



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Cariotipo de la ardilla gris mexicana *Sciurus aureogaster*
(Rodentia:Sciuridae)

T E S I S

Que para obtener el título de

BIÓLOGA

P R E S E N T A

Claudia Jazmin Trejo Casablanca

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Fernando Alfredo Cervantes Reza

ASESOR

Biól. Cristóbal Galindo Galindo



Ciudad de México 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

If you fail you mustn't grumble, thank your lucky stars,
Just savor every mouthful and treasure every moment.
When the storms are raging round you, stay right where you are.
Don't try so hard,
Don't take it all to heart,
It's only fools, they make these rules,
Don't try so hard...

Don't try so hard – Queen.



AGRADECIMIENTOS

A Blanca, mi madre, por enseñarme el significado de la palabra incondicional y ser el viento —siempre a favor— que empuja las velas del barco en el que navego.

A Sergio, mi padre, por darme las herramientas necesarias para construir mi propio camino y enseñarme que no hay mejor viaje que el que emprendo sola.

Al Dr. Fernando Cervantes, por haberme dado la oportunidad de ser su alumna en la colección, por su apoyo, enseñanza y sobre todo por la enorme paciencia que juntos debimos tener durante este camino que vimos volverse largo, pero no inalcanzable. Le estaré eternamente agradecida.

Al Biól. Cristóbal Galindo, por todo el apoyo y conocimiento que me ha brindado a lo largo de mi formación, por guiarme hacía el mundo de la mastozoología, por confiar en mí y considerarme en sus proyectos, además de brindarme su amistad.

A mi jurado de examen, la M. en E.S. Cristina Alvarado Domínguez, al Dr. Fernando A. Cervantes, al Biól. Cristóbal Galindo Galindo, al Dr. Juan J. Rodríguez Mercado y a la M. en C. Nicté Ramírez Priego, por la revisión de este trabajo y sus amables observaciones.

A la M. en C. Julieta Vargas, por siempre brindarme de su valioso tiempo para enseñarme tantas cosas, a preparar, por ejemplo, y su gran paciencia para resolver mis dudas. De verdad muchas gracias, querida maestra.

A la Dra. Yolanda Hortelano, por todas sus valiosas enseñanzas y paciencia, gracias por dejarme recurrir a usted siempre que lo necesité.

Al Dr. Agustín Carmona, por todas y cada una de las veces que me regaló un poco de su tiempo para ayudarme con las preciadas muestras de sangre.

Al M. en C. Javier Martínez por su gran ayuda para la determinación del cariotipo, por los libros prestados, por las útiles explicaciones, las sugerencias para mi trabajo y su compañía en el laboratorio.

Al Dr. Pedro Mercado Ruaro por facilitarme el acceso al laboratorio de Morfo-Anatomía y Citogenética.

A la Dra. Bertha Molina por su apoyo para la estandarización de las técnicas y para procesar muestras durante los tiempos más difíciles.

A la Dra. Elia Roldán Reyes, a Andrea y América, por recibirme en su laboratorio y proporcionarme las herramientas para llevar a cabo mi técnica y obtener parte de mis resultados.

Al Sr. Porfirio Cruz, por permitirme la entrada a su lugar de trabajo para realizar mis capturas, por todas las facilidades que me otorgó, siempre con una sonrisa y amena plática. Conocerlo fue un placer y pieza clave para el desarrollo de mi trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme las herramientas para formar mi camino profesional.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, al Instituto de Biología y a la Colección Nacional de Mamíferos por ser parte fundamental en mi formación académica.

A mis amigos:

Maximiliano, porque tu amistad ha sido como una brisa refrescante en el día más caluroso, por la compañía, por escucharme, por tener citas de estudio, por los chistes malos, las prácticas de campo juntos, infinitas gracias por todo tu apoyo y sobre todo por tu cariño que atesoro siempre.

Feri, por ser un pilar cuando más lo necesité, por ser mi compañero de desvelos, por escuchar cada detalle de todo lo que tengo para contarte y por nunca dudar de mí.

Paulina, por la bonita conexión que tenemos desde el día uno, por sobrevivir conmigo a toda la vida universitaria y a los corazones rotos, y por seguir aquí después de todos estos años.

Raúl, por todos los buenos momentos, tu amistad ha sido de las mejores sorpresas de la vida, gracias por siempre hacer un espacio para mí (en tu agenda y corazón), cuando a veces no lo tienes ni para ti.

Mi Rebe, por echarme porras, por regalarme tantas sonrisas, por ser mi salvavidas en muchas ocasiones, por despejar mi cielo cuando llegaba a tu casa bajo una tormenta que me parecía no tener fin.

Arendy, por siempre tener el poder de poner en palabras lo que llevo en la mente y el corazón, por ser un abrazito a la distancia con tus letras, por sacarme hasta las lágrimas cuando no sabía que lo necesitaba, por seguir aquí después de tantos años y por ayudarme con esta parte tan importante de mi vida.

A Dagan, por todo el cariño que me has dado, por el tiempo que hemos compartido, por los recuerdos increíbles que hemos acumulado, por las risas, por verme en las peores crisis a lo largo de este camino, y permanecer, por ser mi apoyo en todo momento, siempre estaré agradecida por el pilar que has sido y la confianza que tienes en mí.

A todos ustedes: ¡Gracias!, por no dejarme caer cuando sentía que no podía más, por ver en mí, habilidades y capacidad cuando yo misma no podía darme cuenta. No saben lo valioso que es, que personas tan increíbles como ustedes hayan depositado su confianza en mí. Los quiero mucho.

A Martina y Molly, por hacerme tan feliz desde el momento en que llegaron a mi vida, y llenarme de todo ese amor puro.

Al equipo Zotz: Lamparita, Joshua y Ruso, por todas las aventuras que vivimos y viviremos, por la ayuda en las prácticas de campo, por compartirme de su pasión por esta preciosa rama de la biología.

A las ardillas, por alegrar nuestros paisajes y permitirme elaborar este trabajo con la esperanza de conocerlas mejor y poder coexistir en armonía.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN	2
JUSTIFICACIÓN	8
OBJETIVOS	8
Objetivo General	8
Objetivos particulares	8
MATERIALES Y MÉTODOS	9
Colecta de los ejemplares	9
Manejo de las ardillas	11
Extracción de sangre	12
Extracción de médula ósea	12
Estandarización de la técnica para el cultivo de linfocitos.....	13
Estandarización de la técnica para médula ósea	14
Elaboración del cariotipo	14
RESULTADOS.....	16
Descripción del cariotipo de <i>Sciurus aureogaster</i>	16
Cultivo de linfocitos de sangre	16
Médula Ósea	18
DISCUSIÓN	20
CONCLUSIONES	31
LITERATURA CITADA.....	32
ANEXO I	39
ANEXO II	42
CUADROS.....	45

RESUMEN

En el presente estudio se examinaron metafases de ardilla gris mexicana (*Sciurus aureogaster*), con el fin de iniciar el estudio citogenético de las ardillas del género *Sciurus* en México, además de la elaboración de su cariotipo convencional, el cual puede funcionar como herramienta para inferir sus relaciones filogenéticas con las otras especies del género. Los ejemplares fueron colectados vivos en la Alcaldía Coyoacán de la Ciudad de México. Los cromosomas fueron obtenidos a partir de una técnica estandarizada de cultivo de linfocitos de sangre obtenida por punción cardiaca, así como de una técnica convencional de médula ósea extraída del fémur de los ejemplares con un mitostático y un choque hipotónico y posteriormente fueron elaboradas laminillas con los campos mitóticos para observar las metafases celulares (10, 40 y 100x). Además, se hizo una recopilación de las publicaciones sobre las especies del género *Sciurus* que cuentan con cariotipo descrito.

El número cromosómico diploide ($2n$) y el número fundamental (NF) obtenido fue de 40 y 76 respectivamente. El cariotipo estuvo compuesto por 12 pares de cromosomas submetacéntricos, 7 pares metacéntricos, un cromosoma X submetacéntrico y un cromosoma Y acrocéntrico, todos birrámeos. También se observaron constricciones secundarias, característica que comparten con otras especies del género.

Este reporte es el primer estudio cariotípico de una especie de ardilla arborícola mexicana. Asimismo, confirma la uniformidad del cariotipo en el género *Sciurus* y que éste cuenta con un genoma evolutivamente conservado. La presencia de constricciones secundarias sugiere que *S. aureogaster* puede tener citotipos, de tal forma que se debe continuar con el estudio citogenético del género en México.



INTRODUCCIÓN

El Orden Rodentia, es el grupo de mamíferos más diverso de todo el mundo, con 2,552 especies y 513 géneros (Burgin *et al.*, 2018). México por su parte cuenta con 254 especies de roedores registradas, lo cual representa el 9.96% del total mundial y de las cuales 112 son endémicas (Sánchez-Cordero *et al.*, 2014). Las familias de mamíferos más diversas están dentro de este orden: Muridae (834 especies), Cricetidae (792 especies) y en tercer lugar Sciuridae (ardillas) con 298 especies incluidas en 62 géneros (Burgin *et al.*, 2018). La familia Sciuridae está dividida en cinco subfamilias: Ratufinae (ardillas gigantes), Sciurillinae (ardilla pigmea), Sciurinae (ardillas arborícolas y voladoras), Callosciurinae (ardillas asiáticas) y Xerinae (ardillas africanas y marmotas; Wilson y Reeder, 2005).

Esta familia presenta actualmente problemas taxonómicos cuya resolución es fundamental para el conocimiento y conservación biológica de sus diferentes grupos (Lucas y Galián, 2009). Por ejemplo, algunos autores consideran a Pteromyinae como otra subfamilia y sus relaciones filogenéticas con Sciurinae han sido el centro de un amplio debate (Villalobos y Gutiérrez-Espeleta, 2014). Estos problemas han llevado a realizar distintos estudios, ya sea basados en datos morfológicos o moleculares (Fig. 1), los cuales sólo han resuelto de forma parcial sus relaciones filogenéticas; además, las relaciones dentro de *Sciurus* permanecen en gran parte sin resolver (Villalobos, 2013; Villalobos y Gutiérrez-Espeleta, 2014).



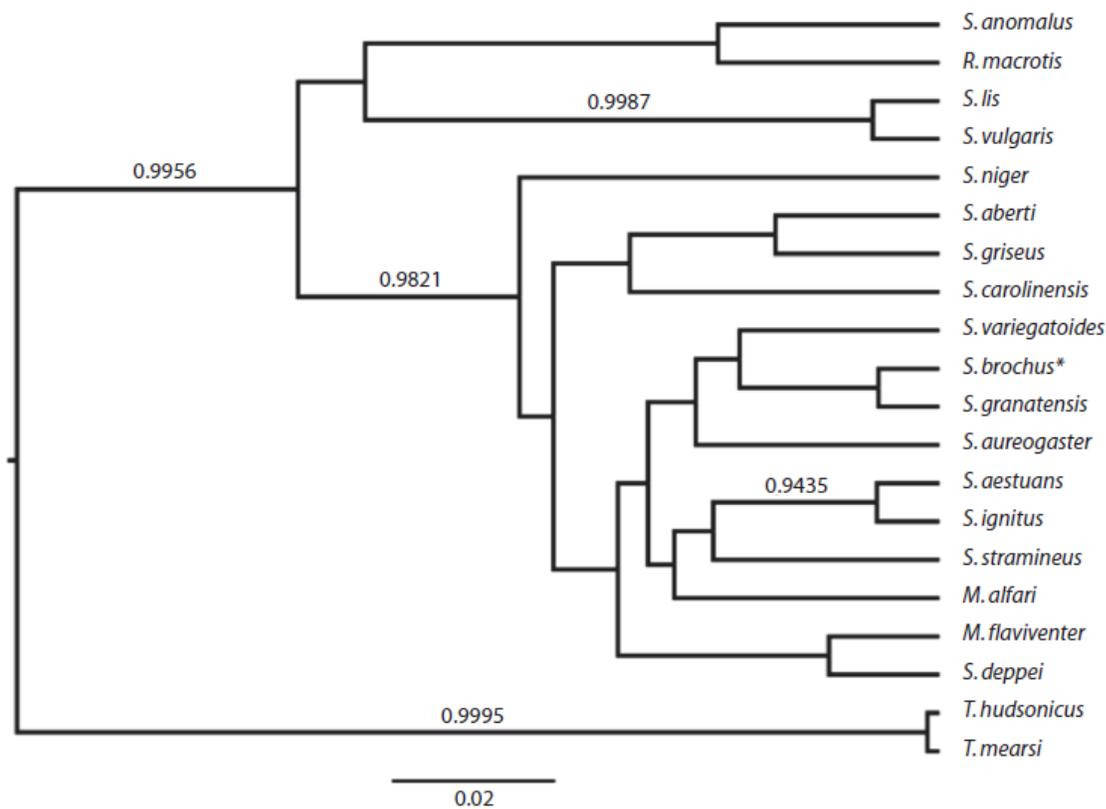


Figura 1. Topología bayesiana basada en el modelo de coalescencia múltiple derivado del análisis multilocus (CYTB, 12S y genes mitocondriales 16S, más el gen nuclear IRBP). Los números sobre las ramas indican la probabilidad posterior (PP). No se proporciona ningún valor del PP para los nodos no admitidos (PP<0.85; Villalobos y Gutiérrez-Espeleta, 2014).

Como alternativa, complemento o ambos, los estudios citogenéticos, han permitido hipotetizar las relaciones filogenéticas y evolutivas en numerosos grupos de mamíferos, particularmente aquellos en los que los métodos clásicos resultan insuficientes, como es el caso de los basados en caracteres morfológicos (Gelder, 1969; Pizzimenti, 1972). La citogenética es el estudio de los cromosomas tanto en número como en morfología (Tamar *et al.*, 2008), así como el número fundamental que se establece de acuerdo con el número de brazos cromosómicos. Este campo ha sido testigo de desarrollos notables, desde la interfaz de la biología molecular con las técnicas citogenéticas clásicas; la citogenética ya no se limita a un papel puramente descriptivo,



sino que tiene un papel fundamental en la identificación de secuencias de genes implicadas en el cáncer, en el mapeo de genes y en la comprensión de la organización del genoma (Morton, 2010). Los cromosomas pueden sufrir alteraciones espontáneas que suelen cambiar el orden de los genes pudiendo crear sistemas genéticos diferentes (Uribe, 1977). Un ejemplo son las fusiones, que ocurre cuando dos cromosomas, normalmente acrocéntricos se unen para formar uno metacéntrico disminuyendo el número haploide o, por el contrario, las fisiones que ocurren por la rotura de un cromosoma metacéntrico formando dos cromosomas acrocéntricos, aumentando el número haploide. Estas alteraciones en el cariotipo son factores determinantes relacionados con el proceso de la formación y evolución de las especies, así como también de las relaciones filogenéticas entre distintos grupos biológicos (Uribe, 1977).

A diferencia de las ardillas arborícolas, en el grupo de las ardillas terrestres (*Marmota*, *Tamias*, *Otospermophilus*, *Notocitellus* y otros más), existe un conjunto de publicaciones que describen el complemento cromosómico de diversas especies de esa línea filogenética (Nadler y Sutton, 1967; Nadler y Hoffman, 1970; Li *et al.*, 2004). Esos resultados han permitido identificar los rearrreglos cromosómicos que sufrió su material genético a lo largo de su evolución y postular sus relaciones filogenéticas.

Desafortunadamente éste no ha sido el caso de las ardillas arborícolas de la tribu Sciurini, a la que pertenece *Sciurus aureogaster* y que comprende 14 géneros reconocidos: *Echinosciurus*, *Guerlinguetus*, *Hadrosociurus*, *Hesperosciurus*, *Leptosociurus*, *Microsciurus*, “*Microsciurus*”, *Neosciurus*, *Parasciurus*, *Rheithrosociurus*, *Simosciurus*, *Sciurus*, *Syntheosciurus* y *Tamiasociurus*; con 29 especies, que se distribuyen en el continente americano y Asia (Abreu-Jr *et al.*, 2020).



En el caso de *Sciurus*, los estudios sobre su genética son pocos, sin embargo, algunos autores han reportado el número cromosómico diploide (2n) de 40 y número fundamental (NF) de 76 (Nadler y Sutton, 1967; Özkurt, *et al.*, 1999; Lima *et al.*, 2002; Stanyon *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004; Atilla *et al.*, 2008), a excepción de *S. granatensis*, con $2n = 42$ y NF de 78 (Nadler y Hoffmann, 1970; Arango *et al.*, 2007).

A pesar de que en México existen 12 especies del género *Sciurus* (Ramírez-Pulido *et al.*, 2014) no existe ningún reporte sobre su complemento cromosómico. Este vacío de información no permite, consecuentemente, generar una hipótesis sobre la evolución cariotípica de las especies de ardillas del género *Sciurus* del Continente Americano y sus relaciones filogenéticas. Es necesario comenzar a examinar a cada una de las especies de ardilla mexicanas y documentar su complemento cromosómico. Este escrito, tiene como propósito principal, por lo tanto, iniciar dicho esquema y comenzar por el estudio cromosómico de la ardilla gris mexicana *S. aureogaster*.

Sciurus aureogaster es una ardilla arborícola de tamaño mediano (Hayssen, 2008). El intervalo de medición (mm) para la longitud total, la longitud de la cola y la longitud de la pata trasera para animales adultos recolectados en todo México son: 418–573, 206–315 y 57–72 mm, respectivamente (Hall, 1981); el peso va de los 432g a 690g (Ceballos y Oliva, 2005). Además, la variación individual y geográfica en el patrón y el color del pelaje en *S. aureogaster* es sorprendente (Musser 1968; Valdéz-Alarcón y Téllez-Girón 2005, 2014).

Las partes superiores son de color gris pálido a gris oscuro, pueden aparecer parches de diferentes tamaños y colores en la nuca, hombros, y costados, el color del vientre varía de blanco, pasando por el naranja a castaño, la cola varía de color gris, cuando las partes inferiores son pálidas,



a rojo-anaranjado o castaño cuando el vientre es naranja oscuro (Hall, 1981; Coates-Estrada y Estrada, 1986) y el melanismo parcial o completo es común (Fig. 2).

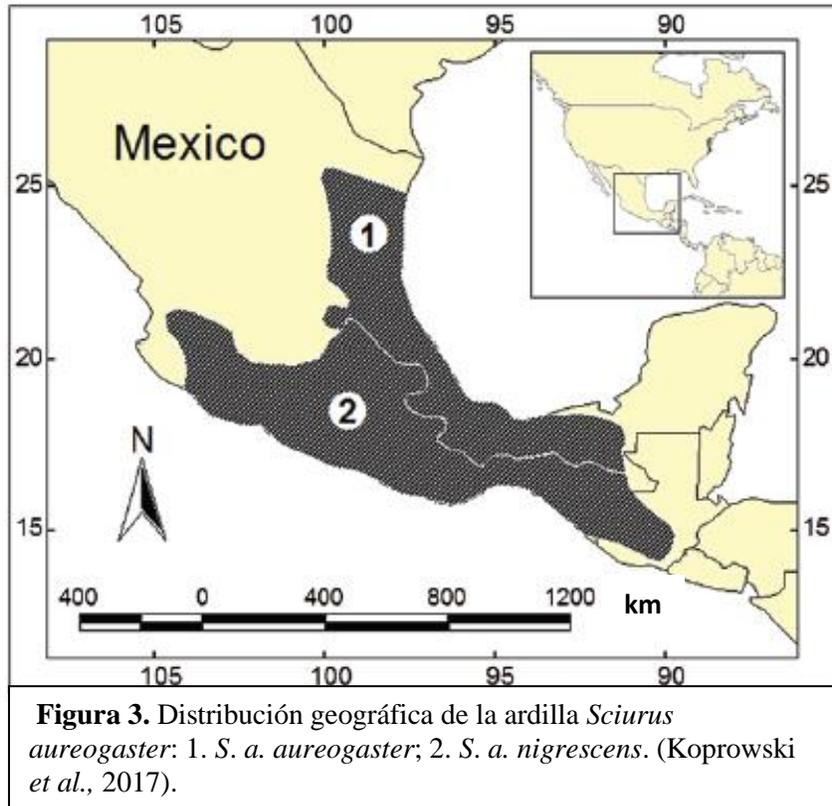


Figura 2. Dos individuos adultos de la ardilla *Sciurus aureogaster* de 30 km al sur de Soto La Marina, Tamaulipas, México. El ejemplar de la izquierda muestra melanismo completo (Koprowski, *et al.*, 2017).

Sciurus aureogaster cuenta con una amplia distribución y es considerada como abundante en muchas áreas de México (Valdez-Alarcón y Téllez-Girón, 2005). Se encuentra en la llanura costera occidental, de Colima a Chiapas y en la llanura oriental de Nuevo León y de Tamaulipas a Tabasco, así como en las montañas desde la parte sur de la meseta mexicana hacia el sur hasta las montañas del centro y suroeste de Guatemala. En el oriente *S. a. aureogaster* se encuentra principalmente en elevaciones por debajo de los 1525 metros sobre el nivel del mar (msnm), con la excepción de una población en Pinal de Amoles en las montañas, tanto como en las del noreste del Estado de Querétaro, a aproximadamente 2440 msnm (Musser, 1968). En la llanura costera del pacífico *S. a. nigrescens* se encuentra en las montañas del centro y sureste de México alcanzando



elevaciones de aproximadamente 3965 msnm, y se extiende hacia el sur en las montañas de Guatemala. (Fig. 3).



Sciurus aureogaster es una especie muy adaptable a las condiciones generadas dentro de los ambientes modificados por el hombre, por lo que ha sido comúnmente reportada en áreas urbanas (Hortelano-Moncada et al., 2009) y es uno de los mamíferos silvestres más conocidos en las ciudades y sus alrededores; se le puede ver en los parques, en los jardines de muchas casas y algunas veces hasta se le mantiene como mascota. Esta familiaridad se debe en gran parte a su actividad diurna y a sus hábitos gregarios, lo que le ha permitido ampliar su distribución original, e incluso ser considerada una plaga (Valdés-Alarcón y Téllez-Girón, 2005).



JUSTIFICACIÓN

No existen estudios cariotípicos en ardillas mexicanas, necesarios para comprender los mecanismos citogenéticos que podrían ayudar a entender y construir sus relaciones de parentesco filogenético. Asimismo, su importancia ecológica justifica todo esfuerzo por difundir el conocimiento disponible acerca de ellas y además se requiere aprender sobre la genética de la especie, pues en la actualidad es considerada invasora en varias regiones del país.

OBJETIVOS

Objetivo General

Iniciar el estudio citogenético del género *Sciurus* en México.

Objetivos particulares

Elaborar el cariotipo convencional de la ardilla gris mexicana *Sciurus aureogaster*.

Analizar las implicaciones taxonómicas del cariotipo.



MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio incluyó dos partes. La primera se refiere a una revisión bibliográfica sobre la información citogenética disponible y las relaciones taxonómicas entre las ardillas del género *Sciurus*. El análisis de los datos permitió conocer la aportación de información cariotípica en el conocimiento taxonómico de las ardillas del género *Sciurus*. La segunda parte incluyó colecta de ejemplares de la ardilla *S. aureogaster*, pasando por su preparación como ejemplares de colección para estudio científico hasta su análisis citogenético en el laboratorio. Este procedimiento en su conjunto permitió conocer el cariotipo de *S. aureogaster*, y sus implicaciones taxonómicas dentro de su género.

Colecta de los ejemplares

Se capturaron vivos ejemplares de la ardilla gris mexicana en el vivero “Ing. Bruno Newman Morfin” ubicado en la calle Paseo del Río 26, Copilco el Bajo, 01070, Alcaldía Coyoacán, Ciudad de México, México (coordenadas geográficas 19°20'24.21" N, 99°11'18.94" W), a una altitud de 2,282 msnm (Fig. 4).

La colecta, manejo y preservación de ejemplares de la ardilla gris mexicana se llevaron a cabo de acuerdo con las recomendaciones convencionales para la utilización de mamíferos silvestres en investigación (Sikes *et al.*, 2016) y bajo el permiso de colecta SEMARNAT FAUT-0002.



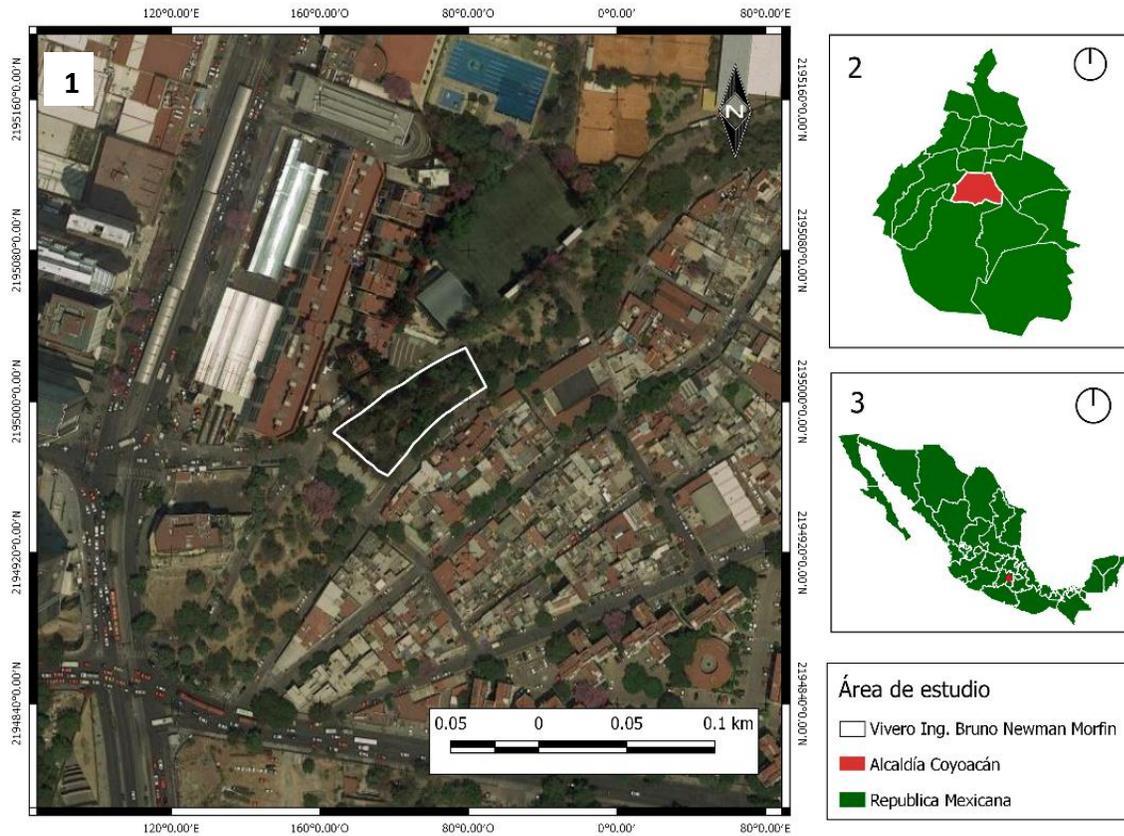


Figura 4. El polígono (línea blanca) indica la ubicación geográfica de la localidad de colecta de ardillas *Sciurus aureogaster* en el vivero “Ing. Bruno Newman Morfin”.

La captura se llevó a cabo colocando trampas Tomahawk con dimensiones de 66 cm de largo, 23 cm de alto y 23 cm de ancho (Fig. 5), en varios puntos del vivero (en suelo o sobre árboles), cercanos a árboles con abundancia de flores; el cebo utilizado fueron cacahuates y trozos de manzana. Las trampas se colocaron durante el día a las 10:00 h y se revisaron alrededor de las 17:00 h, estando activas aproximadamente 7 h.





Figura 5. Ejemplar de la ardilla *Sciurus aureogaster*, capturado en un árbol en el Vivero “Ing. Bruno Newman Morfin”.

La identificación taxonómica de los ejemplares fue corroborada en el laboratorio de acuerdo con características morfológicas, principalmente el color del pelo y medidas corporales (Musser, 1968; Álvarez-Castañeda *et al.*, 2017).

Manejo de las ardillas

Para la contención de las ardillas se usaron sacos (50x50 cm) hechos de tela de mezclilla, unidos con hilos de bordar estándar de nylon (Koprowski, 2002). Se mantuvieron ligeramente anestesiadas con una pequeña dosis de isoflurano inhalada (Fig. 6), por aproximadamente 5 min, lo que permitió la toma de muestra de sangre para el cultivo de linfocitos. Para la obtención de metafases a partir de médula ósea, los ejemplares fueron sacrificados por sobredosis. La manipulación en ambos casos fue llevada a cabo con guantes de carnaza además de que para cada ejemplar se usó una aguja nueva.





Figura 6. Ejemplar número JTC15 de ardilla hembra adulta de *Sciurus aureogaster* anestesiado con isoflurano.

Extracción de sangre

Para la toma de muestra de sangre, el animal únicamente fue anestesiado, igualmente con isoflurano. La muestra se tomó mediante punción cardiaca y fue colectada en tubos con heparina (Fig. 7).

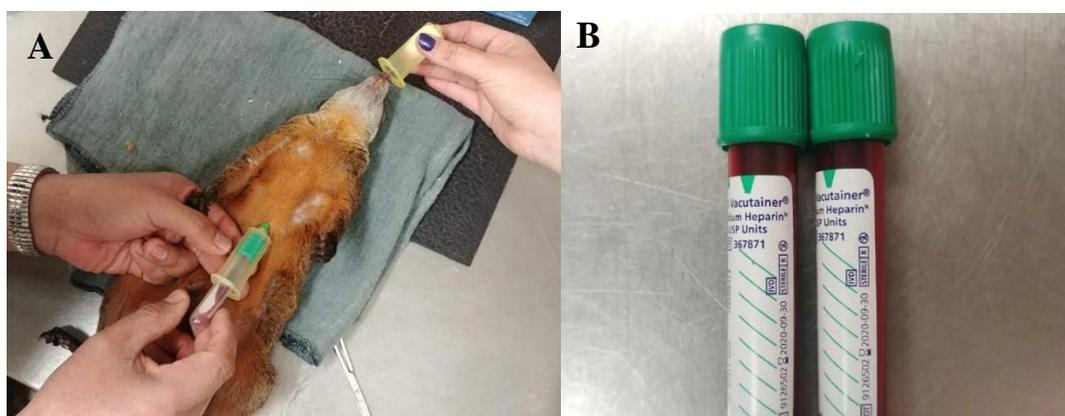


Figura 7. A, toma de muestra de sangre, mediante punción cardiaca de un ejemplar macho adulto de ardilla *Sciurus aureogaster* (número JTC18). B, muestra de sangre colectada dentro de tubos con heparina.

Extracción de médula ósea

Los ejemplares fueron llevados al laboratorio y sacrificados en una cámara hecha con el mismo saco de contención, en la cual fue introducido un algodón empapado con cloroformo o isoflurano para provocar la muerte por sobredosis; inmediatamente después fueron extraídos ambos fémures, dejando pasar el menor tiempo posible después del sacrificio. En algunos casos, cuando fue necesario mantener ejemplares vivos por más tiempo, se les aplicó una inyección de



disolución de levadura: 3g de levadura, 2g de dextrosa en 12 mL de agua destilada; (Baker y Qumsiyeh, 1988), la cual se dejó actuar durante 24 h para asegurar un alto número de células en metafase; esto debido a que uno de los problemas más frecuentes en esta técnica es el bajo índice mitótico que muestra la médula ósea cuando los organismos se encuentran en cautiverio (Anexo I).

Posteriormente los ejemplares fueron preparados de manera convencional para estudio científico como ejemplar de colección. Para cada ejemplar se tomaron las medidas corporales convencionales (mm), peso (g) y se identificó su sexo; la categoría de edad se confirmó después de examinar el pelaje, cráneo y dientes de acuerdo con Álvarez-Castañeda *et al.*, 2017. Cada ejemplar examinado fue ingresado a la Colección Nacional de Mamíferos (CNMA) del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, en la Ciudad de México, en forma de piel, esqueleto y tejido congelado.

Estandarización de la técnica para el cultivo de linfocitos

La siembra se llevó a cabo en condiciones estériles, por cada muestra de sangre, se prepararon 2 tubos cónicos con 3 mL de medio preparado con el fin de tener una repetición de cada cultivo. Cada tubo contenía: 3 mL de medio de cultivo RPMI 1640 adicionado con 100µL de fitohemaglutinina y 100 µL de gentamicina. Por último, se agregaron 10 gotas de sangre sin aguja, desechando las primeras dos. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora a 37 °C durante 72 horas. Posteriormente, 30 min antes de la cosecha a cada tubo se le agregaron 150 µL de solución de colcemida y se volvieron a incubar a 37 °C. Para la cosecha, se centrifugaron durante 10 min a 3500 rpm. Se retiró el sobrenadante, se resuspendió el paquete celular y se adicionaron 3 mL de solución hipotónica previamente calentada a 37 °C; se resuspendió y se incubaron por 60 min a 37 °C. Se realizó una prefijación agregando 1 mL de fijador Carnoy, y se volvió a centrifugar. Se



aspiró el sobrenadante, se resuspendió el paquete celular y se adicionaron 3 mL de fijador fresco y frío. Los tubos se dejaron reposar 10 min a temperatura ambiente únicamente en el primer lavado. Se desechó el sobrenadante, nuevamente se agregó fijador y se volvió a centrifugar, repitiendo estos dos últimos pasos hasta que el sobrenadante quedó transparente y se observó claramente el paquete celular blanco (Anexo II).

Estandarización de la técnica para médula ósea

La técnica se estandarizó con base en la técnica postmortem de Hafner y Sandquist, (1989), con modificaciones de acuerdo con Christidis, 1985 (Anexo I). En breve, la técnica consistió en remover el fémur, cortar las epífisis y con ayuda de una jeringa del calibre adecuado al orificio central del hueso, se perfundió la médula ósea con 5 mL de medio de cultivo RPMI 1640 en un tubo cónico para centrifuga de 15 mL; se homogeneizó, se adicionó el inhibidor mitótico y se llevó a incubar a 37 °C durante 90 min. Después del tiempo de incubación, la solución se centrifugó, se le eliminó el sobrenadante y se agregó la solución hipotónica para posteriormente incubar a la misma temperatura durante 15 min. Luego, se volvió a centrifugar durante el mismo tiempo y número de revoluciones por minuto. Para concluir, la solución hipotónica se reemplazó con un fijador, el cual debió reemplazarse 3 veces más (lavados), antes de preparar los portaobjetos con la muestra.

Elaboración del cariotipo

Una vez secas y teñidas las preparaciones en los portaobjetos, se observaron al microscopio (ZEISS Axioscope) a 10x, 40x y 100x para identificar los campos con metafases. Posteriormente se tomaron fotografías con ayuda del programa “ZEN 2012”.

Con las fotografías obtenidas, se contaron y se tomaron medidas de los cromosomas utilizando DRAWID, programa desarrollado para el análisis de cromosomas y la construcción de



ideogramas (Kirov, 2017). Con las medidas obtenidas, el programa construyó un ideograma basado en la posición del centrómero y tamaño del cromosoma. Este software es fácil de utilizar y de libre acceso por Internet.



RESULTADOS

Descripción del cariotipo de *Sciurus aureogaster*

Para la obtención de los cromosomas, fueron capturados un total de 15 ejemplares, de los cuales 10 fueron empleados para la estandarización de la técnica con médula ósea y 5 para el cultivo de linfocitos de sangre.

De los 10 ejemplares empleados para la técnica con médula ósea, solamente en las preparaciones de 6 animales se pudieron observar metafases.

Para el cultivo de linfocitos, 2 de los 5 ejemplares, generaron preparaciones donde se pudieron observar metafases, pero se tomaron dos muestras de sangre de cada uno, sin perjudicar al animal, siendo liberado después de su recuperación.

Cultivo de linfocitos de sangre

Se obtuvo el número cromosómico diploide de $2n = 40$ y $NF = 76$ (Fig. 8), compuesto por 12 pares de cromosomas submetacéntricos, 7 metacéntricos, un cromosoma X submetacéntrico y un cromosoma Y acrocéntrico, donde todos los autosomas son birrámeos (Fig. 9).



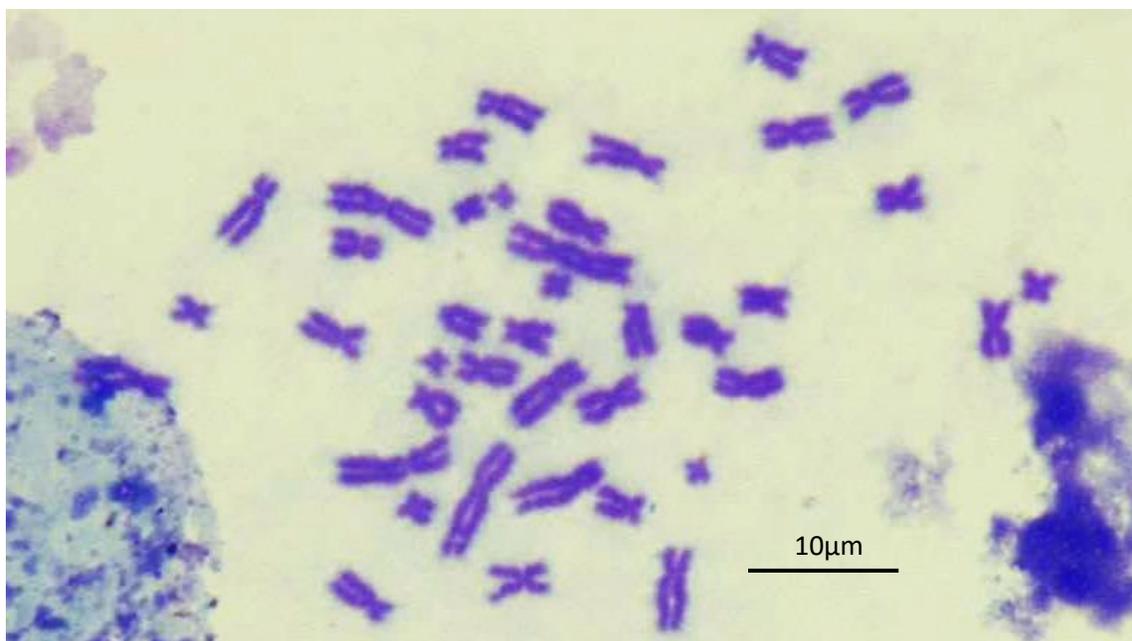


Figura 8. Fotografía (100x) de metafase celular de *Sciurus aureogaster* (macho), obtenida mediante el cultivo de linfocitos.

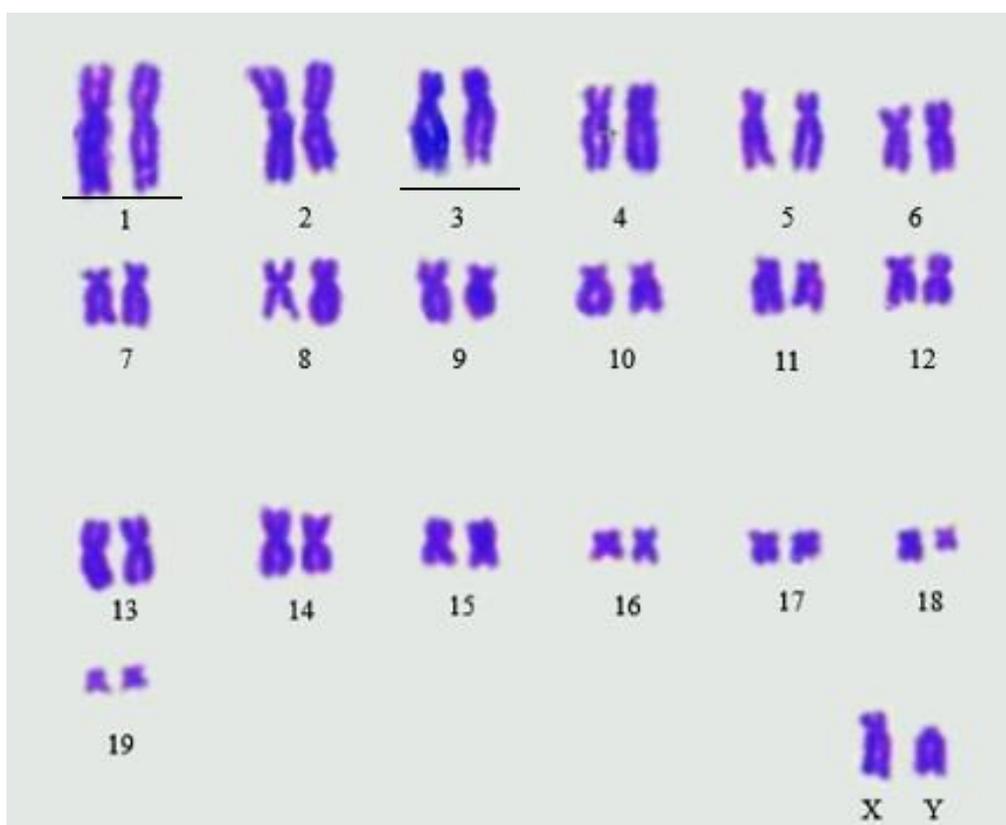


Figura 9. Cariotipo convencional obtenido mediante el cultivo de linfocitos de sangre de *Sciurus aureogaster*. Se observan constricciones secundarias en el primer y tercer par (subrayados).



Médula Ósea

Se obtuvo el número cromosómico diploide de $2n = 40$ y $NF = 76$ para *S. aureogaster* (Fig. 10) compuesto por 12 pares de cromosomas submetacéntricos, 7 pares metacéntricos, un cromosoma X submetacéntrico y un cromosoma Y acrocéntrico, donde todos los autosomas son birrámeos (Fig. 11).

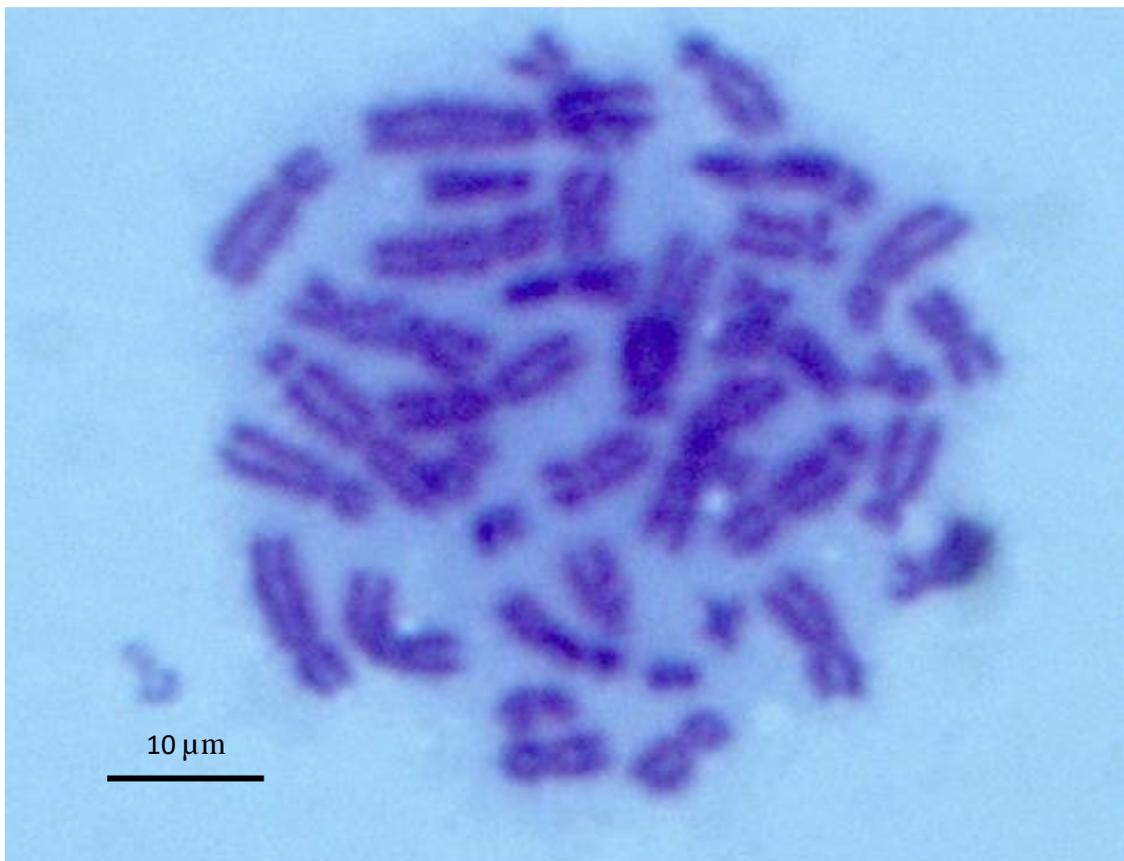


Figura 10. Fotografía (100x) de una metafase celular de una ardilla de *Sciurus aureogaster* macho, obtenida mediante extracción de médula ósea.



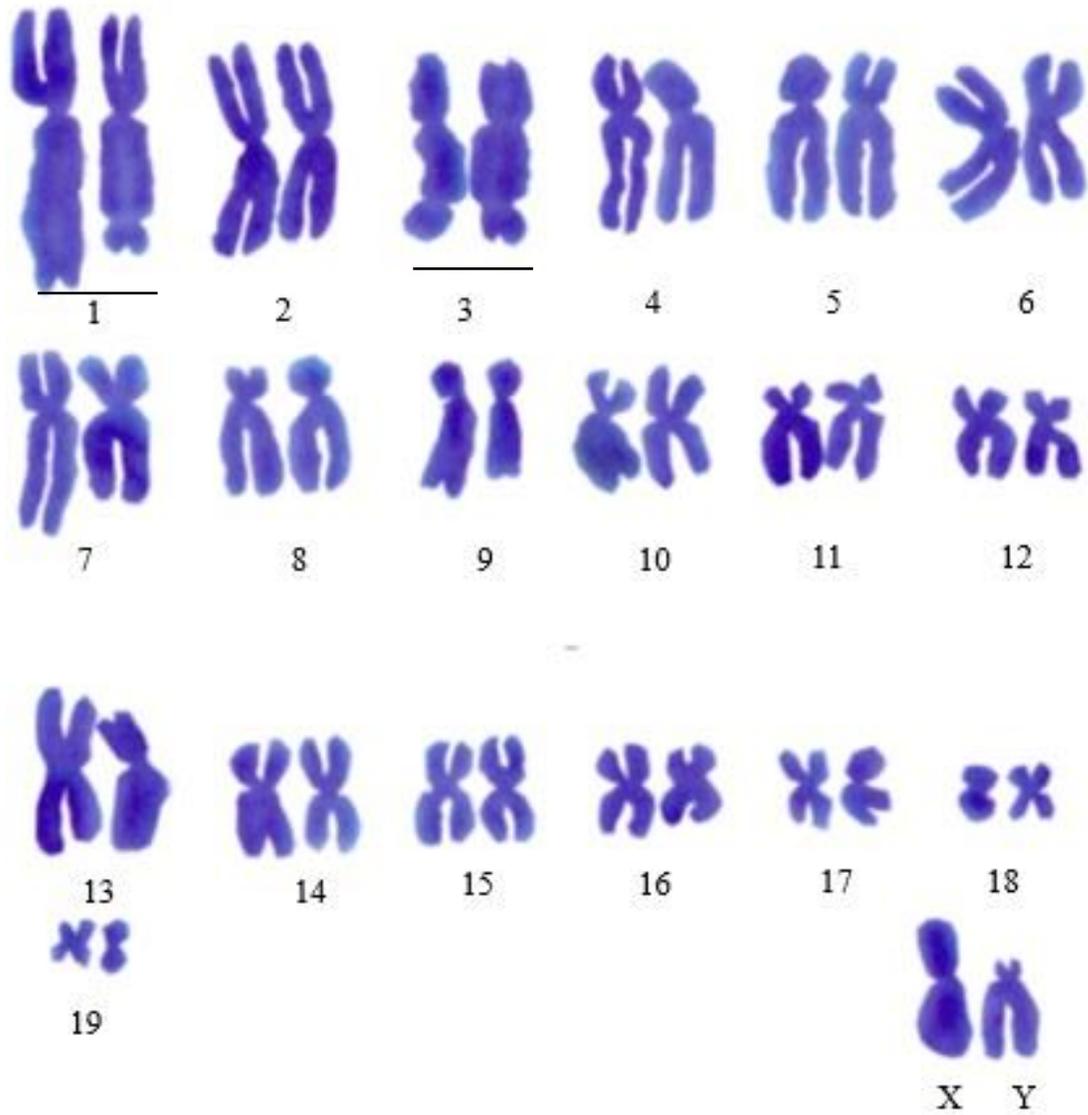


Figura 11. Cariotipo convencional obtenido de médula ósea de *Sciurus aureogaster*.



DISCUSIÓN

Algunos géneros de Sciuridae son cromosómicamente diversos, particularmente las ardillas terrestres, *Spermophilus* ($2n$ de 36 a 46; Nadler, 1967), y las marmotas, *Marmota* ($2n = 36-42$; Rausch y Rausch, 1965). Sin embargo, Nadler y Sutton en 1967 mencionan que los cromosomas de las especies del género *Sciurus* exhiben una homogeneidad intragenérica. Por ejemplo, los cariotipos de *S. carolinensis*, *S. niger* y *S. aberti* son indistinguibles, pero al igual que otros trabajos similares y posteriores, hace énfasis en que es necesario realizar estudios con muestras más grandes o más caracteres cromosómicos, que puedan revelar características que los diferencien. Asimismo, mencionan que si el cariotipo de *S. carolinensis* ($2n = 40$) es el más parecido al de los mamíferos ancestrales y además la familia muestra una gran conservación de su genoma, se podría afirmar que el número cromosómico ancestral del género *Sciurus* y de la familia Sciuridae es $2n = 40$. Al parecer nuestros resultados con *S. aureogaster* se ajustan a este patrón.

Finalmente, Nadler y Hoffman en 1970 postulan que: a) En la subfamilia Sciurinae, el $2n$ básico de 38 – 40 representa una aproximación al $2n$ ancestral de la subfamilia porque se presenta en muchas formas ecológica y morfológicamente divergentes; b) Los taxones con un $2n$ inferior a 38 – 40 probablemente sufrieron fusiones predominantemente céntricas durante la evolución del cariotipo; y c) Los taxones con $2n$ superior a 38 – 40 alcanzaron sus cariotipos mediante un proceso de fisión. El análisis cariotípico del conjunto de especies mexicanas del género *Sciurus* aportará datos para apoyar alguna de estas propuestas.

Otras evidencias que apoyan este enfoque de comparaciones entre las especies asiáticas y americanas de *Sciurus* pueden evaluarse de manera similar. *Sciurus anomalus* de Irán ($2n = 40$; NF = 76; Nadler y Hoffman, 1970) y de Armenia ($2n = 40$; NF = 76; Lapunova y Zholnerovskaya, 1969) son cromosómicamente similares a cuatro especies de



Sciurus norteamericanas, aunque difieren de estas últimas en la morfología de ciertos autosomas y por el cromosoma Y submetacéntrico (Nadler y Hoffman, 1970). *Sciurus vulgaris* de Siberia (Lapunova y Zholnerovskaya, 1969) y Japón (Sasaki *et al.*, 1968) también tiene un $2n = 40$ y un cromosoma Y acrocéntrico como *Sciurus* norteamericanos, pero a diferencia de las otras especies tiene un NF de 74 debido a la presencia de dos pares de autosomas acrocéntricos. Por tanto, las similitudes cromosómicas de estas especies respaldan ancestría cromosómica dentro de *Sciurus*.

Un caso interesante es *S. granatensis* de Sudamérica ($2n = 42$; NF = 78), la cual es cromosómicamente divergente de otros *Sciurus* y se postula que una fisión cromosómica produjo su $2n$ con un par extra de cromosomas (Nadler y Hoffman, 1970).

Desafortunadamente, los estudios cariológicos de ardillas del género *Sciurus* son todavía insuficientes para comparar y se han centrado en pocas especies (Cuadro 1). Esto equivale a 11 especies estudiadas citogenéticamente de un total de 28 que comprenden el género. Asimismo, los resultados de estas investigaciones no son recientes, pues el último reporte data de hace casi 14 años, en el Viejo Mundo y 9 años en el Nuevo Mundo (Cuadro 1). En México aún no se ha realizado ningún estudio cariológico para el género *Sciurus*, a pesar de que existen 12 especies del género (*S. aberti*, *S. alleni*, *S. arizonensis*, *S. aureogaster*, *S. colliaei*, *S. deppei*, *S. griseus*, *S. nayaritensis*, *S. niger*, *S. oculatus*, *S. variegatoides*, y *S. yucatanensis*) distribuidas a lo largo del territorio nacional (Valdés-Alarcón, 2003; Ramírez-Pulido, 2014).

Llama la atención, sin embargo, que todas las especies del género reportadas presentan un cariotipo con un número cromosómico diploide de $2n = 40$, a excepción de *S. granatensis* ($2n = 42$). El número fundamental (NF) del género varía de 72 a 80 (Cuadro 1). Por ejemplo, en esta excepción de las ardillas colombianas, que cuentan con un estudio más completo con técnicas de bandeado, se han observado rearrreglos cromosómicos de especial interés, ya que podrían estar



involucrados en fenómenos de especiación. Los rearrreglos observados fueron: una fisión céntrica que podría relacionarse con el origen del cromosoma acrocéntrico, así como inversión pericéntrica que cambia el tamaño tanto del brazo largo como del corto del cromosoma, pudiendo generar un cromosoma submetacéntrico a partir de uno metacéntrico y viceversa. Estas inversiones juegan un papel importante para la generación de nuevas morfologías cromosómicas en el cariotipo de esta especie (Arango y Bueno, 2012) y seguramente en el de las demás especies del género, siendo las responsables incluso de la variación del NF.



Cuadro 1. Número cromosómico diploide (2n) y número fundamental (NF) de las especies de ardilla del género *Sciurus* en hembra (♀) o macho (♂).

Taxón	Localidad	2n	NF	Individuos	Autor
<i>Sciurus aberti</i>	EUA	40	76	1 ♂	Nadler y Sutton, 1967.
<i>Sciurus aestuans</i>	Brasil	40	74	2 ♀, 1 ♂	Fagundes <i>et al.</i> , 2003
<i>Sciurus alphonsei</i>	Brasil	40	76	1 ♀	Lima <i>et al.</i> , 2002.
<i>Sciurus anomalus</i>	Armenia	40	76		Lapunova y Zolnerovskaja, 1969.
	Irán	40	76	1 ♂	Nadler y Hoffman, 1970.
	Turquía	40	80	1 ♀, 2 ♂	Özkurt, <i>et al.</i> , 1999.
40		76	3 ♀, 7 ♂	Atila, <i>et al.</i> , 2008.	
<i>Sciurus carolinensis</i>	China	40	–	–	Li <i>et al.</i> , 2004
<i>Sciurus carolinensis carolinensi</i>	EUA	40	76	1 ♂	Nadler y Sutton, 1967.
<i>Sciurus carolinensis pennsylvanicus</i>				3 ♀, 2 ♂	
<i>Sciurus griseus griseus</i>				1 ♂	
<i>Sciurus lis</i>	Japón	40	72		Tsuchiya, 1979.
		40	72		Oshida <i>et al.</i> , 1996.
<i>Sciurus. niger rufiventer</i>	EUA	40	76	2 ♀, 1 ♂	Nadler y Sutton, 1967.
<i>Sciurus spadiceus</i>	Brasil	40	76	1 ♂	Lima <i>et al.</i> , 2002.
<i>Sciurus vulgaris</i>		40	72		Renzoni, 1967.
	Japón	40	72		Sasaki <i>et al.</i> , 1968.
	Armenia	40	72		Lapunova y Zolnerovskaja, 1969.
	Japón	40	72		Hsu y Benirschke, 1970.
	Europa	40	72		Petit <i>et al.</i> , 1984.
	Corea	40	72		Kim y Lee, 1990.
	Japón	40	72		Oshida <i>et al.</i> , 1993.
<i>Sciurus granatensis</i>	Venezuela	42	78	1 ♀, 1 ♂	Nadler y Hoffman, 1970.
	Colombia	42	76	5 ♀, 2 ♂	Arango <i>et al.</i> , 2007.
78				Arango <i>et al.</i> , 2012.	



El caso es que, el número de especies examinadas y las técnicas utilizadas hasta ahora no son suficientes para contrastar su complemento cromosómico en la filogenia del género *Sciurus*. Asimismo, las especies estudiadas pertenecen a clados diferentes (Villalobos, 2014), por lo que el avance en el entendimiento de la evolución cariotípica del género se ha dificultado. Sin embargo, los ensayos de citogenética molecular han podido demostrar que los esciúridos en general, a diferencia de los roedores múridos, tienen una organización genómica altamente conservada (Stanyon *et al.*, 2003), lo que ocasiona que los cariotipos de diversos géneros de las ardillas se encuentren también altamente conservados (Li *et al.*, 2004). El resultado evolutivo ha sido que todas las especies de ardilla del género *Sciurus* cariotípicamente estudiadas comparten el mismo $2n = 40$, excepto *S. granatensis* (Arango *et al.*, 2012).

Este reporte es el primer estudio del cariotipo de una ardilla arborícola mexicana, que es muy similar al de algunas especies del género que ya cuentan con cariotipo descrito: *S. aberti*, *S. carolinensis*, *S. griseus* y *S. niger*, en cuanto al número de pares metacéntricos y submetacéntricos (7 y 12, respetivamente). Pero, únicamente comparte la morfología del par sexual con *S. aestuans*, *S. carolinensis*, *S. granatensis*, *S. lis* y *S. spadiceus* (Cuadro 2).



Cuadro 2. Morfología del cariotipo de las especies del género *Sciurus*, reportados hasta el momento.

ESPECIE	M	Sm	A	St	X	Tamaño	Y	Tamaño
<i>Sciurus aureogaster</i>	14	24			Sm	Mediano	A	Mediano
<i>Sciurus aberti</i>	14	24			M	Grande	A	Mediano
<i>Sciurus aestuans</i>	36		2		Sm	Mediano	A	Mediano
<i>Sciurus anomalus</i>	12	26			M	Mediano	Sm	Pequeño
<i>Sciurus alphonsei</i>	12	26			Sm	Mediano	-	-
<i>Sciurus carolinensis carolinensis</i>	14	24			Sm	Mediano	A	Mediano
<i>Sciurus c. pennsylvanicus</i>	14	24			Sm	Mediano	A	Mediano
<i>Sciurus granatensis</i>								
Cariomorfo A	40				Sm	Grande	A	Mediano
Cariomorfo B								
Cariomorfo C								
<i>Sciurus griseus</i>	14	24			Sm	Mediano	Sm	Mediano
<i>Sciurus lis</i>	12	14	4	8	Sm	Mediano	A	Mediano
<i>Sciurus niger rufiventer</i>	14	24			Sm	Mediano	A	Pequeño
<i>Sciurus spadiceus</i>	12	26			Sm	Mediano	A	Mediano
<i>Sciurus vulgaris</i>	6	7	4	2	Sm	Mediano	A	Pequeño

M, metacéntrico; Sm, submetacéntrico; A, acrocéntrico; St, subtelocéntrico.

En cuanto al número fundamental, éste coincide con el de *S. aberti*, *S. anomalus*, *S. alphonsei*, *S. carolinensis*, *S. griseus*, *S. niger* y *S. spadiceus* (Cuadro 1) por lo tanto, el cariotipo de *S. aureogaster* tiene más similitud con el de las especies del Nuevo Mundo que con las del Viejo Mundo. Sin embargo, sería importante realizar un análisis, con una muestra más grande, tanto de esta especie como de las demás del género, para descartar que existan cariomorfos o citotipos como en el caso de *S. granatensis* que influyan en la variación del NF. Por supuesto, sin dejar de lado el error de cada técnica e investigador que pueda afectar en la determinación de la morfología del cariotipo. Además, con este nuevo reporte, se incrementa la probabilidad de que las otras especies del clado filogenético de *S. aureogaster* (*S. alfari*, *S. venustulus*, *S. brochus*, *S. richmodi*, *S. colliaei*, *S. deppei*, *S. yucatanensis* y *S. variegatoides*, Abreu-Jr et al., 2020) también cuenten con un $2n = 40$, a excepción de *S. granatensis*, que ya cuenta con cariotipo descrito.

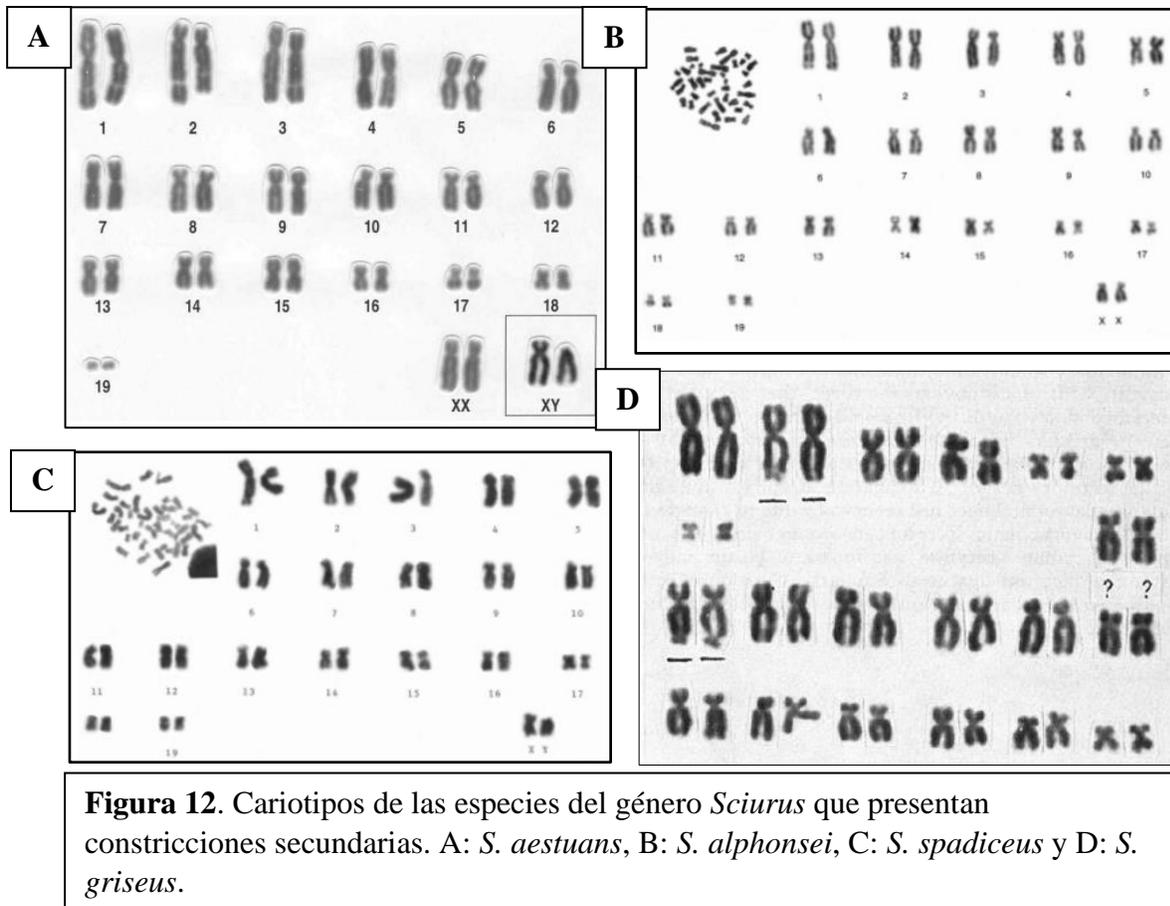


Por otro lado, la comparación de cariotipos de otros taxones, como las ardillas terrestres *Marmota* y *Spermophilus* suele proporcionar una valoración clara del número y tipos de reordenamientos cromosómicos asociados con su evolución, pero la dirección de la evolución es difícil de evaluar debido a la incapacidad de distinguir fusiones céntricas de fisiones. Esta dificultad se ve agravada por la falta de conocimiento sobre el probable $2n$ básico o “ancestral” de Sciuridae (Nadler y Hoffman, 1970). Sin embargo, con base en la recopilación anterior (Cuadro 1), el hecho de que en ardillas arborícolas no ha sido reportado un $2n$ menor a 40 y sólo una especie tiene un par extra, sería de esperarse que también el número cromosómico ancestral de *Sciurus* sea de 40.

Si bien los cariotipos reportados son de especies de continentes diferentes, y el taxón con cariotipo descrito más cercano geográficamente a *S. aureogaster* (*S. granatensis*) está en Sudamérica, nuestros resultados de la primera especie reportada para México ratifican la estabilidad del número diploide del género.

Otro elemento relevante al comparar la estructura del cariotipo de *S. aureogaster* con el de las demás especies de *Sciurus*, son las constricciones secundarias de los cromosomas. Empezando por *S. griseus* (del oeste de los Estados Unidos), una de las más cercanas filogenéticamente y de las primeras especies del género, con cariotipo descrito (1970), que además de contar con un $2n = 40$ y $NF = 76$, también presenta constricciones secundarias (Fig. 12D). Otras especies que no se encuentran dentro del estudio filogenético molecular realizado por Villalobos en 2014, pero que sí cuentan con cariotipo descrito y además presentan constricciones secundarias son: *S. aestuans ingrami* por Fagundes *et al.* en 2003 (donde se sostiene que las constricciones secundarias raramente están presentes en el género y que deben estar relacionadas con la Región Organizadora Nucleolar: NOR), *S. alphonsei* y *S. spadiceus* (Lima y Languth, 2002; Fig. 12).





Las constricciones secundarias son poco frecuentes en los cromosomas de Sciuridae. Además de *S. griseus*, se observan en cultivos de pulmón de las ardillas arborícolas *Tamiasciurus hudsonicus*, *T. douglasii*, *S. alphonsei* y *S. niger*, pero no en cultivos de médula ósea de esta última (Nadler y Sutton, 1967). Así mismo, en un estudio de la variación cromosómica de *S. granatensis*, las regiones NOR fueron frecuentemente visualizadas como constricciones secundarias o discontinuidades en la coloración, en otras técnicas de bandeado y con coloración homogénea con Giemsa, pero tampoco se tuvieron las metafases necesarias para realizar un análisis más completo (Arango *et al.*, 2007).

Hsu (1966) informó que el número de cromosomas con constricciones secundarias de *Tamiasciurus* variaba de célula a célula y los presuntos pares homólogos rara vez mostraban



constricciones en ambos elementos. Por el contrario, los datos de Nadler y Sutton en 1967 indican que las constricciones están presentes en todas las células examinadas y en ambos miembros de un par de cromosomas; se necesitan más estudios de este fenómeno en otras especies de *Sciurus* ya que pueden proporcionar un medio valioso para una identificación más exacta de los cromosomas individuales y un método para rastrear las vías de evolución del cariotipo.

En el caso de las *S. aureogaster* examinadas aquí, las constricciones secundarias fueron observadas tanto en las preparaciones de cultivo de linfocitos (Fig. 13) como en las de médula ósea (Fig.14). Con este análisis, además de confirmar la estabilidad del número diploide del género, se puede sugerir que existe una fórmula cromosómica que comparten varias especies dentro del género. Asimismo, conocer el complemento cromosómico de más especies del género se sumaría a las implicaciones taxonómicas y sería de utilidad para seguir definiendo su filogenia que aún tiene varios huecos, pero que afortunadamente estos problemas de clasificación ya están a la vista de los investigadores (Abreu-Jr *et al.*, 2020) y se está retomando su estudio, tal como es el propósito de este trabajo.



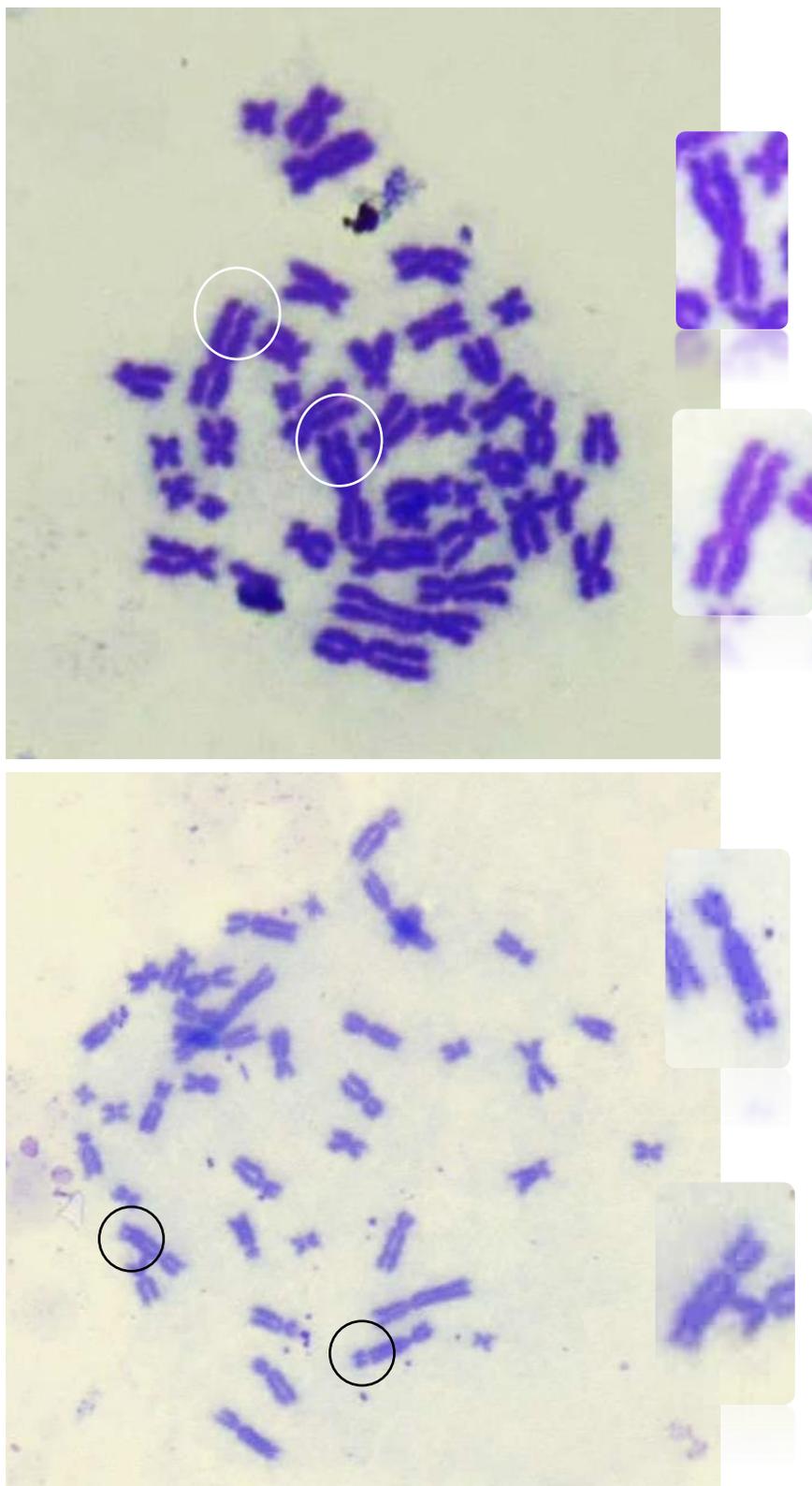


Figura 13. Metafases de *Sciurus aureogaster* obtenidas a partir del cultivo de linfocitos de sangre donde se observan constricciones secundarias.



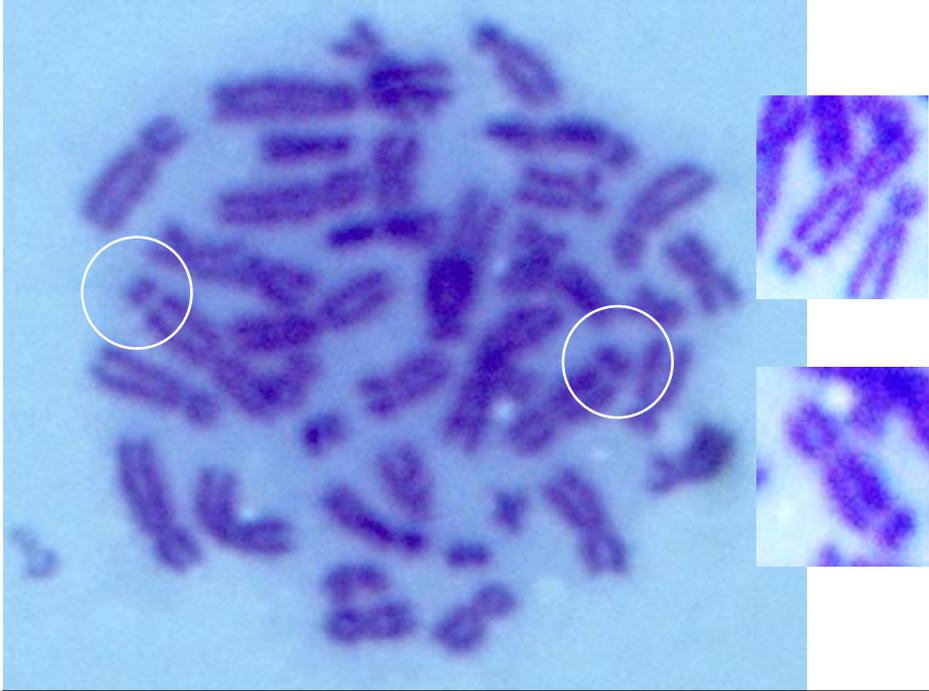


Figura 14. Metafases de *Sciurus aureogaster* obtenidas a partir del cultivo de linfocitos de sangre donde se observan constricciones secundarias.



CONCLUSIONES

El análisis del cariotipo indica que el número cromosómico diploide de *Sciurus aureogaster* es de $2n = 40$ y número fundamental de 76. Por lo tanto, las implicaciones taxonómicas indican que esta especie forma parte de las especies de un género que cuenta con un genoma evolutivamente conservado. Incluso la morfología de los cromosomas de *S. aureogaster* es más parecida a la de los humanos que a la de otros roedores con cariotipos diversos.

La presencia de constricciones secundarias en el cariotipo indica que *S. aureogaster* puede contar con citotipos, pero sería necesario realizar el análisis de poblaciones de otras áreas de su distribución geográfica, además de complementar el estudio con técnicas de bandeado para reafirmar la morfología del cariotipo.

Este reporte es el primer estudio cariotípico de una especie de ardilla arborícola mexicana, con lo cual cumple con el objetivo de ser el inicio del estudio citogenético de las especies del género *Sciurus* que se distribuyen en México. Por lo que es necesario continuar con el estudio citogenético del género y seguir resolviendo las incógnitas de su filogenia.



LITERATURA CITADA

- Abreu-Jr, E. F., Pavan, S. E., Tsuchiya, M. T., Wilson, D. E., Percequillo, A. R., Maldonado, J. E. (2020). Museomics of tree squirrels: a dense taxon sampling of mitogenomes reveals hidden diversity, phenotypic convergence, and the need of a taxonomic overhaul. *BMC Evolutionary Biology*, 20(1), 1–25.
- Álvarez-Castañeda, S. T., Álvarez, T., y González-Ruiz, N. (2017). *Keys for identifying Mexican mammals*. JHU Press.
- Álvarez-Castañeda, S. T., y González-Ruiz, N. (2018). Spanish and English vernacular names of mammals of North America. *Therya*, 9(1), 73–84.
- Arango C., Bueno M. L. y Chacón M.N. (2007). Variación cariológica en diferentes fenotipos de *Sciurus granatensis* (Rodentia, Sciuridae). *Acta Biológica Colombiana*. 12(3)–12.
- Arango, C., y Bueno, M. L. (2012). Patrones de replicación y bandeo no diferencial en ardillas colombianas del género *Sciurus* (Rodentia, Sciuridae). *Acta Biológica Colombiana*, 17(2), 323–334.
- Atila, A., Albayrak, I., y Oshida, T. (2008). Banded karyotypes of the Persian squirrel *Sciurus anomalus* from Turkey. *Caryologia*, 61(2), 139–143.
- Baker, R. J. (1988). Methods in chiropteran mitotic chromosomal studies. *Ecological and behavioral methods for the study of bats*. The Museum and the Department of Biological Science, Texas Tech University. *Smithsonian Institution Press*.



- Burgin, C. J., Colella, J. P., Kahn, P. L., y Upham, N. S. (2018). How many species of mammals are there? *Journal of Mammalogy*, 99(1), 1–14.
- Ceballos, G., y Oliva, G. (2005). *Los mamíferos silvestres de México* (Vol. 986). México: Fondo de Cultura Económica.
- Christidis, L. (1985). A rapid procedure for obtaining chromosome preparations from birds. *The Auk*, 102(4), 892–893.
- Coates-Estrada, R., y Estrada, A. (1986). Manual de identificación de campo de los mamíferos de la Estación de la Biología “Los Tuxtlas.” Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, Distrito Federal, México.
- Fagundes, V., Christoff, A. U., Amaro-Ghilard, R. C., Scheibler, D. R., y Yonenaga-Yassuda, Y. (2003). Multiple interstitial ribosomal sites (NORs) in the Brazilian squirrel *Sciurus aestuans ingrami* (Rodentia, Sciuridae) with $2n = 40$: An overview of *Sciurus* cytogenetics. *Genetics and Molecular Biology*, 26(3), 253–257.
- Gelder, R. G. (1969). Voucher specimen in comparative cytogenetic studies. Pp. 445–450, en *Comparative Mammalian Cytogenetic* (K. Benirschke, ed.). Springer-Verlag, New York, U.S.A., 473 pp.
- Hafner, J. C., y Sandquist, D. R. (1989). Postmortem field preparation of bird and mammal chromosomes: an evaluation involving the pocket gopher, *Thomomys bottae*. *The Southwestern Naturalist*, 330–337.
- Hall, E. R. (1981). *The mammals of North America*. (2a ed.) John Wiley y Sons, New York.



- Hall, E. R., y Dalquest, W. W. (1963). The mammals of Veracruz. University of Kansas Publications, Museum of Natural History, 14:165–362.
- Hayssen, V. (2008). Patterns of body and tail length and body mass in Sciuridae. *Journal of Mammalogy*, 89(4), 852–873.
- Hortelano-Moncada, Y., Cervantes-Reza, F. A., y Trejo-Ortiz, A. (2009). Mamíferos silvestres de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel en Ciudad Universitaria, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF. *Revista mexicana de biodiversidad*, 80(2), 507–520.
- Hsu, T. C. (1966). The chromosomes of the pine squirrel (*Tamiasciurus*). *Mamm. Chromosomes Newsl*, 19, 22.
- Hsu, T. C. y Benirschke, K. (1975). *An atlas of mammalian chromosomes. Vol. 7*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, and New York.
- Kim, J. B., y Lee, H. I. (1990). A comparative study in Korean squirrels: I. Karyotype analysis of *Sciurus vulgaris* and *Tamias sibiricus* by conventional Giemsa and C-banding method. *Korean J. Zool*, 33, 222–223.
- Kirov, I., Khrustaleva, L., Van Laere, K., Soloviev, A., Meeus, S., Romanov, D., Fesenko, I. (2017) DRAWID: user-friendly java software for chromosome measurements and idiogram drawing. *Comparative Cytogenetics* 11(4): 747–757.
- Koprowski, J. L. (2002). Handling tree squirrels with a safe and efficient restraint. *Wildlife Society Bulletin*, 101–103.
- Koprowski, J. L., De Oca, A. N. M., Palmer, G. H., Ramos-Lara, N., y Timm, R. M. (2017). *Sciurus aureogaster* (Rodentia: Sciuridae). *Mammalian Species*, 49(951), 81–92.



- Lapunova, J. A., y Zolnerovskaja, J. I. (1969). The chromosome complements of some species Sciuridae. *The mammals: Evolution, Karyology, Taxonomy, Fauna. Academy of Sciences of the USSR, Siberian branch, Novosibirsk*, 167.
- Li, T., O'Brien, P. C., Biltueva, L., Fu, B., Wang, J., Nie, W., Ferguson-Smith, M. A., Graphodatsky, A. S., y Yang, F. (2004). Evolution of genome organizations of squirrels (Sciuridae) revealed by cross-species chromosome painting. *Chromosome Research*, 12(4), 317–335.
- Lima, J. F. D. S., y Langguth, A. (2002). Karyotypes of Brazilian squirrels: *Sciurus spadiceus* and *Sciurus alphonsei* (Rodentia, Sciuridae). *Folia Zoologica*, 51(3), 201–204
- Lucas, J. M., y Galián, J. (2009). Análisis molecular de *Sciurus vulgaris hoffmanni* Valverde, 1967 (Rodentia: Sciuridae) e implicaciones para su conservación. En *Anales de Biología* (No. 31, pp. 81–91). Servicio de Publicaciones de la Universidad de Murcia.
- Morton, C.C. (2010), Cytogenetics. *Current Protocols in Human Genetics*, 67: 4.0.1–4.0.3.
- Musser, G. G. (1968). A systematic study of the Mexican and Guatemalan gray squirrel, *Sciurus aureogaster* F. Cuvier (Rodentia: Sciuridae). Museum of Zoology, University of Michigan.
- Nadler, C. F., *Syst. Zool.* 15, 199 (1966); *J. Mammal.*, en prensa.
- Nadler, C. F., y Sutton, D. A. (1967). Chromosomes of some squirrels (mammalia—sciuridae) from the genera *Sciurus* and *Glaucomys*. *Experientia*, 23(4), 249–251.
- Nadler, C. F. y Hoffmann, R. S. (1970). Chromosomes of Some Asian and South American Squirrels (Rodentia, Sciuridae). *Experientia*; 26:1383–1386.



- Oshida, T. (1993). Chromosome banding patterns of the Eurasian squirrel, *Sciurus vulgaris orientis* Thomas. *Chrom. Inform. Serv.*, 55, 10–12.
- Oshida, T., Itoya, M., y Yoshida, M. C. (1996). Q-banded karyotype of a male Japanese squirrel, *Sciurus lis*. *Chromosome Information Service: CIS*, (61), 22–24.
- Özkurt, Ş., Sözen, M., Yiğit, N., Çolak, E., y Verimli, R. (1999). On the karyology and morphology of *Sciurus anomalus* (mammalia: rodentia) in turkey. *Zoology in the Middle East*, 18(1), 9–15.
- Petit, D., Couturier, J., Viegas-Pequignot, E., Lombard, M., y Dutrillaux, B. (1984). Great degree of homology between the ancestral karyotype of squirrels (rodents) and that of primates and carnivores. In *Annales de genétique* (Vol. 27, No. 4, p. 201).
- Pizzimenti, J. J. (1972). Listo of karyotypes of mammalian from the Northern Plains Region. *Transactions of the Kansas Academy of Science*, 74:67–75.
- Ramírez-Pulido, J., González-Ruiz, N., Gardner, A. L., y Arroyo-Cabrales, J. (2014). List of recent land mammals of Mexico, 2014.
- Rausch, R. L., y Rausch, V. R. (1965). Cytogenetic evidence for the specific distinction of an Alaskan marmot, *Marmota broweri* Hall and Gilmore (Mammalia: Sciuridae). *Chromosoma*, 16(5), 618–623.
- Renzoni, A. (1967). Chromosome studies in two species of rodents, *Hystrix cristata* and *Sciurus vulgaris*. *Mammals Chromosome Newsletter*, 8, 11–12.



- Sánchez-Cordero, V., Botello, F., Flores-Martínez, J. J., Gómez-Rodríguez, R. A., Guevara, L., Gutiérrez-Granados, G., y Rodríguez-Moreno, Á. (2014). Biodiversidad de Chordata (Mammalia) en México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 85, 496–504.
- Sasaki, M. (1968). Notes on the somatic chromosomes of two species of Asiatic squirrels. *Chrom Inf Serv*, 9, 6–8.
- Sikes, R. S., y Animal Care and Use Committee of the American Society of Mammalogists. (2016). 2016 Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research and education. *Journal of Mammalogy*, 97(3), 663–688.
- Stanyon, R., Stone, G., Garcia, M., y Froenicke, L. (2003). Reciprocal chromosome painting shows that squirrels, unlike murid rodents, have a highly conserved genome organization. *Genomics*, 82(2), 245–249.
- Tamar Silva, C., Contreras, N. C., y Fonseca, D. J. (2008). Utilidad de la citogenética en la medicina actual Visión histórica y aplicación. *Acta Medica Colombiana*, 33(4), 309–316.
- Tsuchiya, K. (1979). A contribution to the chromosome study in Japanese mammals. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 55(4), 191–195.
- Uribe, M. (1977). *Estudios citogenéticos en algunas especies de roedores y lagomorfos de México*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. U.N.A.M., México, 169 pp.
- Valdés-Alarcón, M. (2003). Las ardillas de México. *Biodiversitas*. 51:1–7.
- Valdéz Alarcón, M., y Téllez-Girón, G. (2005). *Sciurus aureogaster* F. Cuvier, 1829. Ardilla gris. Pp. 547–548 en *Los mamíferos silvestres de México* (G. Ceballos and G. Oliva, eds.).



Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad and Fondo de Cultura Económica, México.

Valdéz-Alarcón, M., y Téllez-Girón, G. (2014) *Sciurus aureogaster* F. Cuvier, 1829. Red-bellied squirrel. Pp. 174–175 en *Mammals of México* (G. Ceballos, ed.). Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.

Villalobos, F. A. (2013). *Sistemática y evolución de las ardillas del género Sciurus en Mesoamérica*. Tesis Doctoral. Universidad de Costa Rica. Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica, 147 pp.

Villalobos, F., y Gutierrez-Espeleta, G. (2014). Mesoamerican tree squirrels evolution (Rodentia: Sciuridae): a molecular phylogenetic analysis. *Revista de biología tropical*, 62(2), 649–657.

Wilson, D. E., y Reeder, D. M. (Eds.). (2005). *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference* (Vol. 1). JHU Press.



ANEXO I

Siguiendo la técnica de Hafner y Sandquist, 1989, con modificaciones de Christidis, 1985.

Una vez extraídos ambos fémures, los huesos fueron limpiados lo mejor posible. Posteriormente con una alicata se cortaron las epífisis y con ayuda de una jeringa con una aguja adecuada para el tamaño del hueso se hicieron pasar 5 mL de medio de cultivo RPMI 1640 (modificación de Christidis) en la cavidad medular, procurando extraer toda la médula para lo cual fue necesario pasar el medio de cultivo por ambos extremos del hueso.

La médula fue colocada en un tubo para centrífuga y le fue agregado 0.1 mL de colchicina al 0.001% (modificación de Christidis), con una pipeta Pasteur fue aspirada hasta que se obtuvo una solución homogénea para después llevarla a incubar durante 90 min a 37 °C en una incubadora Thermo Scientific 310. Posterior al tiempo de incubación la suspensión se centrifugó a 2400 rpm por 3 min.

Se eliminó el sobrenadante, se agregaron 3 mL de solución hipotónica y se resuspendió el botón con una pipeta Pasteur para luego incubar durante 15 min a la misma temperatura que el procedimiento anterior. Nuevamente se centrifugó a 2400 rpm por 3 min.

Primer lavado. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular agregando 3 mL de fijador Carnoy fresco y se centrifugó a 2400 rpm por 3 min.

Segundo lavado. Se eliminó el sobrenadante, se agregaron 2 mL de fijador fresco y se resuspendió el botón celular.



Con una pipeta Pasteur se aspiró toda la suspensión celular y se filtró a través de una gasa en el tubo para centrífuga original. Si es necesario se puede agregar más fijador para dar más volumen a la suspensión (hasta 3 mL).

Posteriormente se vuelve a centrifugar a las mismas rpm y tiempo previamente mencionados.

Tercer lavado (concentrado). Se eliminó el sobrenadante, se agregó 1 mL de fijador fresco y se resuspendieron las células. La solución debe verse turbia y sin desechos extraños.

ELABORACIÓN DE PREPARACIONES

Con ayuda de una micropipeta, en un portaobjetos previamente lavado se dejaron caer 2–3 gotas de suspensión celular, desde una altura de aproximadamente 1.80 m y se dejaron secar al aire. (Se elaboraron de 3 a 4 laminillas por cada hueso).

TINCIÓN

Una vez secas las preparaciones se introdujeron en un vaso Coplin con Giemsa 1:50 durante 7 min. Pasado el tiempo de tinción se enjuagaron en otros dos vasos Coplin con agua destilada y se dejaron secar sobre papel absorbente.

REACTIVOS

Solución de levadura (Con base en Baker y Qumsiyeh, 1988):

3 g de levadura fresca

2 g de dextrosa

12 mL de agua destilada

*Debe burbujear para indicar que ya está activa.



Medio de cultivo RPMI 1640

Solución hipotónica de KCl 0.075M:

0.558 g de KCl

100 mL de agua destilada

*Debe usarse recién preparada y se puede usar máximo dos días si no está contaminada.

Solución de Colchicina

Concentración de 0.001 %

0.001 g de colchicina en 100 mL de agua destilada

*La solución debe guardarse en refrigeración.

Fijador Carnoy (3:1)

10 mL de ácido acético

30 mL de metanol absoluto

*Debe prepararse al menos 30 min antes de ser usado, mantenido en el congelador (-20 °C) y solo puede usarse 2–3 h después de preparado.

Giemsa

47 mL de agua destilada

2 mL de solución buffer pH 7.2

1 mL de colorante Giemsa MERCK



ANEXO II

Técnica para el cultivo de linfocitos de sangre periférica para la obtención del cariotipo.

SIEMBRA

En condiciones estériles, por cada muestra de sangre, se preparon 2 tubos cónicos con 3 mL de medio RPMI 1640 previamente preparado con Gentamicina (1 mL por cada 100 mL de medio) y fitohemaglutinina (150 μ L por cada 100 mL de medio) con el fin de tener una repetición de cada cultivo. También se adicionó 1 mL de suero fetal bovino a cada tubo.

Posteriormente a cada tubo se le agregaron 10 gotas de sangre (sin pasar a través de la aguja), desechando las primeras dos. Los tubos se flamearon, se cerraron bien, fueron etiquetados debidamente y por último se llevaron a incubar a 37 °C durante 72 horas.

Antes de la cosecha (30 min) a cada tubo se le agregaron 150 μ L de colcemida.

COSECHA

Finalizado el tiempo de incubación, los tubos se centrifugaron a 3500 rpm por 10 min, se retiró el sobrenadante y se adicionaron 3 mL de solución hipotónica previamente calentada a 37 °C, después se resuspendió el botón celular y se llevaron a incubar por 60 min a 37 °C

Prefijación

Finalizado el tiempo de incubación, se agregó 1 mL de fijador Carnoy, se centrifugó a 3500 rpm por 10 min y por último se eliminó el sobrenadante dejando aproximadamente 0.5 mL de la suspensión celular.



Lavados

A cada tubo se le agregaron lentamente 3 mL de fijador Carnoy frío y se dejó reposar por 10 min para posteriormente centrifugar a 4000 rpm por 10 min y se eliminó el sobrenadante.

Se agregaron 3 mL de fijador frío y se llevó a centrifugar en las condiciones ya descritas en el procedimiento anterior e igualmente se eliminó el sobrenadante.

Deben repetirse los últimos tres pasos anteriores por una tercera vez, o hasta que el botón celular adquiera un color blanquecino y el sobrenadante se observe transparente. (En el último desecho de sobrenadante se debe dejar aproximadamente 0.5 mL de la suspensión celular para la elaboración de las laminillas).

PREPARACIÓN DE LAMINILLAS

Se resuspendió el paquete celular y se dejaron caer de 2 a 3 gotas sobre una laminilla limpia y fría, dejándolas secar al aire y posteriormente se analizaron en contraste de fases para monitorear el índice mitótico.

REACTIVOS

Medio RPMI 1640 (GIBCO)

Fitohemaglutinina (GIBCO)

Gentamicina (20 mg/mL).

Colcemida



Solución hipotónica 0.075 M

2.796 g KCl

500 mL de Agua destilada

Fijador Carnoy (3:1)

Metanol absoluto (Merck)

Ácido acético glacial (Merck)

Giemsa al 10%



CUADROS

Cuadro 3. Tamaño promedio (μm) e índice centromérico de la ardilla *Sciurus aureogaster* obtenido mediante el cultivo de linfocitos de sangre.

Cromosoma	Longitud total	Longitud brazo corto	Longitud brazo largo	Índice centromérico	Clasificación
1	136.1850	50.0000	86.1850	36.7148	Submetacéntrico
2	134.6590	54.0000	80.6590	40.1013	Submetacéntrico
3	97.3696	38.0000	59.3696	39.0266	Submetacéntrico
4	96.5432	39.0000	57.5432	40.3964	Submetacéntrico
5	99.9888	29.0000	70.9888	29.0032	Submetacéntrico
6	99.2194	33.0000	66.2194	33.2596	Submetacéntrico
7	90.8581	26.0000	64.8581	28.6161	Submetacéntrico
8	85.8650	26.0000	59.8650	30.2801	Submetacéntrico
9	81.3797	23.0000	58.3797	28.2626	Submetacéntrico
10	78.9734	25.0000	53.9734	31.6562	Submetacéntrico
11	77.3531	25.0000	52.3531	32.3193	Submetacéntrico
12	75.6274	29.0000	46.6274	38.3459	Submetacéntrico
13	67.1359	22.0000	45.1359	32.7693	Submetacéntrico
14	65.7447	21.0000	44.7447	31.9417	Submetacéntrico
15	66.2196	26.0000	40.2196	39.2633	Submetacéntrico
16	65.3535	24.0000	41.3535	36.7234	Submetacéntrico
17	61.0119	24.0000	37.0119	39.3366	Submetacéntrico
18	58.8728	22.0000	36.8728	37.3687	Submetacéntrico
19	58.0023	19.0000	39.0023	32.7573	Submetacéntrico
20	56.6433	16.0000	40.6433	28.2469	Submetacéntrico
21	52.3949	18.0000	34.3949	34.3545	Submetacéntrico
22	43.6356	15.0000	28.6356	34.3756	Submetacéntrico
23	55.3162	18.0000	37.3162	32.5402	Submetacéntrico
24	51.0741	20.0000	31.0741	39.1588	Submetacéntrico
25	76.6581	33.0000	43.6581	43.0483	Metacéntrico
26	71.8511	31.0000	40.8511	43.1448	Metacéntrico
27	67.2350	33.2350	34.0000	49.4311	Metacéntrico
28	68.1621	30.0000	38.1621	44.0127	Metacéntrico
29	55.4790	27.0000	28.4790	48.6671	Metacéntrico
30	49.8467	24.0000	25.8467	48.1476	Metacéntrico
31	43.9204	21.0000	22.9204	47.8137	Metacéntrico
32	39.5708	18.0000	21.5708	45.4881	Metacéntrico
33	37.9685	17.0000	20.9685	44.7740	Metacéntrico
34	36.2929	17.0000	19.2929	46.8411	Metacéntrico
35	33.2359	16.0000	17.2359	48.1408	Metacéntrico
36	30.9146	14.0000	16.9146	45.2860	Metacéntrico
37	29.1684	14.0000	15.1684	47.9971	Metacéntrico
38	24.0000	11.0000	13.0000	45.8333	Metacéntrico
X	71.6673	21.0000	50.6673	29.3021	Submetacéntrico



Y	46.8094	9.0000	37.8094	19.2269	Acrocéntrico
---	---------	--------	---------	---------	--------------

Cuadro 3. Tamaño promedio (μm) e índice centromérico de la ardilla *Sciurus aureogaster* obtenido a partir de médula ósea.

Cromosoma	Longitud total	Longitud brazo corto	Longitud brazo Largo	Índice Centromérico	Clasificación
1	212.0285	81.0285	131.0000	38.2159	Submetacéntrico
2	176.2417	67.0000	109.2417	38.0160	Submetacéntrico
3	150.0759	69.0000	81.0759	45.9767	Submetacéntrico
4	146.1711	64.0000	82.1711	43.7843	Submetacéntrico
5	140.1340	45.0000	95.1340	32.1121	Submetacéntrico
6	126.2059	36.0000	90.2059	28.5248	Submetacéntrico
7	128.9060	35.0000	93.9060	27.1516	Submetacéntrico
8	123.8689	40.0000	83.8689	32.2922	Submetacéntrico
9	120.1733	31.0000	89.1733	25.7961	Submetacéntrico
10	117.4340	32.0000	85.4340	27.2493	Submetacéntrico
11	126.7940	47.0000	79.7940	37.0680	Submetacéntrico
12	120.1194	49.0000	71.1194	40.7927	Submetacéntrico
13	138.9026	47.0000	91.9026	33.8367	Submetacéntrico
14	108.0185	36.0000	72.0185	33.3276	Submetacéntrico
15	94.6266	30.0000	64.6266	31.7035	Submetacéntrico
16	90.7279	28.0000	62.7279	30.8615	Submetacéntrico
17	120.2152	32.0000	88.2152	26.6189	Submetacéntrico
18	96.1344	27.0000	69.1344	28.0857	Submetacéntrico
19	79.6535	23.0000	56.6535	28.8751	Submetacéntrico
20	99.6497	32.0000	67.6497	32.1125	Submetacéntrico
21	84.2610	26.0000	58.2610	30.8565	Submetacéntrico
22	82.2845	26.0000	56.2845	31.5977	Submetacéntrico
23	72.8365	24.0000	48.8365	32.9505	Submetacéntrico
24	71.5493	25.0000	46.5493	34.9410	Submetacéntrico
25	115.2638	54.0000	61.2638	46.8491	Metacéntrico
26	111.0367	50.0000	61.0367	45.0302	Metacéntrico
27	86.1122	35.0000	51.1122	40.6446	Metacéntrico
28	84.8171	41.0000	43.8171	48.3393	Metacéntrico
29	75.6274	33.0000	42.6274	43.6350	Metacéntrico
30	75.4322	32.0000	43.4322	42.4222	Metacéntrico
31	66.5421	28.0000	38.5421	42.0786	Metacéntrico
32	57.4520	24.0000	33.4520	41.7740	Metacéntrico
33	56.7002	27.7002	29.0000	48.8538	Metacéntrico
34	53.3696	25.0000	28.3696	46.8432	Metacéntrico
35	46.5186	23.0000	23.5186	49.4426	Metacéntrico
36	45.1969	19.0000	26.1969	42.0383	Metacéntrico
37	44.4545	21.0000	23.4545	47.2393	Metacéntrico
38	39.2483	18.0000	21.2483	45.8619	Metacéntrico
X	96.8113	31.0000	65.8113	32.0211	Submetacéntrico
Y	72.1117	11.0000	61.1117	15.2541	Acrocéntrico

