmáticas.

4) Descripción citogenética de la güiña (*Oncifelis guigna*) muestreada.

Al contabilizar los cromosomas en 100 linfocitos detenidos en metafase mitótica, el valor modal $2n$ resultante fue de 36 cromosomas con $NF = 72$. En base al Índice centromérico, la morfología cromosómica resultó ser mayoritariamente submetacéntrica (pares cromosómicos 1, 4, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 16) y metacéntrica (pares cromosómicos 2, 6, 8, 9, 14, 15, 17, 18) con sólo un par subteloecéntrico, el par 3. No se encontró la forma telocéntrica y el tamaño cromosómico resultó ser relativamente homogéneo entre ellos (cálculos resumidos en la tabla 5) (Imágenes 11 y 12).

Tabla n° 5: Cuadro resumen de la morfología de los cromosomas de la güiña muestreada, por pares cromosómicos según Índice Centromérico calculado.

Nº de par cromosómico	Longitud brazo corto (p) pixeles	Longitud brazo largo (q) pixeles	Índice Centromérico (IC)	Morfología
1	20,34	59,18	25,58	sm
2	41,2	43,71	48,52	m
3	15,73	56,02	21,92	st
4	19,48	36,33	34,90	sm
5	15,73	38,95	28,77	sm
6	25,47	26,97	48,57	m
7	17,23	35,96	32,39	sm
8	25,09	26,97	48,19	m
9	19,1	31,09	38,06	m
10	12,73	35,58	26,35	sm
11	15,73	29,6	34,70	sm
12	9,74	28,84	25,25	sm
13	13,48	22,48	37,49	sm
14	13,48	17,23	43,89	m
15	13,86	15,73	46,84	m
16	10,11	19,1	34,61	sm
17	11,99	19,1	38,57	m
18	11,24	13,11	46,16	m

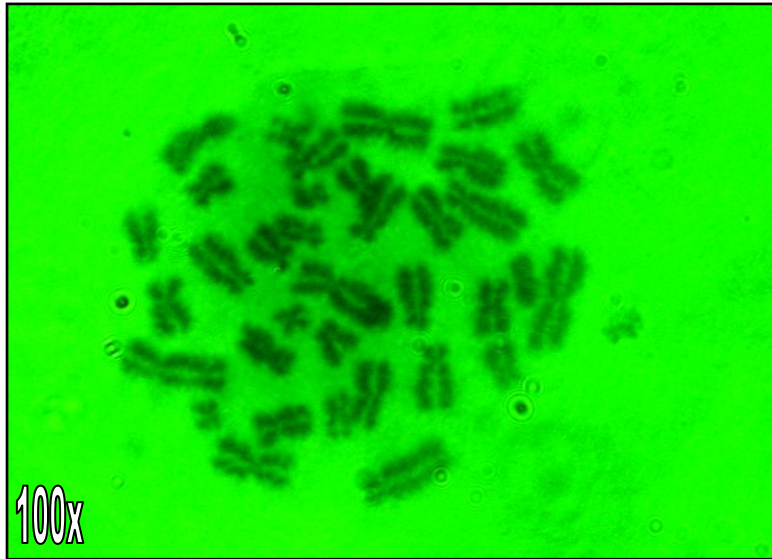


Imagen 11: Microfotografía de una metafase de linfocito, de la güiña muestreada. Los cromosomas se encuentran lo suficientemente condensados para ser visualizados, contados y caracterizados morfológicamente.

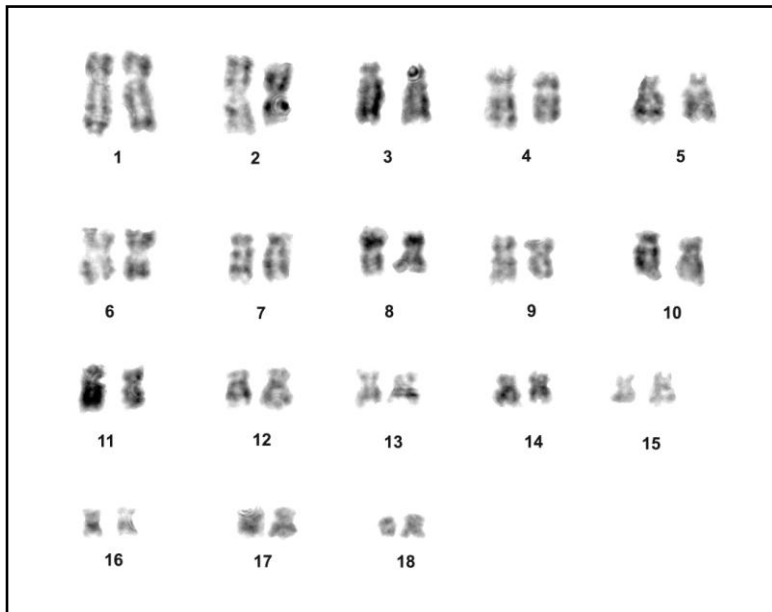


Imagen 12: Cariotipo propuesto para la güiña muestreada. Los cromosomas fueron apareados según morfología y tamaño, posteriormente fueron ordenados en orden decreciente de tamaño. No se identifican los cromosomas sexuales.

DISCUSION

La constante intervención del hábitat, de *Oncifelis guigna*, a través de la tala progresiva de los bosques nativos y el reemplazo, de estos, por especies arbóreas de carácter comercial, sumado al nuevo uso de tierras cultivables que se les ha ido dando con la llegada de asentamientos humanos, generan como resultado la fragmentación del terreno. Esto acrecienta en gran medida, la situación de vulnerabilidad que hoy enfrenta esta especie, aislando las subpoblaciones existentes y generando un panorama no muy auspicioso para ella. Por esto, es indispensable aunar esfuerzos desde los distintos estamentos nacionales y adoptar medidas que protejan estos ambientes, permitiendo el desarrollo local con sistemas de explotación sustentable de los recursos. Simonetti *et al.*, 2002 propone incorporar la participación de terrenos privados y dar especial importancia a la matriz que circunda las áreas resguardadas, la cual es utilizada para explotación comercial, por lo que habitualmente es considerado un sitio hostil que separa un terreno protegido del otro. También propone que la cooperación publico-privado podría asegurar las condiciones mínimas de la matriz para que al menos, ocasionalmente, sea utilizada como corredor biológico, permitiendo el paso de ejemplares desde un sector protegido al otro, condición indispensable para lograr una conservación efectiva de la biodiversidad.

El protocolo anestésico realizado en terreno por Sanderson *et al.*, 2002 y Dunstone *et al.*, 2002b, con buenos resultados en ejemplares de *Oncifelis guigna*, basado en la inducción anestésica con ketamina clorhidrato (20 mg/Kg masa corporal), no fue considerado en este estudio dada la factibilidad de utilizar la máquina para anestésicos de gases, durante la toma de muestra dérmica en el pabellón quirúrgico del Parque Zoológico Buin Zoo. La inducción y mantención anestésica proporcionada por el gas Isoflurano son comparativamente más seguras que los anestésicos inyectables (Flores, 2004) dada su rapidez en volver desde los planos anestésicos una vez interrumpida su administración, la cual incluso puede verse acelerada al administrar ventilación artificial, logrando recuperar rápidamente al paciente ante complicaciones quirúrgicas.

Al igual que en las investigaciones realizadas con felinos domésticos (Shin *et al.*, 2002; Kitiyanant *et al.*, 2003) y el gato africano silvestre, *Felis silvestris libica* (Gómez *et al.*, 2003), en este estudio el medio de cultivo DMEM suplementado, también resultó ser de utilidad tanto en el transporte como en el establecimiento de los cultivos celulares fibroblásticos. El hecho de haber utilizado al *Oncifelis guigna* sienta un precedente para futuros investigadores que tomen como modelo a esta especie.

En cuanto a la biología del cultivo celular observada, tomando en cuenta la proliferación fibroblástica, existió concordancia con las tres fases del cultivo propuestas por Smith y Wood, 1996, comenzando por una primera etapa llamada fase de retardo, caracterizada por un crecimiento cero, inmediatamente después de incorporar el tejido dérmico al medio de cultivo y que en este estudio abarcó los 4 primeros días de iniciada la experiencia, visualizando replicación fibroblástica sólo a partir del 5° día en adelante. Una segunda etapa, denominada fase de crecimiento exponencial, se determina por un período de continuas divisiones celulares, aumentando el número de éstas, lo cual se pudo apreciar entre el 5° y el 9° o 10° día de cultivo. En este momento, se logró una confluencia celular del 80 %, lo que disminuyó la tasa de replicación fibroblástica, efecto también descrito por Reina, 2003a, haciendo entrar al cultivo en la tercera etapa propuesta, denominada fase estacionaria, donde no hay cambios en la densidad celular. En estas condiciones, se realizó el repicaje o subcultivo celular, reactivando la actividad mitótica fibroblástica, experimentando nuevamente las tres fases propuestas, pero con una fase de retardo y proliferación notoriamente inferiores, ya que en menos de un día se reinició la replicación celular y a los 6 días ya se contaba con el 80 % de confluencia celular.

Desde el punto de vista de la evolución del cultivo celular, los fibroblastos obtenidos en los sucesivos pasajes considerados, no evidenciaron las características fenotípicas de envejecimiento celular descritas por Cristofalo *et al.*, 2004. Estas incluían el alargamiento y flacidez celular con un concomitante aumento en el tamaño de los

núcleos y nucléolos, incremento en el número de lisosomas y del Golgi, aparición de vacuolas en el citoplasma y retículo endoplásmico, junto con el incremento de microfilamentos citoplasmáticos y la reducción en las tasas de replicación celular. Si bien es cierto, en este estudio no se consideraron técnicas microscópicas que dieran cuenta del estado de la ultraestructura celular a nivel de organelos, lo visto a través del microscopio invertido con contraste de fases permitió describir células fibroblásticas totalmente acorde con los parámetros normales, según Fawcett, 1986; Paniagua *et al.*, 1997 y Geneser, 2000. Es decir: Forma ahusada o estrellada con un patrón regular de microfilamentos intracelulares, los cuales acompañaban tanto a las proyecciones citoplasmáticas finas como a las gruesas y un núcleo ubicado tanto en el centro celular como en la periferia. A esto se suma la alta tasa de replicación celular que presentaron durante todo el tiempo que duró la experiencia. Sin embargo, dado el reducido número de pasajes celulares que se realizó (4) es posible que las características fenotípicas de envejecimiento celular puedan observarse en un mayor número de repicajes, quedando planteada esta interrogante para investigaciones futuras.

El hecho de que no hayan existido diferencias estadísticamente significativas entre la concentración celular, obtenida al término del 4° pasaje, para *Oncifelis guigna* y gato doméstico, deja en claro que el protocolo de cultivo celular utilizado en este estudio es aplicable al gato güiña. Los resultados obtenidos fueron similares a los descritos para otras especies que también consideraron biopsias dérmicas mantenidas en DMEM en un ambiente de 37°C y 5 % de CO₂ atmosférico (Vignon *et al.*, 1998; Bourc'his *et al.*, 2001; Shin *et al.*, 2002; Gómez *et al.*, 2003; Kitiyanant *et al.*, 2003; Venegas *et al.*, 2006; Rojas *et al.*, 2006).

En cuanto a la descripción citogenética realizada para *Oncifelis guigna*, se puede afirmar que el protocolo propuesto por Moorhead *et al.*, 1960 y modificado actualmente (Ledesma *et al.*, 2004) es compatible con la especie, ya que se obtuvo una adecuada proliferación de linfocitos, lo que permitió el estudio de las células en metafase que

evidenciaban claramente a los cromosomas. Es necesario aclarar que, en este caso, sólo se pueden emitir afirmaciones para el ejemplar muestreado, ya que para enunciar el cariotipo definitivo de la especie se requiere incorporar, al estudio, un mayor número de individuos. De la misma forma, en este estudio no se pudo determinar al par de cromosomas sexuales, pues no se contó con la muestra de un ejemplar macho de güiña que permitiera identificar al par cromosómico heteromórfico (XY) y compararlo con los cromosomas encontrados en la hembra.

Sin embargo, los resultados obtenidos concuerdan con la reducida información citogenética disponible en la literatura para *Oncifelis guigna*. Es así como el cariotipo $2n=36$, que aquí se describe, está dentro de los rangos descritos para las familia Felidae que van entre 34 y 38 cromosomas (Würster-Hill y Benirshke, 1968). De igual manera hay concordancia con lo descrito por Pecon Slattery (1994), quien propone un origen ancestral monofilético para los felinos pequeños de Sudamérica, los que habrían experimentado un proceso de reducción cromosómica, evolucionando desde un $2n=38$ a un $2n=36$. Por lo tanto, a pesar de que los resultados obtenidos son suficientes para continuar con futuras etapas de experimentación, en esta línea celular, queda pendiente enunciar en forma completa el cariotipo de la especie *Oncifelis guigna*. Para esto es necesario montar un esquema de investigación que considere un mayor número de individuos, así como también ejemplares de ambos sexos. Una vez determinado el cariotipo de la güiña se abrirán numerosas líneas de investigación en el área de la citogenética evolutiva, relacionadas con el estudio filogenético de la especie, la evolución de ella misma y el grado de parentesco con especies cercanas, todo lo cual se engloba en la rama de la citogenética llamada cariología comparada (Spotorno, 1985).

CONCLUSIONES

En base a los protocolos descritos para obtención de muestra, cultivo celular y criopreservación, fue posible aislar, caracterizar y cultivar células fibroblásticas de la dermis de güiña (*Oncifelis guigna*), para posteriormente conservarlas en nitrógeno líquido e iniciar el establecimiento de un banco genético de la especie.

El medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Médium (DMEM) adicionado con un 10% de suero fetal bovino y las soluciones antimicrobianas Nistatina y Penicilina-Estreptomicina, permite un desarrollo adecuado de las células fibroblásticas de *Oncifelis guigna*, logrando tasas de replicación y confluencia celular acorde con lo descrito, en la literatura, para otras especies.

Las características de proliferación, concentración y sobrevida celular en un medio de cultivo definido, para *Oncifelis guigna* y *Felis domesticus* no presentan diferencias en cuanto a los tiempos requeridos para lograr los distintos estados de confluencia celular, las concentraciones obtenidas al término del 4° pasaje y la mantención de la capacidad proliferativa, hasta el término de la experiencia.

Las técnicas inmunohistoquímicas de doble marcaje, utilizadas, permitieron caracterizar morfológicamente a los fibroblastos obtenidos en el 4° repicaje. Estos presentan forma ahusada o estrellada con núcleo esférico y un patrón regular de microfilamentos que acompaña a las proyecciones citoplasmáticas.

El cariotipo del gato güiña muestreado presentó un $2n=36$, $NF=72$, con morfología cromosómica mayoritariamente metacéntrica y submetacéntrica, encontrándose sólo un par subtelocéntrico.

BIBLIOGRAFIA

- **ACOSTA, G.** 2001. Efecto de la fragmentación del bosque nativo en la conservación de *Oncifelis guigna* y *Pseudalopex culpaeus* en Chile central. Tesis Magíster en Ciencias Biológicas, mención Ecología. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias. 68 p.
- **ACOSTA, G.; SIMONETTI, J.; BUSTAMANTE, R.; DUNSTONE, N.** 2003. Metapopulation approach to assess survival of *Oncifelis guigna* in fragmented forest of central Chile: A theoretical model. *Mastozoología neotropical. Journal Neotropicals Mammalians* 10(2):217-229.
- **ACOSTA, G.; SIMONETTI, J.** 2004. Habitat use by *Oncifelis guigna* and *Pseudalopex culpaeus* in fragmented forest landscape in central Chile. *Biodiversity and Conservation* 13:1135-1151.
- **ALBERTS, B.; BRAYN, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.** 1996. Aislamiento y crecimiento de células en cultivo, cómo se estudian las células. **In:** *Biología Molecular de la Célula*. 3° Edición. Ediciones Omega S.A. Barcelona, España. pp. 166-169.
- **ALLER, J.; ALBERIO, R.; LOVANNITTI, B.; CABODEVILA, J.** 1995. Criopreservación de embriones mamíferos, características generales de la congelación. *Revista de Medicina Veterinaria* 76:132-136.
- **ANGERBJORN, A.; TANNERFELDT, M.; ERLINGE, S.** 1999. Predator-prey relationship, arctic foxes and lemmings. *Journal of Animal Ecology* 68:34-49.
- **BIOANDINA ARGENTINA.** 2003. Primeros nacimientos por inseminación artificial [en línea]. <<http://www.bioandina.org.ar/ARCA/ARCA4.htm>> [consulta: 07/06/2006].
- **BLOOD, D.; STUDDERT, V.** 1993. *Diccionario de Veterinaria*. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España. 1296 p.

- **BOURC'HIS, D.; LE BOURHIS, D.; PATIN, D.; NIVELEAU, A.; COMIZZOLI, P.; RENARD, J.; VIEGAS-PEQUIGNOT, E.** 2001. Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. *Currently Biology* 11(19):1542-1546.

- **CABODEVIÑA, J.; TARUEL, M.** 2001. Criopreservación de embriones bovinos In: Palma, G. Biotecnología de la reproducción. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA. Argentina. pp. 149-174.

- **CHEN, D.** 1999. The giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) somatic nucleus can dedifferentiate in rabbit ooplasm and support early development of the reconstructed egg. *Life Science* 42: 346-353.

- **COFRE, H.; MARQUET, P.** 1999. Conservation status, rarity, and geographic priorities for conservation of Chilean mammals: an assessment. *Biological Conservation* 88(1):53-68.

- **COMIZZOLI, P.; MAUGET, R.; MERMILLOD, P.** 2000. Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species. *Reproduction Nutrition Development* 40:493-504.

- **CORREA, P. ; ROA, A.** 2005. Relaciones tróficas entre *Oncifelis guigna*, *Lycalopex culpaeus*, *Lycalopex griseu* y *Tyto alba* en un ambiente fragmentado de la zona central de Chile. *Mastozoología Neotropical* 12(1):57-60.

- **CRISTOFALO, V.; LORENZINI, A.; ALLEN, R.; TORRES, C.; TRESINI, M.** 2004. Replicative senescent: a critical review. *Mechanisms of Ageing and Development* 125: 827-884.

- **DONOSO, C.; LARA, A.** 1996. Utilización de los bosques nativos en Chile: pasado, presente y futuro. In: Armesto, J.; Villagrán, C.; Arroyo, M. *Ecología de los bosques nativos de Chile*. Editorial Universitaria. Santiago, Chile. pp. 367-387.

- **DUNSTONE, N.; FREER, R.; ACOSTA, G.; DURBIN, L.; WILLIE, I.; MAZZOLLI, M.; SCOTT, D.** 2002a. Uso del hábitat, actividad y dieta de la güiña (*Oncifelis guigna*) en el parque nacional Laguna San Rafael XI región, Chile. Boletín del Museo de Historia Natural. Santiago, Chile. 51:147-158.

- **DUNSTONE, N; DURBIN, L; WYLLIE, I; FREER, R; ACOSTA, G; MAZZOLLI, M; ROSE, S.** 2002b. Spatial organization, ranging behaviour and habitat use of the kodkod (*Oncifelis guigna*) in southern Chile. Journal Zoology 257:1-11.

- **DUTRILLAUX, B.; COUTURIER, J.** 1983. The ancestral karyotype of carnivora: comparison with that of platyrrhine monkeys. Cytogenetics and Cell Genetics 35:200-208.

- **FAWCETT, D. W.** 1986. Connective tissue proper. **In:** Bloom and Fawcett, Textbook of Histology. 11º Edición. W.B. Saunders Company. Estados Unidos. pp. 136-173.

- **FERNANDEZ, M.** 1999. Beneficios potenciales de la clonación y la transferencia nuclear. Tecnovet 5(3):11-13.

- **FLORES, E.** 2004. Anestesiología Veterinaria. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Departamento de Ciencias Clínicas. 74 p.

- **FREER, R.** 2004. The spatial ecology of the güiña (*Oncifelis guigna*) in southern Chile. Tesis Doctor en Filosofía. Durham, Inglaterra. Universidad de Durham, Departamento de Ciencias Biológicas. 236 p.

- **GENESER, F.** 2000. Tejido conectivo. **In:** Histología sobre bases moleculares. 3º Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. pp. 197-226.

- **GLADE, A.** 1993. Libro rojo de los vertebrados terrestres de Chile. Corporación Nacional Forestal (CONAF). Santiago, Chile. 65 p.

- **GOMEZ, M.; JENKINS, J.; GIRALDO, A.; HARRIS, R.; KING, A.; DRESSER, B.; EARLE, C.** 2003. Nuclear transfer of synchronized African wild cat somatic cells into enucleated domestic cat oocytes. *Biology of Reproduction* 69:1032-1041.

- **HAN, B.; BISCHOF, C.** 2004. Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing. *Cryobiology* 48:8-21.

- **HAYES, O.; RODRIGUEZ, LL.; GONZALEZ, A.; FALCON, V.; AGUILAR, A.; CASTRO, O.** 2005. Effect of cryopreservation on fusion efficiency and *in vitro* development into blastocysts of bovine cell lines used in somatic cell cloning. *Zygote* 13(4):277-282.

- **HINRICHS, K.; CHOI, Y.; VARNER, D.; HARTMAN, D.** 2006. Efficient production of cloned horse pregnancies using roscovitine-treated donor cells. *Animal Reproduction Science* 94:309-310.

- **HOLT, W.; BENNETT, P.; BOLOBOUEV, V.; WATSON, P.** 1996. Genetic resource banks in wildlife conservation. *Journal of Zoology* 238:532-544.

- **HOLT, W.; PICKARD, A.** 1999. Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. *Reviews in Reproduction* 4:43-150.

- **HOLT, W.; PICKARD, A.; PRATHER, R.** 2004. Wildlife conservation and reproductive cloning. *Reproduction* 127:317-324.

- **HSU, T.; REARDEN, H.; LUQUETTE, G.** 1963. Further karyological studies on Felidae. *Cromosoma* 36:1014-1015.

- **IUCN, INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE.** 2004. Red list of threatened species. [en línea]. <<http://www.iucnredlist.org/search/details.php/15311/summ>>. [consulta: 11-08-2006].

- **JANG, G.; KIM, M.; OH, H.; HOSSEIN, M.; FIBRIANTO, Y.; HONG, S.; PARK, J.; KIM, J.; KIM, H.; KANG, S.; KIM, D.; LEE, B.** 2007. Birth of viable female dogs produced by somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology* 67:941-947.

- **JOHNSON, W.; CULVER, M.; IRIARTE, J.; EIZIRIK, E.; SEYMOUR, L.; O'BRIEN, S.** 1998. Tracking the evolution of elusive Andean mountain cat (*Oreailurus jacobita*) from mitochondrial DNA. *The American Genetic Association* 89:227-232.

- **JOHNSON, W.; PECON SLATTERY, J.; EIZIRIK, E.; KIM, J.; MENOTTI, M.; BONACIC, C.; CAMBRE, R.; CRAWSHAW, P.; NUÑES, A.; SEUANEZ, H.; MARTINS, M.; SEYMOUR, K.; SIMON, F.; SWANSSON, W.; O'BRIEN, S.** 1999. Disparate phylogeographic patterns of molecular genetic variation in four closely related South American small cat species. *Molecular Ecology* 8:579-594.

- **JOHNSON, W.; EIZIRIK, E.; PECON SLATTERY, J.; MURPHY, W.; ANTUNES, A.; TEELING, E.; O'BRIEN, S.** 2006. The late Miocene radiation of modern felidae: a genetic assessment. *Science* 311:73-77.

- **KITIYANANT, Y.; SAIKHUN, J.; PAVASUTHIPAISIT, K.** 2003. Somatic cell nuclear transfer in domestic cat oocytes treated with IGF-I for in vitro maturation. *Theriogenology* 59(8):1775-1786.

- **LEDESMA, M.; LEDESMA, C.; SCHIAFFINO, K.; RINAS, M.; GUNSKI, R.** 2004. Análisis citogenético de la *Panthera onca* (Felidae: Panterinae) de la provincia de Misiones, Argentina. *Mastozoología Neotropical. Journal Neotropical Mammalian* 11(1):85-90.

- **LEVAN, A.; FREDGA, D.; SANBERG, A.** 1964. Nomenclatura for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52:201-220.

- **LONG, C.; WALKER, S.; TANG, R.; WESTHUSIN, M.** 2003. New commercial opportunities for advanced reproductive technologies in horse, wildlife, and companion animals. *Theriogenology* 59:139-149.

- **LUCHERINI, M.; SOLER, L.; LUENGOS, E.** 2004. A preliminary revision of knowledge status of felids in Argentina. *Journal Neotropical Mammalian* 11(1):7-17.

- **MASUDA, R.; LOPEZ, J.; PECON SLATTERY, J; YUHKI, N.; O'BRIEN, S.** 1996. Molecular phylogeny of mitochondrial cytochrome *b* and 12s rRNA sequences in the Felidae: Ocelot and domestic cat lineages. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 6:351-365.

- **MOORE, A.; SQUIRES, E.; BRUEMMER, J.; GRAHAM, J.** 2006. Effect of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science* 26(5):215-218.

- **MOORHEAD, P.; NOWELL, P.; MELLMAN, W.; BATTIPS, D.; HUNGERFORD, D.** 1960. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Experimental Cell Research* 20(3):613-616.

- **NIE, W.; WANG, J.; O'BRIEN, P.; FU, B.; YING, T. FERGUSON-SMITH, M.; YANG, F.** 2002. The genome phylogeny of domestic cat, red panda and five mustelid species revealed by comparative chromosome painting and G-banding. *Chromosome Research* 10:209-222.

- **NOWELL, K.; JACKSON, P.** 1996. Species account, the Americas. **In:** Wild cats. International union for conservation of nature and natural resources. Cambridge, United Kingdom. pp. 114-148.

- **ONISHI, A.; IWAMOTO, M.; AKITA, T.; MIKAWA, S.; TAKEDA, K.; AWATA, T.; HANADA, H.; PERRY, A.** 2000. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* 289:1188-1190.

- **PALMA, A.; BREM G.** 2001. Biotecnología de la reproducción. **In:** Palma, G. 2001. Biotecnología de la reproducción. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA. Argentina. pp. 1-19.

- **PANIAGUA, R.; NISTAL, M.; SESMA, M.; ALVAREZ, M.; ANADON, R.; FRAILE, B.; SAEZ, F.; DE MIGUEL, M.** 1997. Tejido conjuntivo y adiposo. **In:** Citología e Histología Vegetal y Animal. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España. pp. 476-479.

- **PECON SLATTERY, J.; JOHNSON, W.; GOLDMAN, D.; O'BRIEN, S.** 1994. Phylogenetic reconstruction of South American felids defined by protein electrophoresis. *Journal of Molecular Evolution* 39:296-305.

- **PEREIRA, J.; FRACASSI, N.; UHART, M.** 2006. Numerical and spatial responses of Geoffroy's cat (*Oncifelis geoffroyi*) to prey decline in Argentina. *Journal of Mammalogy* 87(6):1132–1139.

- **POPE, C.** 2000. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. *Theriogenology* 53:163-174.

- **QUINTANA, V.; YAÑEZ, J.; VALDEBENITO, M.** 2000. Orden Carnivora. **In:** Muñoz, A.; Yañez, J. Mamíferos de Chile. Ediciones CEA. Temuco, Chile. pp. 155-184.

- **REINA, M.** 2003a. Técnicas de estudio de líneas celulares. Capítulo 1: Introducción al cultivo celular [en línea] <<http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/cap1.htm>>. [consulta: 20/04/2007]

- **REINA, M.** 2003b. Técnicas de estudio de líneas celulares. Capítulo 3: El medio de cultivo [en línea] <<http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/cap3.htm>>. [consulta: 12/05/2007].

- **ROJAS, M.; VENEGAS, F.; SERVEY, J.; GUILLOMOT, M.** 2004. Clonación, producción de quimeras y células pluripotenciales. *Internacional Journal of Morphology* 22(4):343-350.

- **ROJAS, M.; CASTRO, R.; ALVAREZ, R.; GUILLOMONT, M.; VENEGAS, F.** 2006. Impacto de la biotecnología reproductiva en la conservación de los animales en riesgo de extinción. *Tecnovet* 12(3):9-15.

- **SANDERSON, J.; SUNQUIST, M.; IRIARTE, W.** 2002. Natural history and landscape-use of guignas (*Oncifelis guigna*) on isla grande de Chiloé, Chile. *Journal of Mammology* 83(2):608-613.

- **SIMONETTI, J.; GREZ, A.; BUSTAMANTE, R.** 2002. El valor de la matriz en la conservación ambiental. *Ambiente y Desarrollo* 18:116-118

- **SHIN, T.; KRAEMER, D.; PRYOR, J.; LIU, L.; RUGILA, J.; HOWE, L.; BUCK, S.; MURPHY, K.; LIONS, L.; WESTHUSIN, M.** 2002. A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* 415: 859.

- **SMITH, C.; WOOD, E.** 1996. Cell culture and biotechnology **In:** Cell Biology. 2° edición. Chapman & Hall. Londres, Inglaterra. pp. 87-110.

- **SPOTORNO, A.** 1985. Conceptos y métodos en cariólogía descriptiva y comparada. **In:** Fernández, R. El núcleo, los cromosomas y la evolución. UNESCO proyecto Chi81/001 UNDP/UNESCO. Santiago, Chile. pp. 135-165.

- **SWANSON, W.; BROWN, J.** 2004. International training programs in reproductive sciences for conservation of Latin American felids. *Animal Reproduction Science* 82-83:21-34.

- **TEUTONICO, D.** s.f. La genética del pollo, criteri di classificazione dei cromosoma. [en línea]. <<http://www.summagallicana.it/Volume2/B.III.02.htm>>. [consulta:12-02-2008].

- **VAZQUEZ, Y.; BORQUE, C.; DIAZ, C.** 1998. Criobiología aplicada a reproducción animal. *Archivos Zootecnia* 47:357.

- **VENEGAS, F.; GUILLOMONT, M.; VIGNON, X.; SERVELY, J.; AUDOUARD, C.; MONTIEL, E.; LE BOURHIS, D.; PERON, S.; SOTO, P.; ROJAS, M.** 2006. Obtainment of pudu (*Pudu pudu*) deer embryos by the somatic nuclear transfer technique. *International Journal of Morphology* 24(2):285-299.

- **VERGARA, P.; SIMONETTI, J.** 2003. Forest fragmentation and rhinocryptid nest predation in central Chile. *International Journal of Ecology, Acta Oecológica* 24:285-288.

- **VIGNON, X.; CHESNE, P.; LE BOURHIS, D.; FLECHON, J.; HEYMAN, Y.; RENARD, J.** 1998. Developmental potential of bovine embryos reconstructed from enucleated matured oocytes fused with cultured somatic cells. *Academic Science* 321:735-745.

- **WALKER, L.** 1993. Citogenética general: Cromosomas y cariotipos. **In:** Spotorno, A.; Hoecker, G. Elementos de biología celular y genética. 2º edición. Departamento de Biología Celular y Genética Facultad de Medicina Universidad de Chile. Santiago, Chile. pp. 313-327.

- **WELLS, D.; MISICA, P.; TERVIT, H.; VIVANCO, W.** 1998. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Endervy Island cattle breed. *Reproduction Fertility and Development* 10:369-378.

- **WELLS, D.** 2000. Cloning for animal conservation. *Cloning* 2:152-155.

- **WILDT, D.; RAIL, W.; CRITSER, J.; MONFORT, S.** 1997. Genome resource banks: Living collections for biodiversity conservation. *Bioscience* 47:689-698.

- **WHITE, K.; BUNCH, T.; MITAIPOV, S.; REED, W.** 1999. Establishment of pregnancy after the transfer of nuclear transfer embryos produced from the fusion of argali (*Ovis ammon*) nuclei into domestic sheep (*Ovis aries*) enucleated oocytes. *Cloning* 1:47-54.

- **WÜRSTER-HILL, D.; BENIRSCHKE, K.** 1968. Comparative cytogenetics studies in the order Carnivora. *Chromosoma* 24:336-382.

- **WÜRSTER-HILL, D.; GRAY, C.** 1973. Giemsa banding patterns in the chromosomes of twelve species of cats (Felidae). *Cytogenetics and Cell Genetics* 12:377-397.

- **YANG, F.** 2005. Nuclear transfer in rabbits with different types of donor cells. Tesis Doctor en Biología Veterinaria. Munich, Alemania. Universidad de Munich, Facultad de Medicina Veterinaria. 138 p.

- **YENSEN, E.; SEYMUR, K.** 2000. *Oreailurus jacobita*. Mammalian Species 644:1-6.