

142
2^o



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**

**IMPLEMENTACION DE UNA TECNICA DE
ANALISIS CITOGENETICO PARA EL
ESTUDIO DE CETACEOS DE VIDA**



**FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

MAURICIO ORTEGA GIRON



MEXICO D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

" IMPLEMENTACIÓN DE UNA TÉCNICA DE ANALISIS CITOGENETICO PARA EL ESTUDIO DE
CETACEOS DE VIDA LIBRE "

realizado por ORTEGA GIRÓN MAURICIO

con número de cuenta 8127482-0 , pasante de la carrera de BIOLOGÍA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

DR. LUIS MEDRANO GONZALEZ

Propietario

DRA. PATRICIA RAMOS MORALES

Propietario

BIOL. CARLOS ESQUIVEL MACIAS

Suplente

BIOL. JULIO PRIETO SAGREDO

Suplente

M. en C. RUTH VANEGAS PEREZ

Consejo Departamental de Biología

CONSEJO
DE BIOLÓGICOS

AGRADECIMIENTOS

"La gratitud es noble recompensa de las almas generosas"
William Shakespeare

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la colaboración de compañeras del grupo de Mamíferos Marinos; a estudiantes de la materia optativa de Mamíferos Marinos y de las Biologías de Campo y profesores de la Facultad de Ciencias; a la comunidad de pescadores de Punta de Mita, Nayarit; al personal del Servicio de Genética del Hospital General de México, y a uno que otro jalón de oreja que siempre fue bien recibido.

Dijo Madame Deshoulières que el agradecimiento está siempre en boca de todos y su sentido es lo que menos se cumple. Quiero agradecer a todas y cada una de las personas que de alguna manera contribuyeron para que este trabajo llegara a feliz término. Como es bien sabido, cada vez que uno agradece, quedan nombres olvidados por una u otra razón, así que, en vergonzosa anticipación a las accidentadas y obitgadas omisiones; agradezco mucho la ayuda de todos aquellos cuyos nombres no aparecen en esta sección: posiblemente escapen en este momento de mi mente, pero jamás lo harán de mi memoria.

GRACIAS

Adrián Pérez, del servicio de Genética del Hospital General de México, me la he pasado pensando cómo poder decir GRACIAS sin que suene vacío. Creo que si hubiera más personas como tú, que desinteresadamente ayudaste a que esto que tienes en tus manos saliera adelante, se lograrían muchísimas cosas tanto en la Ciencia, como en otras disciplinas. Este trabajo que ahora lees es posible en gran parte gracias a ti.

A mis sinodales -y maestros- en este trabajo: Luis Medrano, Patricia Ramos, Carlos Esquivel, Julio Prieto y Cecilia Vanegas por su orientación, sus comentarios y observaciones. Luis: gracias por esas correcciones -¡hasta que por fin!-; Miss: gracias por fijarse en esos detalles; Charlie: gracias por tu honradez, minuciosidad y rapidez con la que revisaste tantos borradores.

Al "doc" Anelio Aguayo, por sus "mentiras", su confianza, por haberme entusiasmado hasta este grado y por no haberme aceptado en su laboratorio cuando se lo pedí ¡Ah! y porque los pollitos siguen diciendo plo-plo.

A mis padres ¿a que no adivinan por qué? Bueno, además de TODO, por haberme enseñado a luchar y por su apoyo y entrega que siempre han manifestada con hechos y no con lágrimas ni con palabras.

Al Dr. José Luis Solórzano de "Atlantis Convimar" por toda su ayuda, orientación y por esas largas asoleadas.

A las autoridades de "Remo Aventura" por todas las facilidades otorgadas.

A la Dra. Mabel Cerrillo por esas breves, amabilísimas, instructivas y reveladoras charlas con galletitas.

A Marlene Acevedo, por sus gentiles coscorriones y manazas; su sutil, recurrente, refinado, irónica, elocuente, y iniquivélica metodología de técnicas y procedimientos que evitaron la sobrepoblación de técnicas, muestras y de tomas de muestras en este escrito. También por su amistad y su incondicional disposición para la revisión y corrección de estilo de este trabajo.

A la comunidad de pescadores de Punta de Mita, Nuy, en especial a Justino, Margarita y sus hijos; a Marcial, a don Chente y a José Ángel -el Picudo-. Porque sin ustedes, sin sus risas, su trabajo, su ayuda y todo el cariño con el que nos tratan, toda esta hilera de biólogos que ha desfilado desde 1982 seguiría caminando sin rumbo en la playa, mirando el horizonte si hallar nada y haciendo desfiguros en las pangax. Ismael Casillas (q.e.p.d.) Nadie que haya tenido oportunidad de navegar y aprender contigo sería capaz de no reconocer y agradecer tu trabajo, tu humor y tu ayuda.

A todos los que me estuvieron apoyando a seguir trabajando (mi equipo personal de portistas) Gaby Cabrera, Vicky Lora, Paulina De Labra, la famosísima Jackie, Silvia Hambleton -gracias por esos artículos-, mi madrina, Carmelita Basurto, Chelita (q.e.p.d.) y demás amigos, compañeros y alumnos.

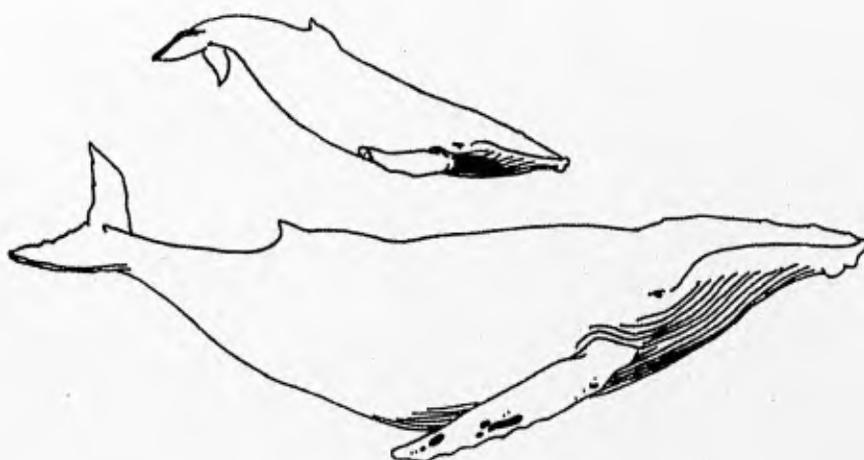
A todos aquellos quienes por solidaridad, compasión y hasta ignorancia me permitieron utilizar su equipo de computación -Miguel Ángel Martínez: ¡Gracias!-

A la pequeña Gabriela Cabrera por sus contados, pero siempre atinados comentarios a este trabajo; por todo aquello que las palabras no son capaces de expresar; por esa sonrisa y "por coincidir"- y coincidir-

A Leda, del Servicio de Genética del Hospital General de México, por tu fantástica memoria.

*Propagar el amor a los animales,
ofrecerles el respeto y la protección que merecen,
es la única forma que tenemos de justificar
el impacto que ocasionamos en las poblaciones
de mamíferos marinos:
ésta es la primera condición para saber vivir.*

Modificado de Amiel, Clémenceau y Howard Hall



CONTENIDO

Índice _____	I
Índice de figuras _____	III
I. RESUMEN _____	VI
II. INTRODUCCIÓN _____	I
Estructura del genoma de los mamíferos _____	7
Generalidades de Citogenética _____	12
Polimorfismos cromosómicos _____	15
Técnicas de bandeo _____	16
Técnicas de bandeo selectivas _____	18
Citogenética de los cetáceos _____	22
Estudios citogenéticos en los cetáceos _____	36
Métodos de recolecta y Procesamiento de tejidos de piel de cetáceos en vida libre. Biopsias _____	37
Equipo para la toma de biopsias _____	38
La piel de los cetáceos _____	45
Problemas que enfrentan los estudios citogenéticos en los cetáceos.	
Procesamiento de la muestra _____	47
Planteamiento de la Investigación _____	50
Objetivos _____	52

MATERIALES Y MÉTODOS	53
Obtención de cromosomas a partir de linfocitos humanos de sangre periférica	54
Bandas -G.	56
Bandas -C.	56
Ensayos con muestras de animales en cautiverio	57
Obtención de cromosomas a partir de muestras de sangre	57
Cultivo de fibroblastos a partir de biopsias obtenidas de cetáceos en cautiverio	60
Colecta y procesamiento de muestras de piel de cetáceos en vida libre.	
Procesamiento en el campo y cultivo en el laboratorio	62
Procesamiento de las muestras	65
Ensayos citogenéticos por procedimientos directos	67
IV. RESULTADOS	71
Cultivo de linfocitos humanos. Obtención, tinción y handeo de cromosomas	71
Ensayos citogenéticos con muestras de cetáceos en cautiverio.	
Muestras de sangre	73
Colecta de muestras de piel	74
Colecta y procesamiento de muestras de piel de cetáceos en vida libre	
Sistema de toma de biopsias	74
Efecto de la toma de la muestra en los cetáceos en vida libre	75
Procesamiento de las muestras de piel colectadas	77
Ensayos citogenéticos por procedimientos directos	78

V. DISCUSIÓN	80
VI. CONCLUSIONES	97
Apéndices	100
Apéndice 1. Especies de cetáceos de las que se ha descrito cariotipo	100
Apéndice 2. Preparación de los reactivos	102
VII. REFERENCIAS	105

ÍNDICE DE FIGURAS Y CAPÍTULOS EN ESTE TRABAJO

CAPÍTULO	PÁG	FIGURA Y PIE DE FIGURA
Generalidades de Citogenética	14	Figura 1. Esquema que muestra los tipos de cromosomas de acuerdo con el I.S.C.N. (1985): a) cromosomas metacéntricos; b) cromosomas submetacéntricos; c) cromosomas acrocéntricos en donde se aprecian las estructuras terminales de los brazos p, denominadas satélites (Wolstenhalme, 1992).
Citogenética de los cetáceos	29	Figura 2. Ideograma de <i>Balaenoptera physalus</i> . Se indica el cromosoma X. La escala de tamaño corresponde al porcentaje con referencia al tamaño de todo el conjunto complemento, es decir, la suma del tamaño de todos los cromosomas en el ideograma es 100%.
	30	Figura 3. Ideograma de <i>Balaena mysticetus</i>
	31	Figura 4. Cariotipos en bandas -C de la orca, <i>Orcinus orca</i> y, en bandas -G del delfín moteado, <i>Stenella clymene</i> (S). Las diferencias entre los cariotipos de estas especies son evidentes, principalmente en los cromosomas telocéntricos. En el cariotipo de la orca este grupo se indica con * puesto que este grupo es artificial (Arnason <i>et al.</i> , 1980).
	32	Figura 5. Ideograma de <i>Stenella clymene</i>
	33	Figura 6. Ideograma de <i>Physeter catodon</i>
	34	Figura 7. Ideograma de <i>Mesoplodon europaeus</i>
	39	Figura 8. Ballesta que ilustra el sistema de muestreo de piel de cetáceos de vida libre empleada por Lambertsen (1987). Se aprecia el mecanismo de recuperación de las flechas consistente en una línea de nylon.
	40	Figura 9. Dardo empleado por Winn <i>et al.</i> , (1973). Se aprecia el mecanismo de retención de la muestra.
	40	Figura 10. Dardo empleado por Lambertsen, (1987). Se aprecia el dispositivo de retención de la muestra.
	41	Figura 11. Diseño del dardo para la toma de biopsias de piel reportado por Weinrich <i>et al.</i> , (1991). Se aprecia el mecanismo para la retención de muestra.
	43	Figura 12. Dardo y flecha empleados por Mathews <i>et al.</i> , 1988, se aprecia el flotador que ayuda en la recuperación de la flecha.

	43	Figura 13. Flecha y dardo diseñados en la Facultad de Ciencias (Medrano, 1993). Se aprecian el flotador para la recuperación de la muestra y el mecanismo para la retención de la misma.
	46	Figura 14. Corte de piel del delfín moteado, <i>Stenella attenuata</i> teñido por la técnica de Masson por la cual se observan las fibras de colágeno en color obscuro.
MÉTODO	58	Figura 15. Esquema que indica las zonas de muestreo de sangre en la orca
	59	Figura 16. Toma de muestra de sangre de la orca <i>Keiko</i> , macho de la especie <i>Orcinus orca</i>
	61	Figura 17. Toma de muestra de piel de la orca <i>Keiko</i> . Se aprecia una de las áreas de infección por <i>Papiloma</i> de la que se obtuvo piel para obtención de preparaciones cromosómicas.
	63	Figura 18. Diseño de la campana de acrílico empleada para el procesamiento de las biopsias de piel de cetáceos.
	64	Figura 19. Esquema que indica la zona de impacto del dardo durante la toma de biopsias de piel en grandes cetáceos como la ballena jorobada, <i>M. novaenngliae</i>
	66	Figura 20. Ballesta empleada para la toma de biopsias de piel de cetáceos en vida libre (Medrano, 1993; Fotografía: Carlos Esquivel).
	70	Figura 21. Método empleado en el procesamiento de las muestras de piel en el campo para la obtención de preparaciones cromosómicas por técnica directa.
RESULTADOS	71	Figura 22. Cariotipo humano de un control sano. Técnica de tinción normal. Se indican los cromosomas sexuales. La determinación de éstos se realizó basándose en el cariotipo realizado en bandas -C, puesto que el cromosoma sexual Y no se pudo localizar sino hasta aplicar dicha técnica
	72	Figura 23. Cariotipo humano de un control sano. Técnica de tinción en bandas -G. Se indican los cromosomas sexuales X y Y.
	72	Figura 24. Cariotipo humano del mismo control sano en técnica de tinción en bandas -C. Se indican los cromosomas sexuales así como los polimorfismos en los cromosomas 15ph+ y Yqh+. Estos polimorfismos fueron evidentes con la aplicación de esta técnica.
	73	Figura 25. Cariotipo de <i>Keiko</i> , macho de la especie <i>Orcinus orca</i> .

	75	Figura 26. Eficiencia de la colecta, medida como el porcentaje de muestras obtenidas por impacto en función de la distancia empleando una ballesta de 23 kg de empuje.
	77	Figura 27. Porcentaje de respuestas observables de ballenas jorobadas ante impactos de flecha para coleccionar biopsias en función de la distancia.
	78	Figura 28. Registro del tráfico de embarcaciones y su relación con la actividad en superficie de ballenas jorobadas en la boca norte de Bahía de Banderas, Nay. el día 20 de enero de 1993. La figura indica cómo los animales varían su conducta en superficie cuando hay mayor tráfico de embarcaciones en la zona (Medrano <i>et al.</i> , 1996).
	79	Figura 29. Cariotipo de la ballena jorobada, <i>M. novaeangliae</i> . Las condiciones de la preparación impidieron que se pudiera ordenar el cariotipo.
DISCUSIÓN	95	Figura. 30. Dispositivo para procesar biopsias empleado por Mathews <i>et al.</i> , 1988.

RESUMEN

Se realizaron ensayos de cultivos de células y obtención de cromosomas a partir de sangre y piel de humanos, así como en cetáceos en cautiverio con el objeto de desarrollar una técnica aplicable al estudio de cetáceos en vida libre. La colecta de muestras en el campo se realizó mediante un sistema de dardo de fácil fabricación para obtener biopsias de piel de cetáceos en vida libre y aplicable en pequeños cetáceos. Se informa aquí la experiencia obtenida en su uso y aplicaciones en estudios citogenéticos, así como las condiciones de trabajo en el campo y su influencia en los resultados. El análisis del empleo de este sistema de dardo, principalmente con ballenas jorobadas (*Megaptera novaeangliae*), indica que la obtención de tejidos no daña a los animales y altera poco su conducta, además, es útil en la colecta de tejidos para estudios basados en el cultivo de células. El procesamiento de la muestra en el campo debe ser lo más aséptico posible. Las condiciones del trabajo en el campo, el transporte y la forma de extracción de las células influyen en la viabilidad y afectan el índice mitótico de éstas, lo que hace que este tipo de estudios sean difíciles de realizar. Se lograron preparaciones cromosómicas por una técnica directa en las que no hubo indicio alguno de contaminación. De éstas se obtuvo una metafase analizable. Estos resultados, aunque satisfactorios, requieren de más desarrollo técnico antes de considerarse aplicables al estudio de cetáceos de vida libre. El trabajo y los resultados con muestras de sangre sientan una base de estudios citogenéticos aplicables a las poblaciones de lobos marinos y otras especies de pinnípedos.

INTRODUCCIÓN

La conservación y el aprovechamiento de los cetáceos es uno de los temas que mayor controversia ha causado en los últimos años. Aún sin mencionar el cuestionamiento ético que implica sacrificar a estos animales, es necesario tener un conocimiento amplio sobre las poblaciones de cetáceos, su dinámica y los factores biológicos que las afectan antes de juzgar la explotación de estos mamíferos.

Los cetáceos pasan toda su vida en el mar, viajan grandes distancias y viven en un medio en el que el desplazamiento y las condiciones del clima hacen difícil su identificación individual. La conservación de estas especies requiere de un entendimiento muy completo sobre su estructura social, comportamiento reproductivo, patrones de migración y número total de la población (Aguayo *et al.*, 1982; Gaskin, 1982; Amos *et al.*, 1991 y 1992).

La dificultad que implica trabajar con estos animales en su medio ocasionó que los primeros estudios sobre ellos estuvieran basados en las capturas realizadas por diferentes pesquerías, particularmente, la de la industria ballenera. De estos datos, se obtuvo una estimación de los tamaños de población de las especies comerciales.

Otra forma de estudiar a los cetáceos en su medio es la de las estimaciones basadas en los censos (conteo directo) y en la adaptación de modelos poblacionales que fueron aplicados a otros grupos de vertebrados. En este método, el censo se puede aplicar ya sea haciendo un conteo directo del número total de individuos de la población, que de acuerdo con Gaskin (1982) es prácticamente imposible de aplicar en las poblaciones de cetáceos; o

bien, contando un número representativo de la misma en un espacio y tiempo definidos, y extrapolando el valor para estimar el número total de la población. En este sistema existe una discrepancia entre los números absolutos y la abundancia relativa de las especies en diferentes áreas (Radway, 1980).

En los procesos de captura y recaptura, se identifica a los animales mediante marcas artificiales (dardos, discos numerados, espaguetis, radionuevas), o naturales, como los patrones de coloración y las cicatrices. Se registra la incidencia del animal en un espacio y tiempo determinado y se colectan los datos iniciales al ser capturado éste. El empleo de esta técnica permite estimar el tamaño de la población. No obstante, existen factores que limitan la información obtenida: las marcas artificiales alteran el comportamiento, pueden dañar a los animales, y no siempre quedan fijas en el individuo (Radway, 1980; Gaskin, 1982).

Uno de los métodos de marcaje captura y recaptura es la fotoidentificación. Ésta se basa en el reconocimiento de marcas naturales que casi no tienen variación a través de los años. La técnica es de gran utilidad para reconocer individuos de diversas especies mediante el uso de las diferencias en la pigmentación, la morfología, las cicatrices y otras marcas que se observan en las partes visibles de los cetáceos como las aletas dorsales, pectorales, caudales y el rostro. En la ballena jorobada (*Megaptera novaeangliae*), por ejemplo, se ha demostrado que la parte ventral de la aleta caudal presenta un patrón de pigmentación específico en cada animal y se ha empleado para identificarlos en el mar (Katona *et al.*, 1979; Álvarez, 1987; Campos, 1989; Álvarez *et al.*, 1991). La utilización de

esta técnica permite estimar el tamaño poblacional e, incluso, conocer algunos aspectos reproductivos a través de la identificación de los sexos, basándose en los trabajos fotográficos sobre la anatomía de la región reproductora reportados por Glockner (1983) y Glockner y Venus (1983), así como estudiar eventos y patrones conductuales (Baker *et al.*, 1987a; Campos, 1989), obtener información sobre los movimientos migratorios de los cetáceos y sobre su permanencia en áreas particulares, definir poblaciones y estimar sus tamaños (Katona *et al.*, 1979).

Cabe mencionar también las técnicas bioacústicas, si bien éstas no pertenecen a los métodos de marcaje captura-recaptura, son igualmente de reciente aplicación en el estudio de los cetáceos en su medio. Dichas técnicas se basan en la intensidad del sonido, la distribución de frecuencias, el patrón de tiempo y la ubicación en el espacio (Gales, 1966). Existen especies que tienen un patrón de emisión muy evidente en sus llamados. Tales son los casos de la orca, *Orcinus orca* y de la ballena jorobada, *M. novaeangliae* (Moore, 1988). Con esta información se han realizado trabajos sobre identificación de sonidos emitidos por mamíferos marinos, así como investigación acerca de las actividades de estos animales asociadas con los sonidos (Steinberg, 1966); y más recientemente, descripciones de la ocurrencia temporal y rastreo de cetáceos (Thomas *et al.*, 1986, citado en Moore, 1988).

Los estudios realizados sobre el comportamiento social y la biología de las poblaciones de cetáceos han tenido como base la identificación del sexo del individuo; sin embargo, en el mar, resulta difícil determinarlo. La prueba más contundente es la

inspección de la región genital y no es fácil de realizar dada la continua movilidad de éstos, por lo que la identificación del sexo se limita a una mera inferencia basada en el comportamiento de los individuos. En este aspecto, los estudios genéticos se presentan como una alternativa en el estudio de los cetáceos ya que pueden ser una base para obtener un conocimiento más amplio y preciso de las poblaciones de estos animales.

El análisis genético con la aplicación de técnicas como la del "DNA-fingerprints" (Huellas digitales de DNA) ofrece una herramienta muy importante en el estudio de la estructura de las poblaciones de cetáceos (Amos y Hoelzel, 1990; Baker *et al.*, 1991), y contribuye también al conocimiento del impacto de las actividades humanas sobre estos animales (Amos y Hoelzel, 1990; Cohn, 1990). La aplicación de estas "huellas digitales de DNA" permite indentificar individuos con un alto grado de confiabilidad (Amos y Hoelzel, 1990), ya que detecta la variabilidad genética a nivel de DNA. Este tipo de análisis genético está basado en la identificación de secuencias cortas muy repetidas llamadas satélites o DNA altamente repetitivo (Jeffreys *et al.*, 1985). La aplicación de este análisis se basa en la obtención de biopsias de piel o de distintos órganos. El procedimiento requiere poca cantidad de tejido y su procesamiento es relativamente sencillo.

Hasta hace 25 años los tejidos utilizados en los análisis genéticos proventan, en su mayoría, de animales cautivos, varados, o capturados por la industria ballenera; habían sido estudios mas bien descriptivos y se habían utilizado para evaluar sus relaciones filogenéticas (Makino, 1948; Walen y Madin, 1965; Árnason, 1969; 1972; 1974; Duffield *et al.*, 1971; Árnason *et al.*, 1978). Recientemente se han realizado trabajos que consisten

en la toma de biopsias de piel de cetáceos de vida libre para su análisis genético y bioquímico (Winn *et al.*, 1973; Ámason *et al.*, 1985; Lambertsen, 1987; Lambertsen y Duffield, 1987; Lambertsen *et al.*, 1988; Amos y Hoelzel, 1990; Mathews *et al.*, 1988 y Rutz, 1988).

El trabajo reportado por Winn *et al.* (1973) marca el inicio de los sistemas de colecta de biopsias de piel de cetáceos en vida libre mediante un dardo con una punta modificada. Con el empleo de este tipo de sistemas se ha obtenido diversa información como la identificación del sexo (Winn *et al.*, 1973; Lambertsen y Duffield, 1987; Lambertsen *et al.*, 1988; Baker *et al.*, 1991), la identificación de individuos mediante cariotipos (Lambertsen y Duffield, 1987), el análisis de la variabilidad de marcadores genéticos (Mathews *et al.*, 1988; Amos y Hoelzel, 1990; Lande, 1991; Baker *et al.*, 1993) y el análisis de contenido de contaminantes (Taruski *et al.*, 1975; Medway, 1983). La cantidad de tejido requerida para el estudio es pequeña y se ha observado que la toma de la muestra no daña a los animales ni afecta su conducta a largo plazo (Medway, 1983; Aguilar y Nadal, 1984; Lande, 1991; Weinrich *et al.*, 1991; Clapham y Matilla, 1993). Los tejidos obtenidos de estas muestras se utilizan en análisis citogenéticos y moleculares que, combinados con la fotoidentificación, conforman una técnica de gran utilidad en el estudio de las poblaciones de cetáceos (Lambertsen *et al.*, 1988; Amos *et al.*, 1992).

Un estudio más detallado sobre los mamíferos marinos lleva al entendimiento de los sistemas de apareamiento, los tamaños efectivos de las poblaciones y las relaciones entre estas (Cohn, 1990). En este último aspecto, deben implementarse estudios genéticos

para determinar las relaciones entre los grupos de una misma especie que viven en diferentes zonas. Si bien los estudios enfocados a caracterizar la variabilidad molecular son mejores para este propósito, en los cetáceos existe una variabilidad citogenética intraespecífica considerable y la variación del cariotipo en los mamíferos está íntimamente ligada a los procesos de aislamiento reproductivo (Wilson *et al.*, 1974 y 1975; Jarrel, 1984), por lo que se necesita también el desarrollo de estudios citogenéticos para comprender la diversidad de las especies de cetáceos que habitan en las aguas territoriales y la zona económica exclusiva de nuestro país. Esto es lo que ha planteado la necesidad de implementar un sistema de análisis citogenético.

Estructura del genoma de los mamíferos

Todos los seres vivos están compuestos de células, y pueden clasificarse en función de éstas. Las bacterias son procariontes, organismos en los cuales normalmente hay un solo compartimento celular, rodeado por una membrana o membranas que la aíslan del medio exterior. En los eucariontes cada célula se compone de un núcleo, que contiene el material genético y está rodeado por un citoplasma que, a su vez, está envuelto por la membrana plasmática que determina la periferia de la célula. Los organismos unicelulares -sean procariontes o eucariontes- consisten en células individuales, capaces de sobrevivir y reproducirse. Los organismos multicelulares -generalmente los eucariontes- existen en virtud de la cooperación entre muchas células, que pueden especializarse en diferentes funciones para contribuir a la supervivencia del individuo.

La información genética pasa de un organismo a otro y de una generación a otra de dos maneras: sexual y asexual. Por consiguiente, cada generación recibe un conjunto de genes, necesarios para la formación de estructuras adicionales durante el desarrollo de un organismo y de otros genes que actúan como reguladores. Cada gen funciona controlando la síntesis de una proteína determinada. Se sabe que un gen es la unidad de la información genética o la unidad de la herencia y que cada uno de éstos es una secuencia de ácido desoxirribonucleico (DNA) que lleva la información para la formación de un polipéptido determinado. Los genes están contenidos en cromosomas que, además de presentar un número constante en cada una de las especies, presentan una estructura y una morfología definidas.

En las formas de vida elementales como las bacterias y los virus, los cromosomas son elementos de organización simple. Por el contrario, los cromosomas de los eucariontes son estructuras muy complejas (Bianchi, 1978). En las células diploides humanas, por ejemplo, el DNA está organizado en 23 pares de cromosomas. Los cromosomas en los eucariontes están compuestos principalmente de DNA, proteínas estructurales llamadas histonas, que son proteínas básicas ricas en arginina y lisina, y de las que existen cinco tipos: H₁, H_{2A}, H_{2B}, H₃ y H₄ y proteínas no histonas. Las proteínas no histonas o ácidas se encuentran en menor proporción que las histonas (Wolstenholme, 1992).

A la asociación de DNA con proteínas se le denomina cromatina. Dicha cromatina, unidad estructural de los cromosomas, es la porción teñible del núcleo y se aprecia mejor cuando los núcleos están en interfase o en los cromosomas metafásicos. La cromatina se pliega sobre sí misma una y otra vez para dar la forma condensada y compacta del cromosoma. Los cromosomas son las unidades por medio de las cuales la información genética pasa de una generación a otra a través de la división celular (Lewin, 1994). La fibra de cromatina es, por tanto, una fibra de nucleoproteína en donde todos los componentes, excepto las histonas, varían en cantidades proporcionales al DNA (Kornberg, 1974; Avers, 1983).

La cromatina se divide en dos tipos: eucromatina, que se refiere a la cromatina o segmentos de cromosomas que presentan tinción uniforme en el proceso del ciclo celular, y heterocromatina, que es aquella que muestra un grado irregular de condensación y tinción. La heteroploisía es la propiedad de la cromatina de mostrar variaciones en la intensidad

de tinción debidas a las alteraciones en los grados de condensación de los filamentos de cromatina (Heitz, 1926).

La heterocromatina se divide principalmente en dos categorías: constitutiva y facultativa (Brown, 1966). Ambas clases son de duplicación tardía durante la fase "S" del ciclo celular y se les desconoce función genética alguna (Therman y Susman, 1993). Bianchi (1978) informó no haber encontrado diferencias en la estructura básica de cada una de éstas al observarlas bajo el microscopio electrónico. Sin embargo, la estructura del DNA característica de la heterocromatina constitutiva es distinta de aquella del DNA eucromático. La heterocromatina facultativa consiste básicamente en DNA eucromático que se inactiva específicamente durante ciertas fases del desarrollo, como la inactivación del cromosoma X en las hembras de los mamíferos. La heterocromatina constitutiva, por su parte, consiste en secuencias cortas de DNA altamente repetitivas que no se transcriben y que son evidentes en las técnicas de bandeo con Giemsa (Lawee y Hack, 1980). Es por eso que las variaciones de este tipo de heterocromatina en los cromosomas de los vertebrados no se reflejan en el fenotipo (Jacky y Dill, 1980; Therman y Susman, 1993).

La heterocromatina constitutiva se halla presente en diversas especies de mamíferos con un patrón específico y constante para cada cromosoma y especie (Hsu y Arrighi, 1971). Este tipo de heterocromatina se relaciona con procesos como la condensación, distribución particular, inactividad génica y replicación tardía. Tiende también a asociarse con otras regiones de heterocromatina. Estudios bioquímicos y moleculares demuestran que la heterocromatina está formada por secuencias cortas y repetidas miles de veces (Sánchez y

(Sánchez y Yunis, 1974; Bianchi, 1978; Salamanca, 1983; 1990). Algunos autores como Sánchez y Yunis (1974), denominan a estas secuencias DNA-satélite o DNA altamente repetitivo, considerando estos dos términos como sinónimos. Existen estudios que demuestran que existen diferencias entre ambos: el DNA repetitivo consiste en secuencias de nucleótidos de extensión y composiciones diversas presentes en el genoma; mientras que el DNA-satélite está conformado por secuencias de DNA repetitivo que tienen una disposición uniforme y que, al ser tratadas con determinadas técnicas de separación de DNA, forman bandas distinguibles del fragmento principal de DNA (Li y Graur, 1991).

Dos de las características principales del genoma de los eucariontes son: la repetición de secuencias y la compartimentalización del genoma que están conformadas por secuencias específicas de nucleótidos. La mayor parte del genoma de los vertebrados de sangre caliente es un mosaico de segmentos de DNA denominados *isocoras* que se distinguen por su contenido de guanina y citosina. Esta compartimentalización en el genoma juega un papel importante en la secuencia de bases en los genes y durante de la evolución molecular (Bernardi *et al.* 1985, Bernardi y Bernardi, 1986). La proporción de este tipo de DNA varía según los taxa. En los mamíferos, por ejemplo, aproximadamente un 60% del DNA es repetitivo (Li y Graur, 1991).

El hablar del genoma, de su organización y evolución genera cuestiones como su tamaño y los mecanismos que influyen en el aumento o disminución de éste: la información genética que está en el genoma; si consiste únicamente en DNA génico o en secuencias no génicas; si existe un patrón de distribución de las secuencias repetitivas; si

existe una función para estas secuencias; y, finalmente, en cuanto a la composición de secuencias, si habrá heterogeneidad en la composición entre las distintas regiones del genoma. Se sabe que existe una cantidad constante de DNA en el genoma haploide. Este valor característico llamado *tamaño del genoma* o valor **C** varía de acuerdo con las especies, tanto en los procariontes como en los eucariontes. El valor **C** en estos últimos es, por lo general, mayor que en los procariontes, aunque en los organismos amniotas -aves, reptiles y mamíferos-, dicha variación del valor **C** es reducida. La variación interespecifica en el tamaño del genoma de los eucariontes no se relaciona con la complejidad de los organismos ni con el número de genes codificados por los mismos. Se sabe por ejemplo, que existen organismos unicelulares cuyo contenido de material genético es mucho mayor que el de los mamíferos. Esta incongruencia entre los valores **C** y el tamaño del genoma que existe entre las distintas especies de animales ha dado lugar a la llamada **paradoja del valor C** (Li y Graur, 1991). Esta paradoja genera la necesidad de explicar porqué tantas especies contienen tan grandes cantidades de DNA y cómo es que las mantienen. Los estudios conducidos a dilucidar esta aparente contradicción que existe en el genoma, dejan a la fracción no génica del DNA como única *responsable* de esta paradoja y, aunque aún no existe alguna hipótesis que la resuelva, se han elaborado diversas teorías para explicar posibles métodos de mantenimiento de la fracción no génica del genoma, están entre otras:

1. Regulación global de la expresión génica (Zuckerland, 1976 citado en Li y Graur, 1991).
2. Sin función, *DNA basura* (Ohno, 1972 citado en Li y Graur, 1991).
3. *DNA parásito* (Östergren, 1945 citado en Li y Graur, 1991) o *DNA egoísta* (Orgel y Crick, 1980; Doolittle y Sapienza, 1980 citados en Li y Graur, 1991).

4. DNA con función estructural, es decir, que sirve como nucleoesqueleto (Cavalier-Smith, 1985).

Esta fracción, que consiste de DNA que no contiene información genética constituye desde un 30 hasta casi el 90% del genoma (Cavalier-Smith, 1985).

El DNA de las células humanas contiene 3×10^9 pares de bases y alrededor de 50,000 genes, puesto que no todo el DNA representa genes (Gomez-Eichelmann, 1987). El análisis cromosómico se realiza durante la profase tardía o durante la metafase, en que cada cromosoma consta de dos cromátides que se mantienen unidas por una constricción primaria también llamada centrómero. Se llama cariotipo a la manera o forma en la que se clasifican los cromosomas de un individuo, y la representación esquemática de éstos y de sus regiones se denomina ideograma.

Generalidades de citogenética

La citogenética estudia el proceso de la herencia en el nivel celular, la relación existente entre el aspecto microscópico de los cromosomas y el modo en el que éstos se comportan durante la división celular, es decir, estudia la estructura, número, función y desplazamiento de éstos, la variación de sus características morfológicas y cómo se relacionan con la transmisión, recombinación y expresión de los genes (Garber 1972, Salamanca 1990; Wolstenholme, 1992).

Durante la metafase de la mitosis los cromosomas están formados por dos cromátidas que se mantienen unidas en una zona llamada centrómero. Gran parte de los estudios en citogenética se realizan mediante el análisis de grupos de células bloqueadas en

esta fase (Wolstenholme, 1992). Los cromosomas se agrupan en orden decreciente de tamaño. A dicho agrupamiento se le denomina cariotipo.

Existen varios criterios para clasificar a los cromosomas. En un principio se clasificaban de acuerdo con el *índice centromérico* que es una relación entre la longitud del brazo corto y la longitud total del cromosoma. Otros criterios de clasificación se basaron en la posición del centrómero y en el *índice de brazo*, que se define como la relación entre la longitud relativa de los brazos largos y cortos de un cromosoma y su centrómero (Levan *et al.*, 1964). Actualmente, los cromosomas se clasifican de acuerdo con los reportes del International System for Human Cytogenetics (ISCN, 1985). Dichos reportes se actualizan continuamente -el más reciente fue en 1985- y se basaron en la Nomenclatura de París (Conferencia de París 1971 y 1972). Por consiguiente, para realizar cualquier análisis en citogenética en seres humanos, los cromosomas se agrupan en orden decreciente de tamaño, la posición del centrómero determina la morfología general de éstos y se considera que el brazo corto del cromosoma (brazo p) está en la región superior de el mismo. En el cariotipo humano, se reconocen las siguientes formas (Figura 1):

Metacéntricos. El centrómero está en la región media y los cromosomas están divididos en dos partes iguales.

Submetacéntricos. El centrómero se halla más cerca de un extremo que del otro. La longitud de los brazos es, por tanto, distinta.

Acrocéntricos. El centrómero está cerca del extremo del cromosoma, los brazos p son muy cortos y terminan en estructuras denominadas satélites (Bianchi, 1978; Wolstenholme, 1992).

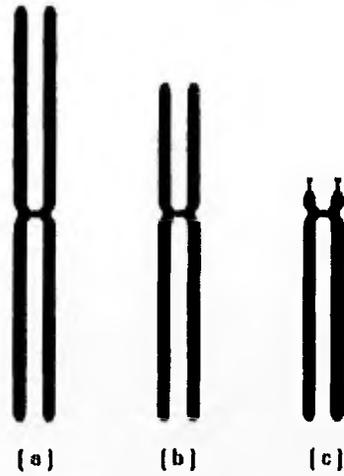


Figura 1. Tipos de cromosomas de acuerdo con el I.S.C.N. (1985): a) cromosomas metacéntricos; b) cromosomas submetacéntricos; c) cromosomas acrocéntricos en donde se aprecian las estructuras terminales de los brazos p, denominadas satélites (Wolstenholme, 1992).

Otro tipo de cromosomas son los **telocéntricos**. Éstos no existen dentro del cariotipo humano, ni pertenecen a la clasificación estandarizada de la Conferencia de París (1971), pero se hace mención de ellos por estar presentes en el cariotipo de los cetáceos. En los cromosomas telocéntricos, el centrómero es totalmente terminal y, de acuerdo con Darlington (1937), aparece por la ruptura centromérica de un cromosoma bibranquial.

De acuerdo con la estandarización del I.S.C.N. (1985), los cromosomas humanos se clasifican en siete grupos:

Grupo A- pares 1 - 3; cromosomas metacéntricos grandes que pueden distinguirse fácilmente por su talla y por la posición del centrómero.

Grupo B- pares 4 - 5; cromosomas submetacéntricos grandes que no son sencillos de distinguir.

Grupo C- pares 6 - 12; cromosomas submetacéntricos de talla mediana que son difíciles de distinguir; en este grupo se encuentra el cromosoma X. El ISCN los considera cromosomas metacéntricos.

Grupo D- pares 13 - 15; cromosomas acrocéntricos de talla mediana.

Grupo E- pares 16 - 18; cromosomas relativamente pequeños; el 16 es metacéntrico, mientras que los dos pares restantes (17, 18), son submetacéntricos.

Grupo F- pares 19 - 20; cromosomas metacéntricos pequeños.

Grupo G- pares 21 - 22; cromosomas metacéntricos pequeños. En este grupo se encuentra el cromosoma Y.

Polimorfismos cromosómicos

Años antes de que se desarrollaran las técnicas de bandas, se conocían ya variaciones en la morfología de algunos segmentos cromosómicos. A estas variaciones, que no necesariamente causan alguna patología específica o variación fenotípica, se les denomina polimorfismos. Este término se utilizó por primera vez en 1940 para designar a una variante genética que ocurre en una población con una frecuencia mayor de lo que se esperaría por la tasa de mutaciones recurrentes (Salamanca, 1990; Meléndez, 1991). Los polimorfismos pueden manifestarse en términos de tamaño, frecuencia de satélites, constricciones secundarias e incluso hacerse evidentes mediante algunas técnicas de

constricciones secundarias e incluso hacerse evidentes mediante algunas técnicas de bandeo. El término heteromorfismo se utiliza para describir las desviaciones de la morfología de un cromosoma normal (Conferencia de París, 1971 y 1972), y la utilización, tanto de este término como el de polimorfismo, varía de acuerdo con los investigadores. Algunos de los polimorfismos más importantes son: tamaño -por ejemplo en el segmento heterocromático de los brazos largos del cromosoma Y - ; satélites; constricciones secundarias y aquellos que sólo son evidentes al aplicarse técnicas de tinción en bandas.

Antes del desarrollo de las técnicas de bandeo, se reconocían ya cromosomas homólogos de humanos que exhibían diferencias morfológicas consistentes. Hoy en día, con el apoyo de las metodologías de tinción y bandeo, la capacidad de identificación de alteraciones cromosómicas -estructurales o numéricas- ha aumentado. Los polimorfismos cromosómicos ocurren principalmente en la heterocromatina constitutiva y ésta, a su vez, está constituida, como ya se ha mencionado, por miles y hasta millones de secuencias de DNA satélite y DNA altamente repetitivo.

Técnicas de bandeo

Salamanca (1990), define las bandas como pequeños segmentos de un cromosoma que aparecen como una secuencia de porciones que pueden ser claras y oscuras o fluorescentes y no fluorescentes y que se observan a lo largo del cromosoma con determinados procedimientos de tinción. Las bandas reflejan segmentos de cromatina en distintos grados de condensación y/o con composición de bases diferentes. Las isocoras,

composiciones características de guanina y citosina (Bernardi *et al.*, 1985) y tal vez corresponden a las bandas de alta resolución (Yunis y Yasmineh, 1971). La aplicación de las técnicas de bandeo ha probado ser de gran utilidad en la localización de polimorfismos cromosómicos en seres humanos. La tinción de bandas se emplea ampliamente para diagnósticos citogenéticos (Cervantes, 1983; Luperini, 1985; Meléndez, 1991). Con los cetáceos, el bandeo se ha utilizado principalmente para caracterizar el cariotipo de las distintas familias de este orden (Arnason, 1974), y como criterio taxonómico (Medrano, 1987; Medrano *et al.*, 1993), para conocer la dinámica de la evolución del genoma del orden (Arnason, 1974), y también para identificar diferencias poblacionales como en el caso de la ballena jorobada, *Megaptera novaeangliae* (Lambertsen y Duffield, 1987) y de los delfines del género *Stenella* (Stock, 1981).

Caspersson *et al.* (1968), fueron los primeros en mostrar que al tratar los cromosomas con un agente fluorocromico y observarlos después bajo el microscopio de fluorescencia, aparecían bandas con un patrón específico de porciones fluorescentes y no fluorescentes o claras y oscuras. A las secuencias obtenidas les llamó bandas Q. Las técnicas de bandeo más utilizadas para detectar polimorfismos cromosómicos son las de bandas QFQ y bandas CBG, aunque las tinciones para bandas GTG, bandas R, y la tinción con plata para la localización de las regiones de organización nucleolar (NOR'S) de los cromosomas acrocéntricos son también empleadas con frecuencia. Cada una de estas técnicas revela un polimorfismo determinado en una zona de un cromosoma determinado:

Las bandas -QFQ se emplean en la identificación de cromosomas y en el estudio de heteromorfismos asociados a los cromosomas 3 y 4, cromosomas acrocéntricos y la porción distal de los brazos largos del cromosoma humano Y. Algunos de estos heteromorfismos se utilizan como marcadores cromosómicos para determinar el origen de los cromosomas adicionales en trisomías y en estudios de paternidad (Verma y Babu, 1989).

Las bandas -GTG, son las de mayor aplicación y localizan también heteromorfismos en el nivel de heterocromatina intercalar; se emplean en evaluaciones de los cromosomas humanos 1 y 16 en análisis de rutina en laboratorios.

Bandas -RBG, -"Reverse bands"-, definidas por algunos autores como "un negativo de las bandas -G" (Lambertsen y Duffield, 1987), presentan una mejor tinción de regiones teloméricas que no se pueden apreciar en forma independiente con las bandas -Q y -G.

Técnicas de bandeado selectivas

N.O.R. Las regiones de organización nucleolar son zonas cromosómicas específicas que forman y mantienen el nucleolo en interfase. Consisten en múltiples copias de secuencias de DNA. La técnica NOR se emplea en la identificación del origen paterno y el estado de no disyunción en la trisomía de cromosomas acrocéntricos humanos. También se utiliza para la determinación de los puntos específicos en translocación robertsoniana y recíproca que involucra a los cromosomas acrocéntricos.

G-II. Localiza polimorfismos e inversiones pericéntricas en el cromosoma humano

9. Es de amplia aplicación en el mapeo genético y en la identificación simultánea de replicación de cromátides humanas.

C D. Técnica empleada para estudios de cinetocoros o puntos centroméricos de los cuales obtiene el nombre ("Centromeric Dot- bands"). También se aplica en el estudio de cromosomas dicéntricos, para entender la naturaleza de ambas regiones centroméricas.(Verma y Babu, 1989).

Bandas CBG -Bandas con hidróxido de bario y Giemsa- (ISCN, 1985). La aplicación de esta técnica produce una tinción selectiva de la heterocromatina constitutiva. Estas bandas se localizan principalmente en las regiones pericentroméricas de los cromosomas humanos 1, 9 y 16. De ahí que reciban el nombre de bandas -C. También se hacen evidentes en la porción distal del brazo largo del cromosoma Y. Las bandas CBG , son básicamente producto de la extracción selectiva del DNA de las regiones C- negativas por la permanencia de más DNA en las áreas de heterocromatina constitutiva. Los heteromorfismos cromosómicos que se ven con esta técnica se encuentran principalmente en las regiones pericentroméricas de los cromosomas y se clasifican de acuerdo con su tamaño -longitud y área- (Verma y Babu, 1989).

Según diversos autores, la función principal de la heterocromatina constitutiva es la regulación de la actividad de los genes, puesto que los segmentos cromosómicos que la contienen son inactivados. Existen hipótesis que proponen diversos atributos de la heterocromatina constitutiva; están, entre otras: sin una función definida (Doolittle, 1982); mantenimiento cromosómico, posible responsable de la formación de barreras de fertilidad y de la especiación (Wilson *et al.*, 1974, 1975; Hsu, 1975; Yunis y Yasmineli, 1979; Flavell, 1982; Miklós, 1982). Se ha observado que la heterocromatina constitutiva promueve el cambio de los cariotipos generando variación genética, requisito indispensable para los procesos de divergencia genética en las poblaciones naturales (Baker *et al.*, 1987b). De hecho, Wilson *et al.* (1974 y 1975) y Bush *et al.* (1977) propusieron una base teórica para entender las relaciones entre los cambios genéticos y los procesos de divergencia cuyos resultados se reflejan en la morfología de los mamíferos. Estos cambios genéticos ocasionados por alteraciones cromosómicas bien pueden ser las mutaciones pequeñas con las que Ayala (1978) explica porqué la evolución de los vertebrados se ha dado a una mayor velocidad de la que se puede generar únicamente por mutaciones.

Las funciones arriba mencionadas se basan en evidencias circunstanciales; sin embargo, estas hipótesis explican de alguna manera porqué los genotipos de eucariontes contienen tan grande cantidad de DNA altamente repetitivo.

En los cetáceos, los polimorfismos cromosómicos se han analizado para proponer modelos de especiación y evolución de los cetáceos (Amason, 1972; Jarrel, 1984), así como para realizar estudios poblacionales (Stock, 1981; Lambertsen y Duffield, 1987).

más adecuadas entre las alteraciones cromosómicas y los cuadros clínicos con los que se asocian. Los polimorfismos cromosómicos son de gran utilidad para conocer el origen paterno o materno de las anomalías cromosómicas, también tienen una amplia aplicación en estudios clínicos, como los mecanismos de producción de triploidía, la localización de genes deficientes en el genoma humano, la identificación de sitios dentro del cromosoma responsables de enfermedades humanas, y, además, se emplean en medicina forense; incluso pueden utilizarse como marcadores para estudios poblacionales (Cervantes, 1983; Luperini, 1985; Meléndez, 1991).

Citogenética de los cetáceos

Los análisis genéticos sobre cetáceos se iniciaron con la descripción de los cariotipos y la determinación del sexo a partir de éstos. Más adelante, se estudiaron las relaciones genéticas entre los cetáceos a partir del estudio de proteínas heredadas, polimorfismos cromosómicos y DNA. La determinación de las relaciones entre las familias y las poblaciones entre los cetáceos lleva a un mejor entendimiento sobre los sistemas de apareamiento, la identificación de el (los) grupo (s) y de los tamaños efectivos de poblaciones (Mathews *et al.*, 1988; Cohn, 1990; Medrano, 1993).

El primer informe de un cariotipo de cetáceos corresponde a Makino (1948) con el estudio de los cromosomas de la marsopa de Dall (*Phocoenoides dallii*). Antes de este trabajo, con excepción del informe de Starke, (1928 citado en Makino, 1948) sobre el cariotipo de el lobo fino del norte (*Callorhynchus ursinus*), no se tenía información alguna sobre los cromosomas de ningún mamífero marino.

El objetivo del trabajo de Makino fue conocer las variaciones en el cariotipo que existen entre los cetáceos y otros grupos afines de mamíferos. Con preparaciones directas de células germinales este investigador, obtuvo un número diploide $2n = 44$. Makino realizó el análisis de cromosomas basándose en la comparación de formas y tamaños característicos directamente bajo el microscopio. El ordenamiento de los cromosomas fue de manera decreciente de talla, y a los 2 que no pudo aparear con su homólogo los denominó como X y Y. Con estos resultados, Makino procedió a discutir la filogenia de los cetáceos. En esos años se discutía si el origen de los cetáceos era a partir de carnívoros

o de ungulados y se proponía un origen a partir de los primeros por ciertas similitudes anatómicas. Makino fue el primero en utilizar la evidencia citológica como una herramienta en la filogenia de los cetáceos y propuso que las similitudes y las diferencias de la constitución de los cromosomas pueden indicar la relación taxonómica entre organismos de un distinto orden.

Con base en sus trabajos anteriores (Makino, 1944; Oguma y Makino, 1946), este autor comparó los cariotipos de cetáceos con los de 12 órdenes de carnívoros y reportó que es prácticamente imposible indicar similitudes entre ambos. Y, al comparar el cariotipo de *P. dalli* con el de *Sus scrofa*, reportó que "pese a la diferencia hallada entre sus números diploides, existe una gran similitud en las características generales: los primeros 4 pares de cromosomas son muy parecidos y la morfología de los cromosomas sexuales es también muy similar". Con estos resultados, Makino concluyó que existe evidencia suficiente para indicar que la marsopa, *P. dalli*, como representante de los cetáceos, está relacionada con los ungulados.

Walen y Madin (1965) realizaron el primer estudio citogenético de cetáceos empleando técnicas de cultivo de tejidos basados en los trabajos de Hsu y Pomerat (1953) y Madin *et al.* (1957) y utilizando células de riñón de dos especies de la familia Delphinidae: el tursión, *Tursiops truncatus* y el calderón negro, *Globicephala scammonii*. A partir de este estudio se obtuvieron los cariotipos de ambas especies, y se reportó un número diploide $2n = 44$, confirmando así las observaciones de Makino (1948) en la marsopa de Dall. Con estos resultados concluyeron que las similitudes entre los cariotipos de las dos

especies de delfínidos son muy marcadas y que existe una estrecha relación evolutiva entre ambas especies.

El primer criterio para clasificar a los cromosomas de los cetáceos se basaba en la posición del centrómero (Conferencia París, 1971). Makino (1948), por ejemplo, dividió a los cromosomas en:

- 4 pares grandes subterminales, 2 pares con forma de V,
- 15 pares pequeños que denomina como subterminales, y, de acuerdo con su trabajo, el cromosoma X es grande y el Y, pequeño.

Walen y Madin (1965), por su parte, clasificaron a los cromosomas en tres categorías:

- cromosomas grandes con centrómeros subterminales en donde agruparon a los primeros 3 pares;
- 15 pares con centrómeros medios o submedios que reducen su talla gradualmente
- 4 pares de cromosomas acrocéntricos.

De acuerdo con estos autores, sólo el par número 9 es verdaderamente metacéntrico (en ambas especies).

Ámason (1969, 1972, 1974, 1981, 1985); Ámason *et al.* (1977); Ámason y Benirschke (1973) realizaron una caracterización sistemática del cariotipo de los cetáceos. Estandarizaron la clasificación de los cromosomas basándose en el trabajo de Levan *et al.* (1964), que consiste en una propuesta para clasificar los cromosomas a partir del **índice de brazo**, una relación entre la longitud relativa de los brazos largos y cortos de un cromosoma y su centrómero. Con base en este criterio, los cromosomas se clasifican de la siguiente manera:

Índice de brazo	Cromosomas
1.0-1.7	metacéntricos
1.7-3.0	submetacéntricos
3.0-7.0	subtelocéntricos
7.0- ∞	telocéntricos

Los autores complementaron dicha caracterización con ideogramas de los cariotipos de algunas de las especies analizadas en sus trabajos (Ámason, 1969 y 1974; Ámason y Benirschke, 1973; Ámason *et al.*, 1977).

El cariotipo de los cetáceos está muy conservado. El número diploide de los cromosomas en la mayoría de las especies del orden es $2n = 44$. Las familias *Physeteridae*, *Ziphiidae* y *Balaenidae* tienen cariotipos de 42 cromosomas (Ámason y Benirschke, 1973; Ámason, 1974; Jarrel, 1979; Ámason, 1981). Una característica notable es la gran uniformidad que está presente en el cariotipo general entre las especies, que contrasta con las variantes existentes entre los individuos de una misma especie.

De acuerdo con Arnason (1972) y Arnason *et al.* (1985), la estabilidad en el cariotipo de los cetáceos puede deberse a lo siguiente :

- Estos animales tienen una baja tasa de reproducción, puesto que tardan en alcanzar la madurez sexual y no tienen más de una cría al año.
- Los animales tienen una gran facilidad para desplazarse en un medio que no tiene barreras geográficas definidas.
- La organización social de estos mamíferos es en grandes grupos, por consiguiente no existe endogamia ni la posibilidad de fijación de una variante cromosómica.

El patrón general del cariotipo de cetáceos presenta las siguientes características (Arnason, 1972 y 1974):

- Los grupos de cromosomas metacéntricos y submetacéntricos contienen juntos 14 pares de cromosomas en que el par más pequeño posee un satélite (en algunas especies, este par queda en el grupo de cromosomas telocéntricos).
- Los tres pares más largos del cariotipo están en el grupo de los cromosomas subtelocéntricos (Arnason, 1972).

El cuadro 1 resume el cariotipo de algunas especies consideradas como representativas de las familias estudiadas. El patrón general del cariotipo de estos grupos de cetáceos es como sigue:

Misticetos:

- 4 cromosomas telocéntricos
- 3 cromosomas submetacéntricos que contienen al cromosoma X en *Balaenoptera physalus* y al cromosoma Y en *B. acutorostrata*.
- 5-7 pares submetacéntricos
- 7-9 pares metacéntricos pequeños que contienen al cromosoma X en *Eschrichtius robustus*, *Balaenoptera acutorostrata*, *B. borealis*, y al cromosoma Y en *B. borealis* y en *B. physalus*.

(Árnason, 1969; Figura 2)

Odontocetos:

- 4 cromosomas telocéntricos, excepto en *Physeter catodon* y *Kogia breviceps*.
- 2-3 cromosomas subtelocéntricos que contienen al cromosoma Y en *P. catodon*.
- 8-9 cromosomas submetacéntricos que contienen al cromosoma X en *Globicephala macrorhynca*.
- 6-7 cromosomas metacéntricos que contienen al cromosoma X en *Stenella dubia*, *Tursiops gilly*, *Delphinus delphis*, *Phocoena phocoena*, *P. catodon*, *K. breviceps* y al cromosoma Y en *K. breviceps*.

(Árnason, 1974 y 1980; Árnason y Benirschke, 1973; Figura 5).

**CUADRO 1. CARACTERÍSTICAS DE LOS CARIOTIPOS DE ALGUNAS
ESPECIES DE CETACEOS**

ESPECIES	2n	t	st	sm	m	X	Y
<i>Balaenoptera physalus</i> (1)	44	4	3	6	8	st1	st1
<i>Balaena mysticetus</i> (2)	42	3	3	5	9	m2	m2
<i>Stenella dubia</i> (3)	44	4	2	9	6	t3	t3
<i>Physeter catodon</i> (4)	42	1	-	9	10	m5	m5
<i>Kogia breviceps</i> (4)	42	3	-	3	14	st6	-
<i>Orcinus orca</i> (5)	44	4*	2	9	5	-	st7
<i>Mesoplodon carlhubbsi</i> (6)	42	-	3	3	14	st6	-

1. Ámason, 1969; Figura 2.
2. Jarrel, 1979; Figura 3.
3. Ámason, 1974; Figura 5.
4. Ámason y Benirschke, 1973; Figura 6.
5. Ámason *et al.*, 1980; Figura 4.
6. Ámason *et al.*, 1977; Figura 7.

Donde: **2n** número diploide
 t cromosomas telocéntricos
 st cromosomas subtelocéntricos
 sm cromosomas submetacéntricos
 m cromosomas metacéntricos
 X cromosoma sexual
 Y cromosoma sexual
 ***** grupo hipotético de cromosomas telocéntricos

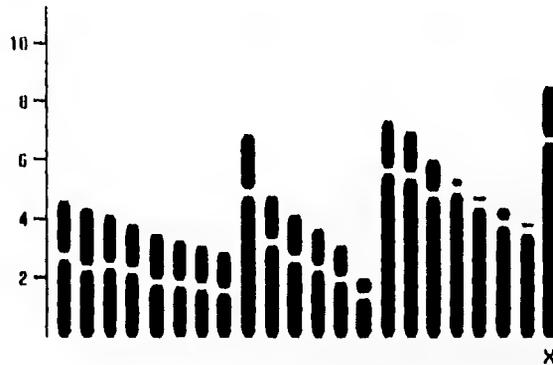


Figura 2. Ideograma de *Balaeoptera physalis* (Arnason, 1969). Se indica el cromosoma X. La escala de tamaño corresponde al porcentaje con referencia al tamaño de todo el conjunto complementario, es decir, la suma del tamaño de todos los cromosomas es 100%.

Una característica del cariotipo de los cetáceos, tanto de los misticetos como de los odontocetos, es la marcada conservación presente en los cariotipos de todas las especies del orden. Existen excepciones, como los balénidos, los fiseteroideos, y los zifioideos, que tienen cariotipos de 42 cromosomas. El cariotipo de los fiseteroideos carece de cromosomas telocéntricos y la localización de las regiones de organización nucleolar está en distintos cromosomas: en *P. catodon* se encuentra en el cromosoma m2, mientras que en *K. Breviceps*, se localiza en el sm8 (Arnason y Benirschke, 1973). Esto puede significar que estos cromosomas sean homólogos teniendo una apariencia diferente.

El cariotipo de los balénidos tiene 42 cromosomas, carece de uno de los 4 pares de cromosomas telocéntricos y los cromosomas sexuales son metacéntricos grandes. Sin embargo, este cariotipo se puede asociar fácilmente con el patrón general de los misticetos (Jarrel, 1979). Los zifioideos poseen un número diploide $2n = 42$, su cariotipo no es muy

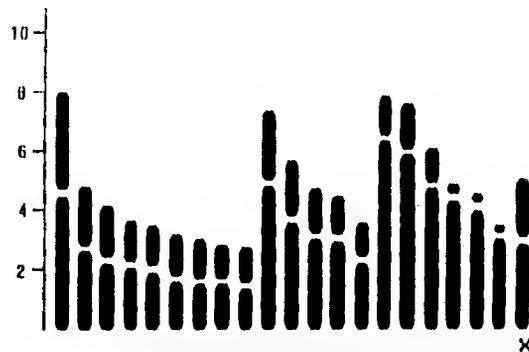


Figura 3. Ideograma de *Baleena mysticetus* (Jared, 1979).

parecido al patrón general de cetáceos, pero pueden hacerse asociaciones. El cariotipo de esta familia se comparó con el de los fiseteroideos, que también tiene un número $2n = 42$ sin lograr encontrar alguna relación entre ambas (Ámason *et al.*, 1977).

La orca (*Orcinus orca*) posee un número diploide $2n = 44$, que concuerda el número de la mayoría de las especies estudiadas, pero el cariotipo difiere marcadamente del patrón general de las demás especies. El cariotipo de las orcas carece de los 4 cromosomas telocéntricos, característica de los cromosomas de los cetáceos, además presenta una gran acumulación de heterocromatina constitutiva.

La comparación de este cariotipo con el de *Stenella clymene* y el de *Tursiops truncatus* mediante la tinción en bandas -G indicó que existen similitudes entre ellos; sin embargo, el análisis con las bandas -C demostró, por una parte, que este cariotipo difiere marcadamente tanto del patrón de misticetos como de el de odóntocetos, y por la otra,

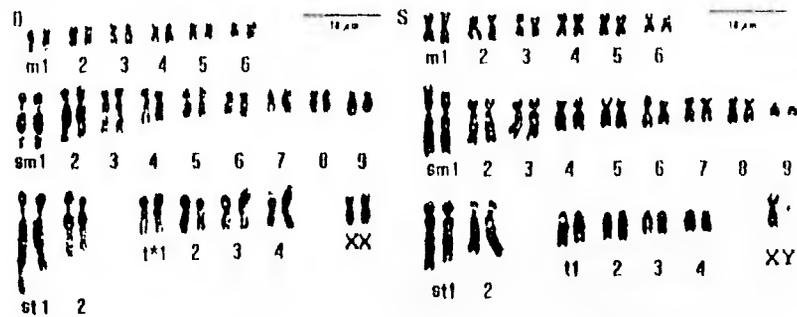


Figura 4. Cariotipos en bandas -C de la orca, *Orcinus orca* (O) y, en bandas -G del delfín moteado, *Stenella chymene* (S). Las diferencias entre los cariotipos de estas especies son evidentes, principalmente en los cromosomas telocéntricos. En el cariotipo de la orca este grupo se indica con * puesto que este grupo es artificial (Ámason *et al.*, 1980).

que estas diferencias se deben a la acumulación de heterocromatina constitutiva. Es de hecho la acumulación de ésta la que enmascara a los cromosomas telocéntricos. Con el análisis de los resultados se realizó la construcción de un grupo hipotético de cromosomas telocéntricos, con el que se comprobó que existe similitud entre el cariotipo de la orca y el de *Stenella chymene*. El cariotipo y el ideograma de esta última especie, son los que Ámason (1974) y Ámason *et al.* (1980) utilizaron como referencia para comparar los cariotipos de las especies de cetáceos analizadas. El cariotipo de la orca tiene dos regiones de organización nucleolar mientras que en el patrón general de los cetáceos sólo existe una región. Estas diferencias, consideradas como características secundarias, sirvieron para que se propusiera que *Orcinus orca* representa una radiación temprana del cariotipo de los delfínidos, $2n = 44$ (Ámason *et al.*, 1980; Figura 4).



Figura 5. Ideograma de *Stenella clymene* (Árnason, 1974).

Pese a dichas diferencias, los estudios realizados indican que existe una gran similitud entre los cariotipos de los cetáceos (Árnason, 1974; Duffield *et al.*, 1971), dicha similitud sirvió para que Árnason (1974) y Duffield *et al.* (1971) propusieran un origen monofilético para ambos subórdenes. Esta propuesta se reforzó por las homologías halladas en fragmentos de DNA-sat (Árnason *et al.*, 1978; Árnason, 1982; Árnason y Widegren, 1984a), y por aquellas de los cariotipos bandeados de diversas especies (*Mesoplodon europaeus*, *M. carlhubbsi*, *Balaenoptera acutorostrata*, Árnason *et al.*, 1977; *Orcinus orca*, Árnason *et al.*, 1980; *Stenella clymene*, *Lagenorhynchus albirostris*, *Phocoena phocoena*, Árnason, 1980; *Eschrichtius robustus*, *Physeter catodon*, Árnason, 1981; *Balaenoptera musculus*, Árnason *et al.*, 1985).

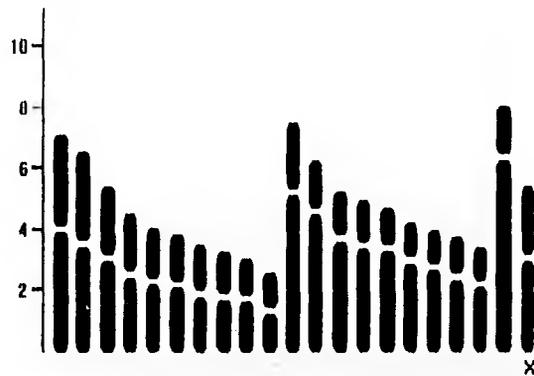


Figura 6. Ideograma de *Physeter catodon* (Árnason y Benirschke, 1973).

En los cariotipos de los balénidos, fiseteroideos y zifioideos, hay una fusión de cromosomas, y las diferencias entre los cariotipos de éstos y el de la orca no se deben a rearrreglos cromosómicos, cambios en los genes estructurales o en la composición de los DNA-sat, sino a la acumulación diferencial de heterocromatina constitutiva (Árnason, 1974; Jarrel, 1984). Este tipo de cromatina constituye un 25-30% de la longitud total en el cariotipo de misticetos y un 10-15% en el cariotipo de odontocetos (Árnason, 1974), está presente en grandes bloques y se localiza en las regiones intersticiales y teloméricas de los cromosomas (Árnason, 1974; Stock, 1981) y se hace evidente con la técnica de bandas -C. Con el bandeo en -G, los cariotipos de los cetáceos son muy similares, (Árnason, 1974; Stock, 1981). La evidencia morfológica de la acumulación de heterocromatina y el patrón tan específico de distribución presente en el cariotipo de los odontocetos y misticetos se ha interpretado como una evidencia del origen monofilético de los cetáceos (Árnason, 1974).

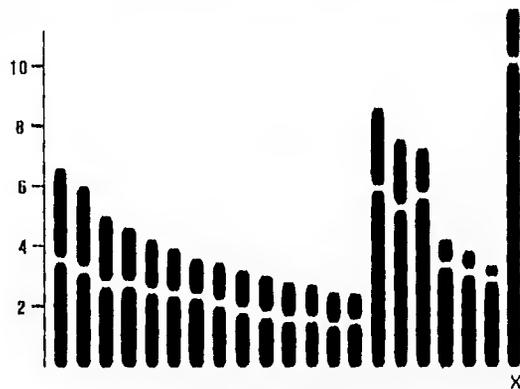


Figura 7. Ideograma de *Mesoplodon europaeus* (Ámason et al., 1977).

Los polimorfismos cromosómicos en los cetáceos están formados por variaciones continuas en la cantidad de heterocromatina constitutiva que se presenta en sitios específicos de los cromosomas. Se ha sugerido también que la distribución tan característica de la misma que hay entre los cariotipos de odontocetos impide la recombinación meiótica (Ámason, 1974), permite el rearrreglo cromosómico (Stock, 1981) y promueve eventos de aislamiento reproductivo (Jarrel y Ámason, 1981; Stock, 1981; Jarrel, 1984).

El análisis de estos polimorfismos ha sugerido mecanismos de aislamiento y evolución de los cetáceos (Jarrel, 1984), y se ha utilizado en estudios poblacionales: Stock (1981), evaluó la posibilidad de utilizar a los polimorfismos dentro del análisis de las relaciones poblacionales en el género *Stenella*; sus resultados aunque positivos requieren, de acuerdo con este autor, una mayor aplicación en distintas poblaciones y especies de

cetáceos. Lambertsen y Duffield (1987), por su parte, utilizaron el estudio de polimorfismos para analizar la variabilidad intraespecífica en el cariotipo de la ballena jorobada, *M. novaeangliae*, encontrando 11 regiones heteromórficas con las cuales evaluaron las variaciones en estas regiones entre los individuos y las poblaciones de estos mysticetos. Los resultados obtenidos muestran que la extensión de esta variación en una muestra pequeña no indica que las poblaciones estudiadas de ballenas jorobadas presenten endogamia excesiva. La validez estadística de sus datos es limitada puesto que la muestra no fue significativa. Estos resultados sientan las bases de una metodología que es aplicable al análisis de poblaciones de cetáceos de otras áreas.

La conservación del cariotipo de los cetáceos permite la existencia de híbridos que se han registrado tanto en vida libre como en cautiverio. Algunos ejemplos son las cruces entre el delfín nariz de botella, *Tursiops truncatus* y el delfín de Risso, *Grampus griseus* y entre *T. truncatus* y la orca falsa *Pseudorca crassidens* (Leatherwood y Reeves, 1983). Se han encontrado incluso híbridos fértiles en vida libre, como es el caso de los individuos resultantes de la cruce entre los rorcuales *Balaenoptera musculus* y *B. physalus* (Amason *et al.*, 1991). Este tipo de individuos genera problemas en la identidad de las especies y en el conocimiento de los mecanismos de aislamiento reproductivo y plantea la posibilidad de que muchos problemas taxonómicos entre los cetáceos derivan de procesos de hibridación (Gaskin, 1982).

Estudios citogenéticos en los cetáceos.

La estructura y la dinámica de una población animal pueden describirse de distintas maneras, dependiendo del grado de refinamiento de las técnicas que se apliquen a la población en cuestión. Gran parte de los estudios aplicados a las poblaciones de los cetáceos se han basado en estudios observacionales, muchos de los cuales son de largo plazo (Wells y Scott, 1990; Miyashita *et al.*, 1990). De éstos se ha obtenido información sobre la estructura de poblaciones de cetáceos como la edad, el sexo (inferido por observaciones de conducta), relaciones madre-cría y de parentesco entre los individuos de una población dada (Duffield y Wells, 1991). Sin embargo, este tipo de estudios están limitados porque en muchos de los casos no se tiene la certeza del sexo del animal puesto que la mayor parte de las especies de cetáceos carecen de caracteres morfológicos externos que indiquen un dimorfismo sexual. Con excepción de las hembras de algunas especies de misticetos, que son de mayor talla que los machos, la diferenciación sexual entre estos animales es difícil de identificar puesto que, para ello, se requiere de una observación de la región genital, inspección difícil de realizar en estos animales. Este tipo de dificultades han hecho necesario emplear técnicas de cultivo de tejidos para la identificación del sexo de los cetáceos de vida libre (Medway, 1983; Baker *et al.*, 1987a; Lambertsen *et al.*, 1988), así como métodos moleculares para obtener información de la composición de poblaciones de estos animales (Baker *et al.*, 1991; Palsbøll *et al.*, 1992). Para cualquier análisis genético poblacional, se requieren muestras de tejidos de animales en vida libre.

Métodos de recolecta y procesamiento de tejidos de piel de cetáceos en vida libre.
Biopsias

La utilización de un dardo para obtener biopsias de la piel de cetáceos en vida libre se propuso y efectuó por primera vez por Winn *et al.* (1973) en un estudio sobre la identificación del sexo de las ballenas jorobadas mediante la identificación del corpúsculo de Barr, un segmento de cromatina sexual condensada unido a la membrana nuclear y presente en las células epidérmicas de hembras de distintas especies. Estudios posteriores demostraron que este criterio no es seguro para identificar el sexo de los animales (Lambertsen y Duffield, 1987).

Por definición, una biopsia es un trozo de tejido extraído de un animal vivo para análisis diversos. Se han obtenido biopsias de numerosas especies terrestres, de cetáceos en cautiverio y también de vida libre (Medway, 1983; Ámason *et al.*, 1985; Lambertsen y Duffield, 1987; Lambertsen *et al.*, 1988; Rulz, 1988; Brown *et al.* 1991; Weinrich *et al.*, 1991; Palsbøll *et al.*, 1991; Clapham y Matilla, 1993; Medrano *et al.*, 1996). La toma de la muestra se puede realizar en casi todos los órganos. La selección del órgano está en función del diagnóstico a realizar. Las biopsias pueden ser incisionales (obtenidas con tijeras o bisturíes), por succión o por punción; en los cetáceos la mayor parte de las biopsias obtenidas de animales en vida libre, ha sido obtenida mediante punciones (Medway, 1983).

Equipo para la toma de biopsias

Los instrumentos empleados en los laboratorios para la toma de biopsias están diseñados para la remoción de una parte del tejido a distintas profundidades y distintos diámetros. Éstos pueden ser bisturís, agujas o sacabocados. Este último es empleado con más frecuencia en la toma de biopsias de piel. El diámetro de la muestra varía según la cantidad de tejido que se requiera para el estudio. Gracias a que los extremos del sacabocados son filosos, para obtener una muestra en el laboratorio, se aplica el instrumento sobre la piel y se gira presionando sobre la misma hasta obtener el trozo deseado. Por lo general, la profundidad de la biopsia está definida por los extremos externos y el tope interno del instrumento. La toma de la muestra puede realizarse con o sin anestesia local, y su tamaño siempre dependerá de la cantidad de tejido requerida, del método de colecta y del tipo de estudio que se va a realizar.

El instrumento para la toma de biopsias de cetáceos en vida libre es un dardo con una punta modificada en forma de sacabocados que se coloca en el extremo de una flecha que puede ser disparada mediante un rifle (Winn *et al.*, 1973), un arpón de fusil neumático (Aguilar y Nadal, 1984), o una ballesta (Lambertsen, 1987; Hoelzel y Dover, 1988; Lambertsen y Duffield, 1987; Lambertsen *et al.*, 1988; Rutz, 1988; Medrano, 1993; Medrano *et al.*, 1996; Figura 8). Las ballestas empleadas tienen un empuje que varía normalmente entre 23 y 69 kg. El sistema más utilizado lleva una flecha con la punta modificada con un dardo para la toma de la biopsia y un flotador para recuperarse una vez tomada la muestra (Mathews *et al.*, 1988; Palsbøll *et al.*, 1991; Medrano, 1993;

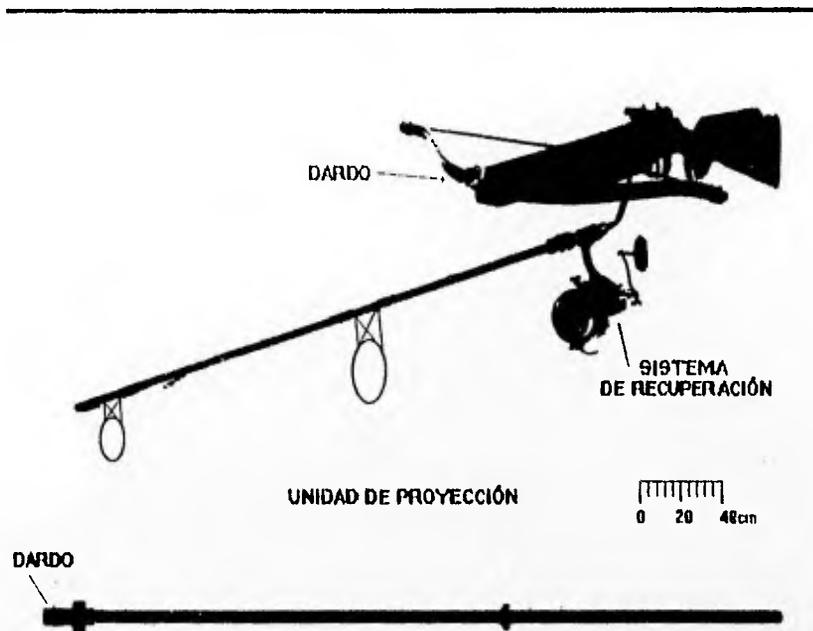


Figura 8. Esquema que ilustra el sistema de muestreo de piel de cétáceos de vida libre empleado por Lambertsen (1987). Se aprecia el mecanismo de recuperación de las flechas consistente en una línea de nylon.

Medrano *et al.*, 1996). Las puntas de las flechas son cilindros de acero inoxidable con un borde filoso y un tope que lo hace rebotar y evita que la flecha se encaje en la piel. La muestra se retiene en el interior mediante distintos dispositivos, como tres dientes insertos en la pared del cilindro y orientados hacia el centro, (Winn *et al.*, 1973; Medway, 1983; Lambertsen, 1987; Palsbøll *et al.*, 1991; Figuras 9 y 10), o un anzuelo inserto en la base de la punta en el interior del cilindro (Weinrich *et al.*, 1991; Figura 11).

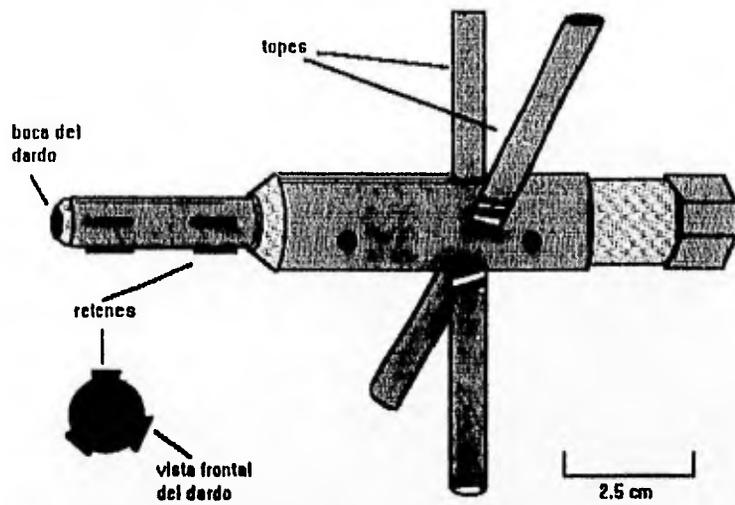


Figura 9. Diseño del dardo empleado por Winn *et al.* (1973). Se aprecia el mecanismo de retención de la muestra.

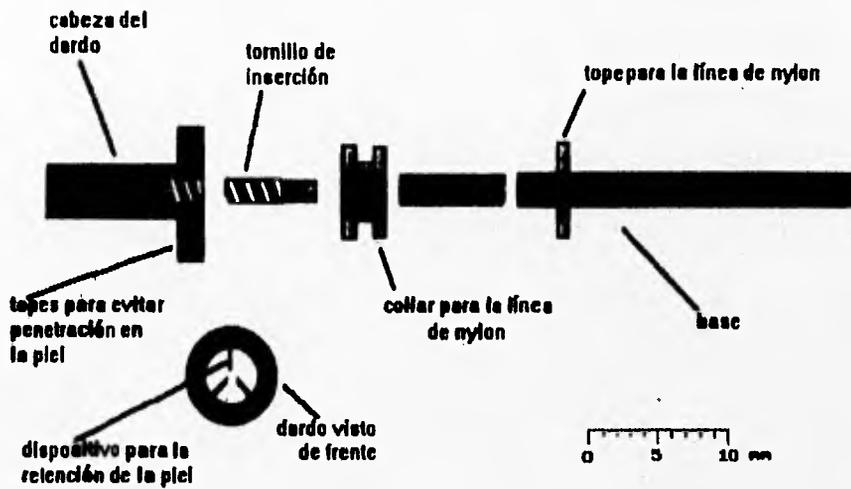


Figura 10. Diseño del dardo empleado por Lambertsen (1987). Se aprecia el dispositivo de retención de la muestra.

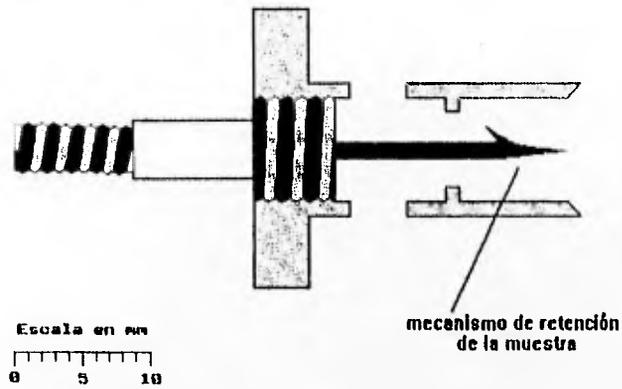


Figura 11. Diseño del dardo para la toma de biopsias de piel reportado por Wehrich *et al.* (1991). Se aprecia el mecanismo para la retención de la muestra

Las puntas, que se insertan a la flecha mediante un tornillo, tienen uno o dos orificios que permiten al aire desplazarse por el interior del cilindro mientras éste penetra en la piel. Entre los factores que afectan la eficiencia en la colecta de muestras de piel, se encuentran:

- a. el tamaño y el diseño del dardo
- b. la potencia del disparo
- c. la recuperación de la flecha
- d. la distancia y la orientación del disparo
- e. el tamaño de la biopsia y su procesamiento
- f. la conducta de los animales

El tamaño del dardo y la potencia del disparo están en función de la proximidad y la talla de los animales. Los primeros modelos eran demasiado potentes, puesto que estaban diseñados para cubrir distancias mayores a los 20 m; Winn *et al.* (1973), por ejemplo, reportaron haber tenido éxito en tiros realizados a distancia; sin embargo, los disparos hacia los delfines tenían que realizarse cuando éstos estaban aproximadamente a 65 cm bajo el agua para amortiguar la potencia y no dañarlos. La recuperación del dardo, una vez tomada la muestra, se ha realizado mediante una línea de pesca que va unida a la flecha (Lambertsen, 1987; Lambertsen y Duffield, 1987; Lambertsen *et al.*, 1988; Ruiz, 1988; Figura 8), o mediante un flotador que mantenga el dardo fuera del agua (Mathews *et al.*, 1988; Medrano, 1993; Medrano *et al.*, 1996; Figuras 12 y 13).

La identificación de los animales es necesaria para mantener un registro de aquellos que son muestreados y establecer así un catálogo de fotografías, de biopsias y cariotipos. En el caso de la ballena jorobada, *M. novaeangliae*, los animales se identifican utilizando el método de Katona *et al.* (1979), con buenos resultados (Lambertsen y Duffield, 1987; Lambertsen *et al.*, 1988), aunque conjuntar este método y el de biopsias se dificulta cuando se encuentran grupos de más de 3 individuos. En este caso, es difícil identificar al animal muestreado a menos que éste tenga una característica muy evidente en la región dorsal, ya sean cicatrices o marcas, muescas o la forma de la aleta dorsal (Lambertsen *et al.*, 1988), puesto que la flecha se dispara cuando se ve esta región.

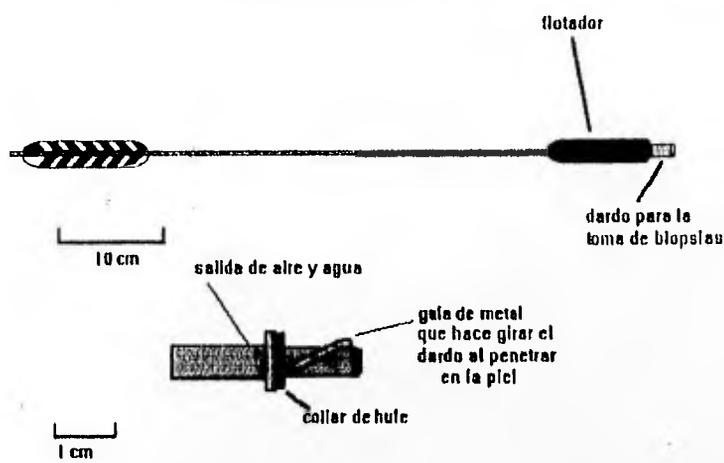


Figura 12. Dardo y flecha empleados por Mathews *et al.* (1988) se aprecia el flotador que ayuda en la recuperación de la flecha.

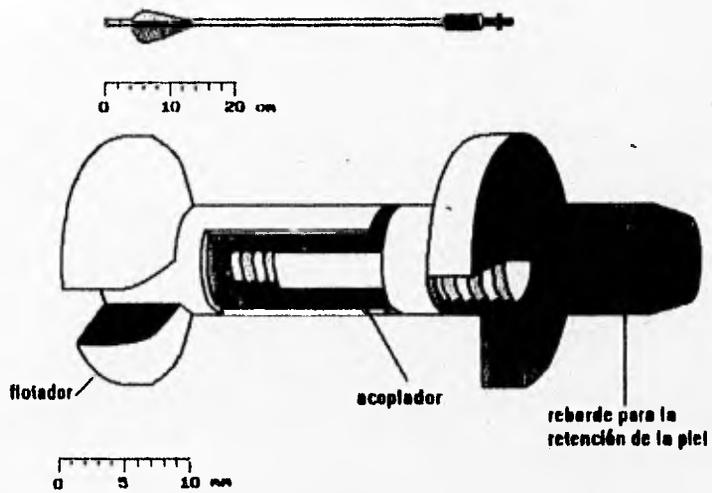


Figura 13. Flecha y dardo diseñados en la Facultad de Ciencias (Medrano, 1993). Se aprecian el flotador para la recuperación de la muestra y el mecanismo para la retención de la misma.

Se ha observado que no hay sangrado excesivo después de tomada la muestra (Medway, 1983), y que la reacción de los animales hacia este procedimiento es mínima (Medway, 1983; Lambertsen y Duffield, 1987; Brown *et al.*, 1991). De hecho, diversos estudios muestran que la proximidad de las embarcaciones afecta más la conducta de los animales que la toma de la muestra (Weinrich *et al.*, 1991; Clapham y Matilla, 1993; Medrano *et al.*, 1996).

Una vez obtenida la muestra, se retira del dardo, se limpia y se trata dependiendo del tipo de estudio que se vaya a realizar. La reacción de los animales hacia este procedimiento es leve y de efectos observables en un plazo menor a una hora (Medway, 1983; Lambertsen, 1987; Lambertsen y Duffield, 1987; Brown *et al.*, 1991; Weinrich *et al.*, 1991; Clapham y Matilla 1993; Medrano 1993; Medrano *et al.*, 1996). El tejido obtenido a partir de las biopsias tiene un gran número de aplicaciones: se emplean para estudios de histología, histoquímica, identificación del sexo por cultivo de fibroblastos y por análisis molecular (Medway, 1983; Mathews *et al.*, 1988; Palsbøll *et al.*, 1992; Medrano *et al.*, 1996), estudios de variabilidad molecular y citogenética (Lambertsen y Duffield, 1987; Lambertsen *et al.*, 1988; Baker *et al.*, 1993) y para determinar la incidencia de contaminantes organoclorados y metales pesados en las poblaciones de cetáceos (Taruski *et al.*, 1975).

La piel de los cetáceos

La piel de los cetáceos es muy especializada aunque sigue el patrón general de otros mamíferos. La piel tiene una textura suave, carece de glándulas externas y de pelo con la excepción de unas cuantas vibrisas táctiles presentes en el extremo terminal del rostro de algunos fetos y algunas especies de odontocetos (Simpson y Gardner, 1972). La epidermis mide de 2 a 4 mm de espesor en la mayoría de las especies, aunque se pueden hallar excepciones como la beluga (*Delphinapterus leucas*), cuya epidermis tiene un grosor de 10 mm. Esta capa varía según la región del cuerpo y cambia con la edad. La epidermis presenta proyecciones dérmicas alineadas de manera paralela, oblicua y, en algunos, casos perpendicular al eje de cuerpo. De los extremos de estas proyecciones se extienden papilas dérmicas que se interdigitan profundamente con la epidermis. La epidermis está bien innervada, especialmente en la región ventral (Palmer y Wedell, 1964). La dermis varía en grosor, la parte más gruesa es la ventral y la más delgada, la dorsal (Greenwood *et al.*, 1974; Ling, 1974; Figura 14).

Existe un desacuerdo general en lo que se refiere al número de estratos celulares y a sus nombres. Según Geraci *et al.* (1986), se reconocen 3 capas: el estrato basal o estrato germinativo, el estrato espinoso y el estrato externo. El estrato germinativo es una monocapa que contiene células epiteliales columnares y melanocitos en una proporción de 12:1. Las células epiteliales están unidas a la dermis mediante hemidesmosomas que están en la base de la membrana y, entre ellas, mediante desmosomas.

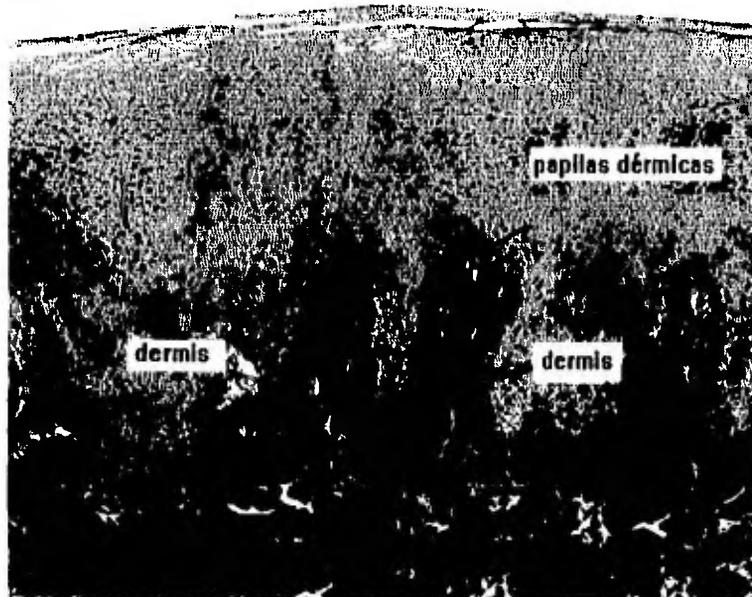


Figura 14. Corte de piel del delfín moleado, *Stenella attenuata*, teñido por la técnica de Masson. Se observan las fibras de colágena en color oscuro.

El citoplasma es similar al de las células germinales de mamíferos; con mitocondrias perinucleares, retículo endoplásmico, ribosomas libres, aparato de Golgi y grupos de tonofilamentos; el núcleo es oval con una red muy desarrollada de cromatina y presenta de uno a tres nucleólos (Harrison y Thurley, 1974; Hicks *et al.*, 1985).

El siguiente estrato es también motivo de cierta controversia, algunos autores como Palmer y Wedell (1964), lo denominan estrato córneo por una escasa queratinización que es difícil de observar. Otros, como Harrison y Thurley (1974), argumentan que dicha queratinización no es completa y lo denominan estrato externo. El grosor de esta capa varía

con la edad y con la especie. Las células son paraqueratóticas y, aún cuando están vivas, existen estudios que indican que son células viejas (Geraci *et al.*, 1986).

Una característica importante de la piel de los cetáceos es la alta tasa mitótica de la epidermis: la piel se reemplaza rápidamente y descama con mucho mayor velocidad y actividad que en otros mamíferos (Palmer y Wedell, 1964; Geraci *et al.*, 1986). En *Tursiops truncatus* por ejemplo, se ha calculado que la epidermis se renueva cada dos horas, es decir, doce veces al día (Geraci *et al.*, 1986). Esta velocidad de crecimiento demuestra que la piel de los cetáceos es un tejido en actividad continua que puede ser bien aprovechada en estudios genéticos utilizando las biopsias de piel.

Problemas que enfrentan los estudios citogenéticos en los cetáceos.

Procesamiento de la muestra

La principal dificultad que existe para conjuntar la genética celular con el trabajo en el campo radica en la toma y el procesamiento de muestras a partir de las cuales se puedan establecer cultivos de tejidos viables (Mathews *et al.* 1988).

Gran parte de las muestras empleadas en los estudios citogenéticos requieren de técnicas de cultivo de tejidos que rindan suficientes mitosis analizables, por lo que estas técnicas son parte integral de la investigación citogenética. Se han realizado variaciones en los procedimientos de cultivo de tejidos para obtener un buen número de células en división con cromosomas de morfología analizble y para estimular la división en las células o mejorar la proliferación celular. Los cuatro factores principales para lograr un buen cultivo de tejidos son: el medio de cultivo e ingredientes adicionales, el material para el

cultivo, las condiciones de trabajo y el tipo de tejido que se va a cultivar (Madin *et al.*, 1957; Verma y Babu, 1989).

El proceso del cultivo de tejidos requiere de condiciones de esterilidad que no se pueden encontrar en el campo. El solo hecho de tomar la muestra de piel implica que ésta ya está contaminada por microorganismos asociados al integumento o por exposición al agua de mar y al aire durante la recuperación de la biopsia.

Las biopsias de piel se han obtenido en el campo y se han transportado y procesado en laboratorios (Lambertsen y Duffield, 1987; Lambertsen *et al.*, 1988; Mathews *et al.*, 1988; Rulz, 1988). La toma de la muestra requiere del empleo de una técnica que esté lo más apegada posible a la esterilidad, tanto en la colecta como en su procesamiento en tierra y en el laboratorio. En el proceso de obtención de la muestra, es importante considerar:

- a. La limpieza del dardo.
- b. La extracción de la biopsia de piel del dardo.
- c. El lavado, corte, y transporte de la muestra a tierra.
- d. El procesamiento de la muestra para su transporte al laboratorio.

De acuerdo con Lambertsen *et al.* (1988), el hecho de que no se obtengan buenos resultados de cariotipos de cetáceos se debe principalmente a la cosecha de las células y a que las condiciones *in vitro* no son las adecuadas para la proliferación celular. Sin embargo, existen también otros factores que limitan la obtención de células analizables. La reducción del tiempo entre la toma de la muestra y su procesamiento en tierra, por ejemplo, afecta la viabilidad de las células a cultivar. El empleo de antibióticos puede tener efectos contraproducentes: se ha reportado que altas concentraciones de éstos, afectan la

viabilidad de las células y que las altas temperaturas hacen que se desnaturalicen y pierdan actividad (Mathews *et al.*, 1988; Ruiz, 1988). Finalmente, el empaçado en frío de las muestras y su posterior transporte hacia los laboratorios es uno de los factores que deben contemplarse en la obtención de cultivos celulares viables (Mathews *et al.*, 1988; Ruiz, 1988). Para conservar las muestras adecuadamente hasta su llegada al laboratorio, se emplea hielo y nitrógeno líquido (Lambertsen, 1987). El empaçado debe realizarse de manera que los agentes antes mencionados no dañen las biopsias: cuando se transportan en hielo, por lo general se colocan en los tubos con medio de cultivo y se vigila que la temperatura no exceda de los 4°C; en cambio, cuando se utiliza nitrógeno líquido, la piel obtenida se coloca ya sea dentro de tubos especiales de criogenia con tapa de rosca, o de mangueras de polipropileno selladas de ambos lados. Las muestras se *empaқан* en medio de cultivo fresco suplementado con dimetil sulfóxido (DMSO) como anticongelante: en cualquiera de estos casos, debe vigilarse la temperatura del recipiente y procurar que las biopsias se mantengan intactas. Mathews *et al.* (1988) y Medrano *et al.* (1996), reportaron que para que las muestras obtenidas en el campo tengan una mayor posibilidad de rendir cultivos de células viables, debe procurarse que el tiempo de transporte hacia el laboratorio no exceda una semana.

Planteamiento de la investigación

Los estudios aplicados al conocimiento de los cetáceos presentan una serie de limitaciones cuando se emplean en estos animales en su medio.

Numerosos autores han intentado contrarrestar estas limitaciones con el desarrollo de distintos métodos de estudio como el marcaje-captura-recaptura, la fotoidentificación y la bioacústica con las cuales se han descrito y cuantificado poblaciones de cetáceos; sin embargo, existen aún parámetros, como la identificación del sexo, que no se pueden definir con certeza al utilizar estas técnicas. El empleo de la genética como herramienta en el estudio de las poblaciones de cetáceos ha tenido una gran utilidad y diversas aplicaciones. Con estos estudios se han logrado definir poblaciones, su estructura y se han caracterizado mediante la determinación de polimorfismos tanto en el nivel cromosómico, como en el de DNA.

Si bien este tipo de estudios rinde amplia información sobre la biología de los cetáceos, conjuntar la genética celular y molecular con el trabajo de campo implica una serie de complicaciones que dificultan la aplicación de esta técnica en el campo: el estudio de la variabilidad cariotípica genera dificultades técnicas como la conservación de tejidos vivos, viables y libres de contaminación. No obstante, los estudios citogenéticos son necesarios puesto que reflejan eventos de aislamiento reproductivo y otros procesos de adaptación que han jugado un papel importante dentro de la evolución de los cetáceos (Jarrel, 1984), permiten identificar el sexo de los individuos con un muy alto grado de confiabilidad, sienta las bases para el estudio de estructuras de poblaciones con el análisis

de heteromorfismos que pueden ser empleados incluso como marcadores genéticos (Lambertsen et al., 1988). En este trabajo se aplicaron diversas técnicas de obtención y procesamiento de muestras de piel y de sangre en cetáceos a partir de la necesidad de establecer una técnica de obtención de cromosomas directamente en el campo.

OBJETIVOS

GENERAL

Desarrollar un método de análisis citogenético para aplicarse en el estudio de los cetáceos de los mares de México.

PARTICULARES

- Desarrollar una técnica para extraer y cultivar células de piel colectadas de cetáceos en vida libre para la obtención de preparaciones cromosómicas.
- Implementar una técnica directa de obtención de preparaciones cromosómicas de cetáceos.

MATERIALES Y MÉTODOS

A fin de cubrir los objetivos planteados en este trabajo y, considerando las experiencias reportadas por Ruiz (1988) y Medrano (1993), se dividió esta sección en las siguientes fases:

- | | |
|----------|--|
| FASE I | Cultivo de linfocitos humanos. Obtención, tinción y bandeo de cromosomas. |
| FASE II | Ensayos citogenéticos con muestras de cetáceos en cautiverio. |
| FASE III | Colecta y procesamiento de muestras de piel de cetáceos en vida libre. Su procesamiento en el campo y su posterior cultivo en laboratorio. |
| FASE IV | Ensayos citogenéticos en piel de cetáceos por procedimientos directos. |

Para realizar trabajos con cultivos de tejidos, las muestras deben manejarse en condiciones de asepsia (Jakoby y Pastan, 1979; Medway, 1983; Mathews *et al.*, 1988; Medrano *et al.*, 1996). Todo el material de cristalería y las soluciones empleadas en los procesos de cultivo y cosecha deben ser estériles. Para dicho efecto, las soluciones se pasaron por filtros de 0.2μ . Este proceso se realizó dentro de una campana de flujo laminar o frente a la llama de un mechero. El material de vidrio se esterilizó con la ayuda de autoclave.

La obtención, el cultivo y la cosecha de las muestras de linfocitos humanos, sangre y piel de cetáceos en cautiverio y piel de cetáceos en vida libre -Fases I, II y IV- se realizaron en su totalidad en el Laboratorio de Genética del Hospital General de México. El procesamiento de las muestras de la Fase III se realizó en el laboratorio de Microbiología

MATERIALES Y MÉTODOS

A fin de cubrir los objetivos planteados en este trabajo y, considerando las experiencias reportadas por Ruiz (1988) y Medrano (1993), se dividió esta sección en las siguientes fases:

- FASE I Cultivo de linfocitos humanos. Obtención, tinción y bandedo de cromosomas.
- FASE II Ensayos citogenéticos con muestras de cetáceos en cautiverio.
- FASE III Colecta y procesamiento de muestras de piel de cetáceos en vida libre. Su procesamiento en el campo y su posterior cultivo en laboratorio.
- FASE IV Ensayos citogenéticos en piel de cetáceos por procedimientos directos.

Para realizar trabajos con cultivos de tejidos, las muestras deben manejarse en condiciones de asepsia (Jakoby y Pastan, 1979; Medway, 1983; Mathews *et al.*, 1988; Medrano *et al.*, 1996). Todo el material de cristalería y las soluciones empleadas en los procesos de cultivo y cosecha deben ser estériles. Para dicho efecto, las soluciones se pasaron por filtros de 0.2μ . Este proceso se realizó dentro de una campana de flujo laminar o frente a la llama de un mechero. El material de vidrio se esterilizó con la ayuda de autoclave.

La obtención, el cultivo y la cosecha de las muestras de linfocitos humanos, sangre y piel de cetáceos en cautiverio y piel de cetáceos en vida libre -Fases I, II y IV- se realizaron en su totalidad en el Laboratorio de Genética del Hospital General de México. El procesamiento de las muestras de la Fase III se realizó en el laboratorio de Microbiología

de la Facultad de Ciencias, UNAM y en el laboratorio de Histología de la Facultad de Medicina, UNAM.

FASE I. Cultivo de linfocitos humanos.

Obtención de cromosomas a partir de los linfocitos humanos de sangre periférica.

Los estudios de cariotipos se realizan en su mayoría a partir de los linfocitos de la sangre. No existe un método estandarizado, puesto que las variantes surgen dependiendo de las necesidades específicas de cada estudio.

Para esta fase del trabajo se revisaron los procedimientos de cultivo reportados por Moorhead *et al.* (1960), León-Cázares (1967), Dutrillaux y Couturier (1972), Smith *et al.* (1972), Luperini (1985), y Verma y Babu (1989). Finalmente, se adoptó la técnica de Moorhead *et al.* (1960), modificada en el laboratorio de Genética del Hospital General de México.

Toma de la muestra

Se tomaron muestras de sangre de pacientes, controles sanos, enviados al Servicio de Genética del Hospital General de México. Las muestras se obtuvieron por venopunción, con una jeringa heparinizada y en perfectas condiciones de asepsia (Jakoby y Pastan, 1979; Salamanca, 1990). El cultivo se realizó de acuerdo con el procedimiento de rutina del Laboratorio de Genética (Moorhead *et al.*, 1960).

Siembra

En la campana de flujo laminar, o frente a la llama de un mechero, a dos frascos estériles se les agregaron las siguientes sustancias:

- 5 ml de medio de cultivo McCoy 5A modificado o de medio RPMI 1640, suplementados con suero fetal de bovino (15%) y una solución de antibióticos estreptomicina y penicilina (1%, ver Apéndice 2 para referencia de concentraciones).
- 0.5 ml de fitohemaglutinina tipo "M".
- 1 ml de sangre.

Se incubaron los frascos a 37°C por 72 horas.

Cosecha

Después de 70:30 hrs, a cada frasco se le agregaron 0.25 ml de colchicina al 0.02% y se volvieron a incubar a 37°C por una hora más. La cosecha fue como sigue: se centrifugaron los tubos, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón en solución hipotónica (KCl 0.0375 mol/l), previamente calentada a 37°C. Los tubos se incubaron a 37°C por 30 min, se repitió el proceso de centrifugación y se resuspendió en fijador de Carnoy. Se dejó reposar a temperatura ambiente por 30 min, se centrifugaron los tubos, se decantó el sobrenadante y se aplicaron 5 lavados que consistieron en:

- decantar el sobrenadante
- resuspender en fijador
- centrifugar a 3500 revoluciones por 5 min.

En el último lavado, el botón celular se resuspendió en aproximadamente 1 ml de fijador.

Preparación de laminillas

Con una pipeta Pasteur se dejaron caer gotas sobre un portaobjetos previamente lavado y secado. La altura del goteo fue de aproximadamente 1 m. Se dejó secar al aire y se sumergió por 3-5 segundos en HCl 0.1 N, se enjuagó y se tiñó con Giemsa.

Bandas -G. Técnica de Wang y Fedoroff (1972), modificada en el Laboratorio de Genética del Hospital General de México.

Las preparaciones se dejaron *envejecer* un mínimo de 15 días. Esto consistió en dejarlas deshidratar. La solución para bandas -G se prepara como sigue:

Tripsina (1%)	3 ml
Buffer de fosfatos, pH 6.8	47 ml

La solución se colocó en baño María a 37°C. Se sumergieron las laminillas en la solución para bandas -G, se enjuagaron en buffer de fosfatos y con agua corriente y se tiñeron con Giemsa.

Bandas -C. Técnica de Sumner (1972), modificada en el Laboratorio de Genética del Hospital General de México.

Las preparaciones se dejaron *envejecer* un mínimo de 15 días. Se colocaron después en HCl 0.1 N por 30 min. a temperatura ambiente. Se enjuagaron con agua destilada y se colocaron en una solución de hidróxido de bario $[Ba(OH)_2]$ al 1% previamente calentado a 37°C, se enjuagaron con agua destilada -también a 37°C- y se

Preparación de laminillas

Con una pipeta Pasteur se dejaron caer gotas sobre un portaobjetos previamente lavado y secado. La altura del goteo fue de aproximadamente 1 m. Se dejó secar al aire y se sumergió por 3-5 segundos en HCl 0.1 N, se enjuagó y se tiñó con Giemsa.

Bandas -G. Técnica de Wang y Fedoroff (1972), modificada en el Laboratorio de Genética del Hospital General de México.

Las preparaciones se dejaron *envejecer* un mínimo de 15 días. Esto consistió en dejarlas deshidratar. La solución para bandas -G se prepara como sigue:

Tripsina (1%)	3 ml
Buffer de fosfatos, pH 6.8	47 ml

La solución se colocó en baño María a 37°C. Se sumergieron las laminillas en la solución para bandas -G, se enjuagaron en buffer de fosfatos y con agua corriente y se tiñeron con Giemsa.

Bandas -C. Técnica de Sumner (1972), modificada en el Laboratorio de Genética del Hospital General de México.

Las preparaciones se dejaron *envejecer* un mínimo de 15 días. Se colocaron después en HCl 0.1 N por 30 min. a temperatura ambiente. Se enjuagaron con agua destilada y se colocaron en una solución de hidróxido de bario $[Ba(OH)_2]$ al 1% previamente calentado a 37°C, se enjuagaron con agua destilada -también a 37°C- y se

Preparación de laminillas

Con una pipeta Pasteur se dejaron caer gotas sobre un portaobjetos previamente lavado y secado. La altura del goteo fue de aproximadamente 1 m. Se dejó secar al aire y se sumergió por 3-5 segundos en HCl 0.1 N, se enjuagó y se tiñó con Giemsa.

Bandas -G. Técnica de Wang y Fedoroff (1972), modificada en el Laboratorio de Genética del Hospital General de México.

Las preparaciones se dejaron *envejecer* un mínimo de 15 días. Ésto consistió en dejarlas deshidratar. La solución para bandas -G se prepara como sigue:

Tripsina (1%)	3 ml
Buffer de fosfatos, pH 6.8	47 ml

La solución se colocó en baño María a 37°C. Se sumergieron las laminillas en la solución para bandas -G, se enjuagaron en buffer de fosfatos y con agua corriente y se tiñeron con Giemsa.

Bandas -C. Técnica de Sumner (1972), modificada en el Laboratorio de Genética del Hospital General de México.

Las preparaciones se dejaron *envejecer* un mínimo de 15 días. Se colocaron después en HCl 0.1 N por 30 min. a temperatura ambiente. Se enjuagaron con agua destilada y se colocaron en una solución de hidróxido de bario $[Ba(OH)_2]$ al 1% previamente calentado a 37°C, se enjuagaron con agua destilada -también a 37°C- y se

colocaron en una solución 2xSSC o solución salina citratada al 2.7% -citrate de sodio y cloruro de sodio- a 60°C por 2 hrs. Se enjuagaron y se tiñeron con Giemsa por 5 minutos.

FASE II. Ensayos con muestras de animales en cautiverio.
Obtención de cromosomas a partir de muestras de sangre.

Se realizó una revisión sobre métodos de obtención de cromosomas a partir de cultivos de linfocitos aplicados a cetáceos. Principalmente se trabajó con aquellos reportados por Arakaki y Sparkes (1963) y Duffield *et al.* (1967 y 1971). Debido a que no existe una técnica específica para el estudio de cetáceos y, en términos generales, todas las revisadas son muy similares, se trabajó con la misma técnica aplicada al cultivo de linfocitos humanos (Moorhead *et al.*, 1960).

Toma de la muestra

Las muestras de sangre de cetáceos en cautiverio se tomaron mediante venopunción en la región ventral de la aleta caudal o en la vena del pedúnculo caudal. No existe diferencia entre las zonas de toma de muestra, aunque la aleta caudal es la zona de muestreo primario en la mayoría de los cetáceos, puesto que en esta región corren las llamadas redes maravillosas -*retia mirabile*-, que son numerosas arterias principales rodeadas de una red venosa periarterial (Figura 15).

Se tomaron muestras de sangre periférica de Keiko, un macho de la especie *Orcinus orca*, de aproximadamente 6.55 m. de longitud y 15 años de edad. El animal padece de *Papiloma* y está en el acuario de Reino Aventura, Ajusco D. F. Las muestras se obtuvieron con

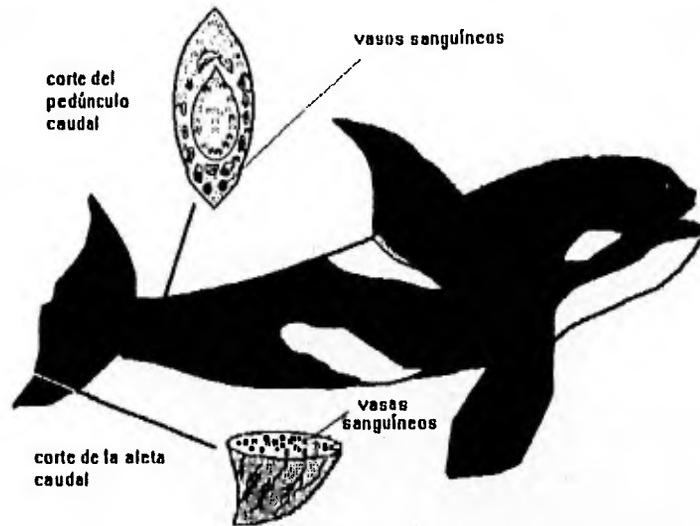


Figura 15. Esquema que muestra las zonas de muestreo de sangre en la orca.

ayuda de una red especial que controla el movimiento del animal, que toleró adecuadamente el procedimiento (Figura 16). Se empleó equipo Vacutainer, tubos de 5 - 10 ml al vacío y agujas calibre 20 x 1 1/2 pulgadas de largo. Asimismo, se utilizó heparina como anticoagulante y las muestras se homogeneizaron por inversión.

La sangre de los cetáceos tiene una velocidad de sedimentación mayor a la de los humanos (Ridgway, 1972; Delgado-Casarín, 1988) lo que hace más laborioso el trabajo y reduce el índice mitótico; por consiguiente, se agregó un mayor volumen de heparina por muestra obtenida .4 ml-, se conservaron los mismos volúmenes de medio de cultivo -5 ml- y de fitohemaglutinina -0.5 ml- y se redujo a la mitad la cantidad de sangre -0.5 ml-.



Figura 16. Toma de muestra de sangre en *Keiko*, macho de la especie *Orcinus orca*.

Los tubos se mantuvieron a una temperatura aproximada de 37°C. El tiempo de transporte, desde que se tomó la muestra hasta la llegada al laboratorio fue siempre de aproximadamente 3 hrs. El procedimiento en la siembra, la cosecha, la fijación y la preparación de laminillas fueron iguales a los empleados en el cultivo de linfocitos humanos.

Cultivo de fibroblastos a partir de biopsias obtenidas de animales en cautiverio.

Se revisaron los métodos reportados por Harnden (1960), Basrur *et al.* (1962), Grouchy *et al.* (1970), Sly y Grubb (1979), Lawce y Hack (1980) y Verma y Babu (1989). Finalmente, se hizo una modificación a la técnica de Verma y Babu (1989).

Toma de la muestra

La muestra de piel se obtiene empleando bisturí, tijeras o sacabocados. El tamaño de ésta varía según el estudio que se vaya a efectuar; pero, en términos generales y de acuerdo con Winn *et al.* (1973), "no será mayor al tamaño de un diente humano", es decir, es de alrededor de 10 mm de largo por menos de 5 mm de diámetro (Medway, 1983). Para esta parte del método se empleó medio de cultivo anticontaminante -L-15-. El procedimiento se describe a continuación: La biopsia se colocó en una caja de petri estéril y se cortó en trozos pequeños con navajas de bisturí, todo en medio de cultivo. Los trozos se pasaron a un frasco, y se les agregó una solución de tripsina-EDTA -ver apéndice 2-. Las muestras quedaron en agitación por 15-20 min, y se transfirieron a tubos de centrifuga. Se agregó 1 ml de medio de cultivo suplementado para inactivar la tripsina, se centrifugaron los tubos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en medio de cultivo suplementado. La suspensión celular se goteó sobre cubreobjetos estériles y se les colocó otro encima para hacer un *sandwich* (Grouchy *et al.*, 1970). Se incubaron a 37°C y se alimentaron, reemplazando aproximadamente el 50% de volumen del medio viejo por la misma cantidad de medio de cultivo fresco y suplementado, después de 3 días, cada tercer día. La fijación,



Figura 17. Toma de muestras de piel de *Keiko*. Se aprecia una de las áreas de infección por *Papiloma* de la que se obtuvo piel para obtención de preparaciones cromosómicas.

la preparación de laminillas y los procedimientos de tinción, son los mismos utilizados con los linfocitos de sangre periférica de humanos.

Se obtuvieron dos muestras de piel de *Keiko*, macho de la especie *O. orca*, de dos formas: por una parte, se tomaron muestras - prácticamente descamaciones - de la zona de infección de *Papiloma* en la base de las aletas pectorales y rostro del animal con las manos (Figura 17); por otra parte, con tijeras se hicieron cortes de la base y extremo distal de las aletas pectorales del animal. En ambos casos, las muestras se lavaron con medio de cultivo L-15 fresco, sin suplementar, se colocaron en tubos con medio L-15 suplementado y se transportaron al laboratorio, conservándolas a una temperatura aproximada de 37°C, en un tiempo de aproximadamente 4 horas. El procesamiento de estas muestras en el laboratorio se

realizó de acuerdo con la modificación realizada al método de cultivo de fibroblastos reportado por Venna y Babu (1989) en el Laboratorio de Genética del Hospital General de México.

FASE III. Colecta y procesamiento de muestras de piel de cetáceos en vida libre. Procesamiento en el campo y cultivos en el laboratorio.

Esta fase del Método comprende las biopsias colectadas por Medrano (1993) en aguas de Bahía de Banderas, Nay.; la Paz, B. C. S. y en aguas adyacentes a la Isla Socorro en el período comprendido entre 1990 y 1992.

Consideraciones previas

El manejo de la muestra se realizó en condiciones tan apegadas a la esterilidad como fue posible (Jakoby y Pastan, 1979; Medway, 1983; Mathews *et al.*, 1988). Las puntas de dardo que se emplearon se limpiaron con etanol al 70% y se flamearon antes de su utilización. Las muestras no se tocaron con las manos, sino que se manejaron con pinzas previamente flameadas. Las soluciones y el material se esterilizaron antes de ser llevadas al campo. El procesamiento de la muestra se realizó empleando una campana de acrílico que está sellada en todos sus extremos excepto los superiores donde la pieza correspondiente es abatible. En dos de los extremos opuestos existen dos aberturas que permiten el paso de las manos y facilitan el trabajo en el interior de la misma. El interior de la caja se limpió con alcohol al 70% y se dejó un mechero de alcohol encendido aproximadamente 1 hr. antes de iniciar el proceso. El trabajo se realizó, hasta donde fué posible, frente a la llama de un mechero de alcohol (Figura 18).

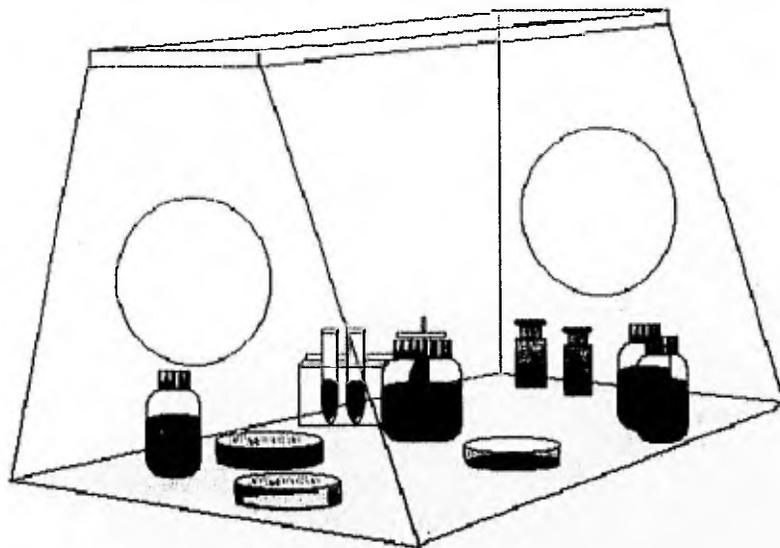


Figura 18. Diseño de la campana de acrílico empleada para el procesamiento de biopsias de piel de cetáceos.

Toma de la muestra

Para tomar biopsias de piel de cetáceos de vida libre, se utilizó el sistema dardo-flecha-ballesta diseñado en la Facultad de Ciencias, UNAM (Medrano, 1993; Medrano *et al.*, 1996). La ballesta empleada tiene una potencia de disparo de 23 kg, las flechas son de aluminio con un dardo en el extremo anterior y un flotador de color fluorescente, que facilita su localización en el mar y mantiene el trozo de piel fuera del agua (Figura 19).

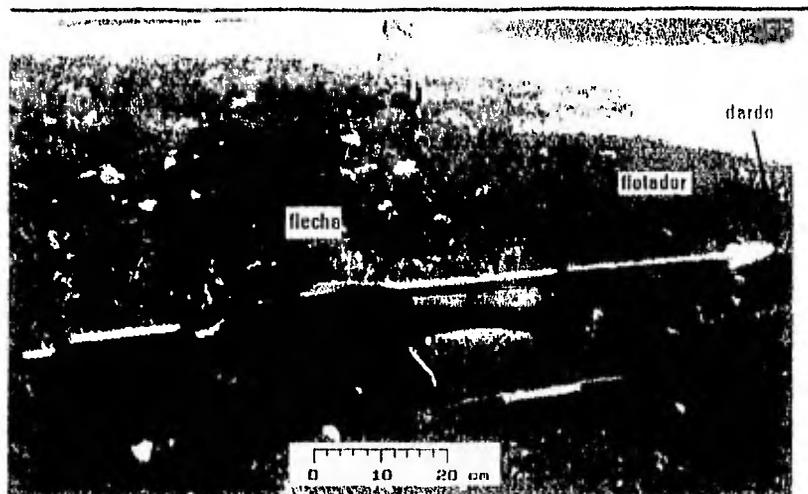


Figura 19. Ballesta empleada para la toma de biopsias de piel de cetáceos en vida libre (Medrano, 1993; Fotografía: Carlos Esquivel).

El dardo es un cilindro de 5 mm de espesor con los bordes anteriores afilados que dejan una abertura de 3 mm. Tiene un tope que permite que el cilindro penetre 1 cm. en la piel del animal. El orificio que lleva el cilindro en su parte posterior, permite la penetración de la piel mientras desplaza el aire en su interior. Un reborde en la punta hace que el cilindro retenga el fragmento de piel. La punta se desatornilla para retirar la biopsia por su extremo posterior (Figura 13).

La distancia óptima para realizar los tiros fue de 5 a 9 m. La experiencia en la recolección de muestras de piel de cetáceos en vida libre indica que la mejor zona de disparo es la región posterior del costado, por arriba de la línea media (Figura 20). La conducta de los animales afecta la eficiencia de la colecta, dado que la piel debe encontrarse tensa a fin de que el impulso de la flecha no se amortigüe con la piel relajada, y

se disipe el impacto. Por consiguiente, los disparos deben realizarse, preferentemente, cuando el animal arquea el tronco previo a una inmersión (Figura 20).

Se tomaron biopsias de piel de cetáceos, principalmente de ejemplares de la ballena jorobada, *Megaptera novaeangliae*, aunque también se obtuvieron de ejemplares de *Stenella attenuata*, y una sola biopsia de un ejemplar de *Balaenoptera edeni*. Las ballenas jorobadas se identificaron con base en las características morfológicas externas y en la parte ventral de la aleta caudal (Katona *et al.*, 1979). Las biopsias se obtuvieron mediante disparos a una distancia aproximada de 10 m.

Procesamiento de las muestras

Una vez tomada la biopsia, habiendo separado la punta de la flecha, desatornillado el dardo y, con pinzas esterilizadas, recuperado la muestra, ésta se lavó con solución salina isotónica, con buffer de fosfatos (20 mmol/L a pH=7.4) y antibióticos (penicilina 400 U/ml, sulfato de estreptomicina 400 µg/ml y fungizone 1 µg/ml). Ya en tierra, frente a la llama de un mechero, las muestras se enjuagaron en cajas de petri estériles con la misma solución salina. De ahí se transfirieron a tubos de polipropileno con medio de cultivo (RPMI, MEM, McCoy 5A) suplementados con fosfatos (20 mmol/L) y antibióticos (penicilina 200 U/ml, estreptomicina 200 µg/ml y fungizone 0.5 µg/ml). Las muestras se empaquetaron en frío y se transportaron, sin congelarse, hasta el laboratorio donde se volvieron a lavar con solución salina isotónica amortiguada con antibióticos.



Figura 20. Esquema en el que se ilustra la zona de impacto del dardo para la toma de biopsias de piel en grandes cetáceos como la ballena jorobada, *Megoptera novaeangliae*.

El procedimiento en el laboratorio para el cultivo de fibroblastos tiene una variación muy reducida de una técnica a otra; en los trabajos realizados por Medrano *et al.* (1996), las muestras se cultivaron de acuerdo con el procedimiento descrito por Jakoby y Pastan (1979), la mayor variación radicó en el empleo de distintos tratamientos enzimáticos para disgregar las células: se utilizaron proteasas y nucleasas y una mezcla de colagenasa-elastasa (Medrano *et al.*, 1996).

FASE IV.***Ensayos citogenéticos por procedimientos directos.***

Los resultados reportados por Mathews *et al.* (1988), Ruiz (1988), y los obtenidos con las experiencias propias en el campo, demostraron claramente la dificultad que existe para mantener cultivos obtenidos a partir de biopsias de cetáceos viables y libres de contaminación cuando se trabaja en el campo.

Inicialmente, se realizó una modificación conjunta a los métodos de cultivo de fibroblastos de Harnden (1960), Hack y Lawcc (1980) y Verma y Babu (1989). Más adelante, se optó por utilizar una técnica de cultivo de tejidos a partir de vellosidades coriales. Se eligió este último porque las vellosidades son tejido en división continua y, en este aspecto, el tejido es muy similar a la piel de los cetáceos. Se procedió entonces a revisar las técnicas de cultivo correspondientes (Kruse, 1972; Gosden *et al.*, 1982; Freshney, 1983; Smidt-Jensen y Hahnemann, 1984; Verma y Babu, 1989; Niazi *et al.*, 1988; Simoni *et al.*, 1988; y los métodos descritos en el Manual de Keberg, 1989) y se elaboró un protocolo basándose principalmente en los trabajos de Freshney (1983) y Verma y Babu (1989). La modificación a dichos protocolos y el trabajo subsecuente de cultivo y cosecha, se realizaron en el Laboratorio de Genética del Hospital General de México.

Toma de la muestra

Se tomaron biopsias de ejemplares de ballenas jorobadas, *M. novaeangliae*, en el invierno de 1993 con el sistema antes descrito. El procedimiento para la toma de las muestras de piel y de la identificación de los animales es el mismo que se empleó en la Fase III. La muestra se extrajo del dardo con pinzas esterilizadas, se lavó con medio de cultivo anticontaminante -Leibowitz o L-15-, suplementado con suero fetal (20%), una solución de antibióticos (penicilina y estreptomina, 1%) y 0.25 ml de colchicina (0.02%) -ver apéndice 2-, y se colocó para su transporte hacia tierra en tubos con medio de cultivo L-15 suplementado.

Cultivo y cosecha

El trabajo en tierra inició un promedio de 5 hrs. después de la obtención de la biopsia. Durante este tiempo, las muestras se conservaron en frío -5°C-. En tierra se empleó la campana portátil de acrílico antes descrita para el procesamiento de las muestras. El objeto de utilizar esta campana fue proporcionar un ambiente más cercano a lo estéril y proteger de esta manera las muestras de la contaminación. El trabajo con las muestras se realizó siempre lo más cercanamente posible a la llama del mechero. En condiciones de esterilidad se cortó la muestra en tres partes; se dejó la parte más interna de la epidermis y la más externa de la dermis para el trabajo de citogenética, las partes restantes se guardaron para análisis molecular. El procesamiento de las muestras se realizó de acuerdo con la técnica modificada de cultivo de

vellosidades coriales (Freshney, 1983), implementada en el Laboratorio de Genética del Hospital General de México.

Las muestras se pasaron a cajas de petri y se lavaron con medio L-15 suplementado que, además, contenía colchicina (0.02%). El procedimiento se describe a continuación:

- Se lavó con medio L-15 suplementado con suero fetal de bovino, antibióticos y colchicina.
- Se cortó la porción más interna de la epidermis y la más externa de la dermis.
- Se cortó esta porción en trozos muy finos. Todo este proceso se hizo en medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal, antibióticos y colchicina.
- Se transfirió el contenido de las cajas a tubos de centrifuga estériles.
- Se centrifugó, se decantó el sobrenadante y resuspendió en tripsina (1%). se dejó en agitación suave por 30 min.
- Se agregó medio de cultivo y se agitó por inversión.
- Se centrifugó, se decantó el sobrenadante y resuspendió en colagenasa (0.5 mg/ml). se dejó en agitación suave por 2 hrs.
- Se centrifugó, se decantó el sobrenadante y resuspendió en solución hipotónica (KCl 0.0375 mol/l).

A partir de este punto, el procedimiento fue similar al aplicado en linfocitos humanos de sangre periférica (Figura 21). La centrifuga de campo alcanzó una velocidad máxima aproximada de 800 rpm y se empleó por 20 minutos.

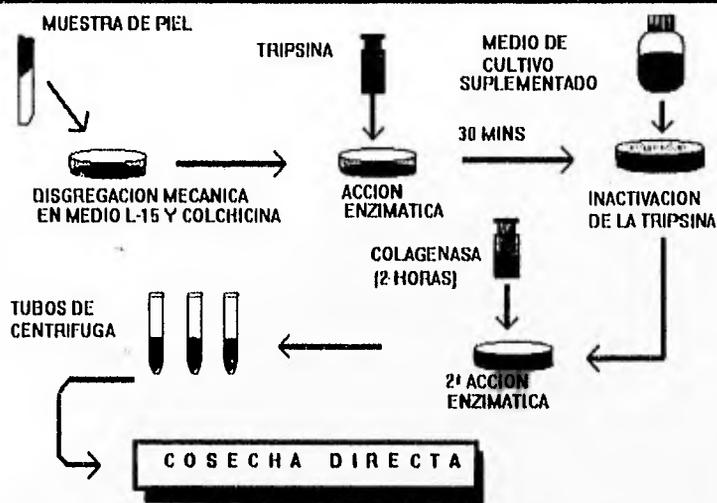


Figura 21. Método empleado en el procesamiento de las muestras de piel en el campo para la obtención de preparaciones cromosómicas por técnica directa.

RESULTADOS

Cultivo de linfocitos humanos. Obtención, tinción y bandedo de cromosomas.

Se obtuvieron cariotipos tanto en tinción normal como en bandas -G y -C, en un 90% de los pacientes estudiados. La figura 22 muestra el cariotipo de un individuo masculino que presenta polimorfismos en los cromosomas 15 ph+ y Y qh+. Estos polimorfismos no fueron evidentes en tinción normal y el bandedo en -G mostró solo el heteromorfismo del cromosoma 15 ph+ y no fue sino hasta que se aplicó la tinción en bandas -C que fue posible identificar al cromosoma Y y hacer evidentes ambos heteromorfismos. La figura 23 muestra el cariotipo del mismo individuo en técnica de bandas -G, mientras que la figura 24 muestra el cariotipo del mismo paciente y los polimorfismos evidentes en bandas -C.



Figura 22. Cariotipo humano de un control sano. Técnica de tinción normal. Se indican los cromosomas sexuales. La determinación de éstos se realizó basándose en el cariotipo realizado en bandas -C puesto que el cromosoma sexual Y no se pudo localizar sino hasta aplicar dicha técnica.



Figura 23. Cariotipo de un control humano normal en técnica de bandas -G. Se indican los cromosomas sexuales.

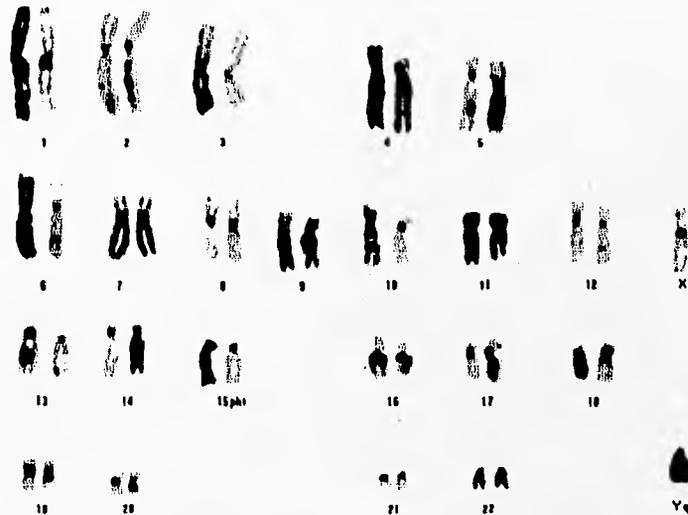


Figura 24. Cariotipo del mismo control sano en técnica de bandas -C. Se indican los cromosomas sexuales así como los polimorfismos en los cromosomas 15ph+ y Y qh+. Estos polimorfismos fueron evidentes con la aplicación de esta técnica.



Figura 25. Cariotipo de Keiko, macho de la especie *Orcinus orca*.

Ensayos citogenéticos con muestras de cetáceos en cautiverio
Muestras de sangre

La figura 25 muestra el cariotipo de Keiko, un individuo macho de la especie *Orcinus orca*, en tinción normal. En términos generales, la modificación realizada a la técnica de Moorhead *et al.* (1960) dio resultados positivos. El problema más concreto a resolver fue el de cultivo inmediato del tejido, dada la elevada tasa de sedimentación de la sangre de los cetáceos.

Colecta de muestras de piel

A partir de las dos muestras de piel obtenidas de la orca en cautiverio, se elaboraron cuatro cultivos primarios. No fue posible obtener cultivos secundarios por técnica de células disgregadas (Verma y Babu, 1989) ni por técnica de explantes (Grouchy *et al.*, 1960). No se halló indicio alguno de contaminación en los cultivos elaborados a partir de las muestras de piel. El botón celular fue demasiado pequeño y la parte más laboriosa del trabajo fue la disgregación celular. No se obtuvieron preparaciones cromosómicas de ninguna de estas muestras.

Colecta y procesamiento de muestras de piel de cetáceos en vida libre ***Sistema de toma de biopsias***

Con el sistema diseñado en la Facultad de Ciencias (Medrano, 1993; Medrano *et al.*, 1996), se obtuvo una eficiencia del 70% definida como el número de muestras obtenidas por impacto. La distancia de los disparos estuvo en un rango de 4 - 12 m, siendo la óptima 8 - 10 m. Se observó que la eficiencia de los disparos disminuye conforme aumenta la distancia a la cual se realizan éstos, y que la probabilidad de obtener muestras en disparos hechos en distancias mayores de 16 m es muy reducida (Figura 26). La experiencia del trabajo en el campo indicó que existe una mayor probabilidad de obtener biopsias cuando el disparo se realiza en la región posterior del costado por arriba de la línea media y cuando el animal arquea el tronco antes de realizar una inmersión (Medrano *et al.*, 1996; Figura 20). Cabe señalar que la mayor parte de las muestras provinieron de ballenas jorobadas, *M. novaeangliae*.

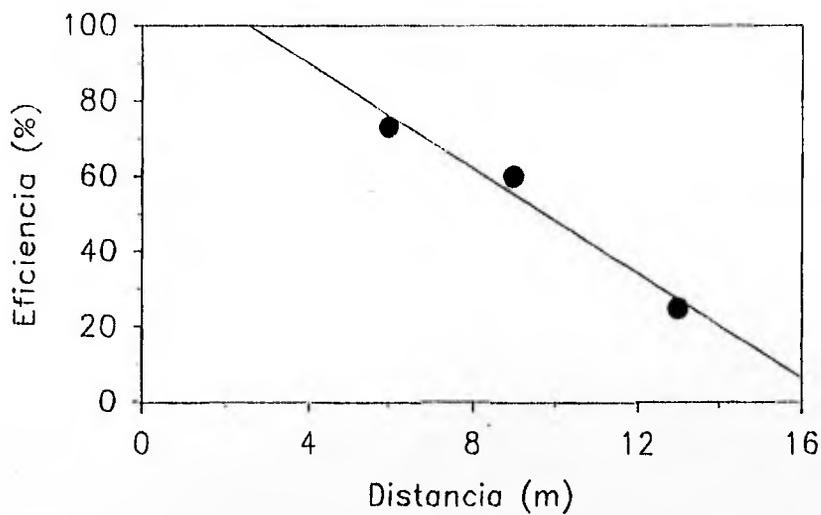


Figura 26. Eficiencia de la colecta, medida como el porcentaje de muestras obtenidas por impacto en función de la distancia utilizando una ballesta de 23 kg. de empuje.

Efecto de la toma de la muestra en los cetáceos en vida libre

La respuesta de estos animales a los disparos varió desde una indolencia aparente hasta una violenta sacudida dorsoventral realizada con la aleta caudal que es seguida de una conducta de evasión a las embarcaciones. Dicha evasión consistió en apresurar y prolongar la inmersión evitando la zona en la que estaban las embarcaciones; los animales realizaron inmersiones prolongadas, salieron a la superficie a una distancia considerable de éstas y repitieron esta operación tan pronto la embarcación se les aproximaba.

Los animales mostraron respuestas observables en un 60% de los disparos, valor menor al 75% reportado por Weinrich *et al.*, (1991). Esta respuesta aumentó cuando la distancia fue menor y cuando los disparos se realizaron en forma oblicua. El efecto de la toma de biopsias fue transitorio (Medway, 1983; Lambertsen, 1987; Weinrich *et al.*, 1991; Medrano *et al.*, 1996): se observó que las ballenas recuperaron su ritmo respiratorio en poco más de media hora cuando la embarcación se mantenía a distancias mayores a los 100 m (Figura 27). Clapham y Mattila (1993) sugirieron que el efecto del tráfico de las embarcaciones tiene un mayor impacto en la conducta de estos animales que el proceso mismo de la toma de las biopsias. Para probar lo anterior se realizó una relación entre la actividad en superficie de los animales y el tráfico de embarcaciones en la boca norte de la Bahía de Banderas -el canal entre Punta de Mita y las Islas Marietas- en un solo día: estas observaciones mostraron que, cuando el tráfico de embarcaciones fue mayor, las ballenas jorobadas permanecieron un menor tiempo en superficie (enero 20, 1993; Medrano *et al.*, 1996; Figura 28). Los datos obtenidos de los embarcaciones fue mayor, las jorobadas permanecieron un menor tiempo en superficie (enero 20, 1993; Medrano *et al.*, 1996; Figura 28). Los datos obtenidos de los disparos y las biopsias indican las ventajas que tiene este sistema en cuanto al diseño del dardo y al mecanismo de retención de la muestra con respecto a los diseños presentados por otros autores. Los porcentajes presentados se estimaron a partir de las muestras obtenidas desde 1990 hasta 1992 que hicieron un total de 76 disparos (Medrano *et al.*, 1996).

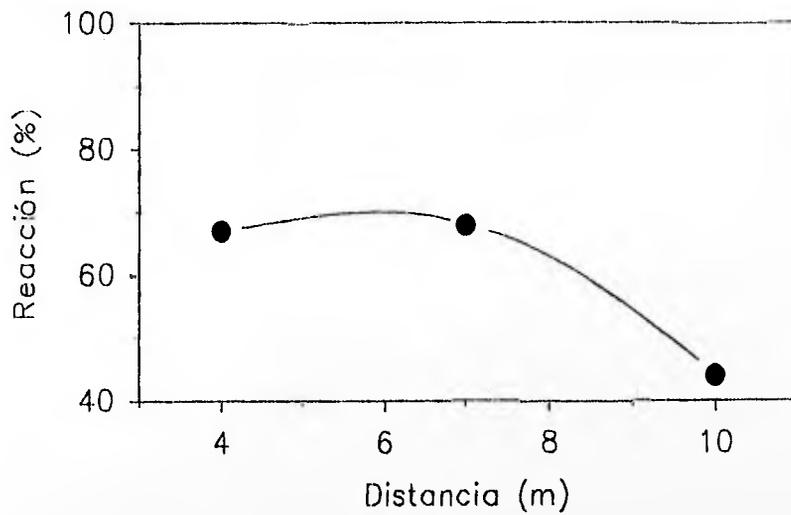


Figura 27. Porcentaje de respuestas observables de ballenas jorobadas ante impactos de flecha para coleccionar biopsias en función de la distancia.

Procesamiento de las muestras de piel coleccionadas

Se procesaron biopsias de piel de cetáceos coleccionadas en el campo con muestras obtenidas desde 1990 hasta 1992 tal y como ha sido descrito en la Fase III. De éstas se lograron establecer cultivos viables y limpios de contaminación que, sin embargo, no crecieron. La disgregación celular en el laboratorio fue difícil y no se lograron establecer cultivos secundarios. Las preparaciones realizadas a partir de estos cultivos fueron muy limpias y dejaban ver las células aún embebidas en las fibras de colágena.

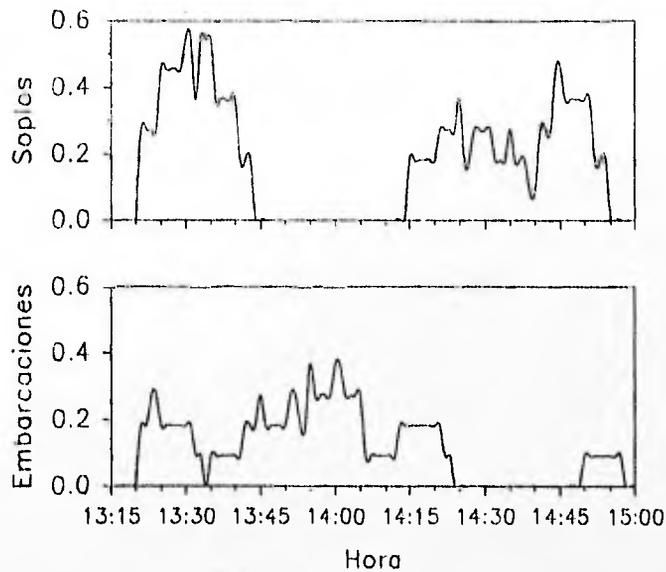


Figura 28. Registro del tráfico de embarcaciones y su relación con la actividad en superficie de ballenas jorobadas, *Megaptera novaeangliae* en la boca norte de Bahía de Banderas, Nay, el día 20 de enero de 1993. La figura indica cómo los animales varían su conducta en superficie cuando hay mayor tráfico de embarcaciones en la zona (Medrano *et al.*, 1996).

Ensayos citogenéticos por procedimientos directos

La obtención de la muestra se realizó por los métodos ya descritos. No se halló indicio de contaminación en ninguna de las muestras obtenidas. La figura 29 muestra una metafase de las tres obtenidas por estos procedimientos. Como puede apreciarse, la metafase está cerrada, es decir, los cromosomas se ven sobrepuestos lo cual dificultó su apareamiento. El material obtenido fue escaso, aunque la transformación blástica fue adecuada.



Figura 29. Cariotipo obtenido de muestras de piel de ballena jorobada, *Megaptera novaeangliae* por procedimientos directos. Las condiciones de la metafase impidieron que se pudiera ordenar el cariotipo.

DISCUSIÓN

Gran parte del conocimiento que se tiene sobre las poblaciones de los cetáceos se debe, principalmente, a la conjunción de distintos métodos de estudio. Existen trabajos que se apegan a una sola técnica y se aplican a poblaciones conocidas de estos animales, como Miyashita *et al.* (1990), quienes emplearon la fotoidentificación para monitorear y estimar la estructura y los hábitos de reproducción de una población de calderones de aleta corta (*Globicephala melana*) en las costas japonesas. Otros trabajos como el de Wells y Scott (1990), integran un mayor número de disciplinas. Estos autores combinaron las técnicas de fotoidentificación, marcaje captura-recaptura, observaciones conductuales y análisis electroforéticos de muestras de sangre para examinar la estructura y la dinámica de poblaciones de tursiones (*Tursiops truncatus*) en la costa occidental de Florida.

El análisis de cariotipos es una forma muy completa de estudiar a los cetáceos: permite identificar el sexo de los individuos con un muy alto grado de confiabilidad, así como interpretar la conducta social y relacionar los resultados con registros de comportamiento de los animales y, por otro lado, sienta las bases para el estudio de estructuras de poblaciones con el análisis de heteromorfismos que pueden ser empleados incluso como marcadores genéticos (Lambertsen *et al.*, 1988). Se ha mostrado que el estudio de las variantes cromosómicas que existen entre los individuos de una misma población permite identificar a éstos basándose en un perfil cariotípico, específico de cada animal, y evidente con las bandas -R (Lambertsen y Duffield, 1987).

No obstante, este tipo de análisis genera una serie de dificultades prácticas que lo hacen difícil de aplicar ya que falta desarrollo técnico en el cultivo de tejidos. Se requiere pues, de un mayor trabajo en esta técnica y esa demanda atención a este problema en forma especializada.

En el presente trabajo, se dividió el método en fases con el fin de adquirir la capacidad técnica para obtener preparaciones cromosómicas y aplicar técnicas de tinción y de bandedo. De hecho, el propósito fundamental de realizar ensayos con animales en cautiverio fue refinar el método directamente con éstos y reproducir, de cierta manera, las condiciones de trabajo en el campo para poder implementar una técnica práctica y de fácil aplicación. Lógicamente, en los delfinarios existen medidas de protección y requisitos administrativos cuya finalidad es evitar estresar a los animales. La observancia de estas reglas puede resultar en detrimento de la toma de las muestras, como sucedió en este trabajo.

Los fibroblastos *per se* son tejidos que requieren de muchos cuidados para su cultivo. En la experiencia del trabajo con cetáceos se ha visto que la mayor dificultad radica en la disgregación de las células para el establecimiento de cultivo de tejidos. Es muy posible que las células, al ser tratadas y empacadas en frío -como ya ha sido descrito- entraran en una especie de latencia, puesto que las pocas células que se lograron disgregar fueron insuficientes para establecer la línea de cultivo. Los tratamientos enzimáticos para la disgregación celular, por su parte, son agentes que dañan las células y los resultados terminan siendo los mismos: las células disgregadas no pueden adherirse a las superficies

del cultivo y mueren o se transforman en fibroцитos (Costero *et al.*, 1956; Windle, 1976), o en adipocitos (Mathews *et al.*, 1988; Medrano *et al.*, 1996).

Ensayos citogenéticos con linfocitos humanos

Los resultados muestran polimorfismos cromosómicos en los cromosomas 15ph⁺ y Yqh⁺, aunque no son evidentes sino hasta aplicar el bandeo en -C. Esto muestra la importancia del empleo de distintas perspectivas de análisis, puesto que no fue posible localizar al cromosoma sexual Y en el cariotipo ni en la tinción normal, ni en la de bandas-G. Los polimorfismos mencionados están en el intervalo de aquellos que pueden ser hallados normalmente dentro del cariotipo humano (Meléndez, 1991).

Ensayos citogenéticos con cetáceos en cautiverio *Muestras de sangre*

Los resultados obtenidos con estas muestras indican la posibilidad del empleo de este tipo de tejido en un análisis citogenético. La tasa de sedimentación de la sangre de cetáceos es uno de los mayores obstáculos encontrados en el proceso del cultivo; los cetáceos presentan características fisiológicas específicas por el medio en que viven y éstas, a su vez, cambian al adaptarse los animales a la vida en cautiverio. También está involucrado el hecho de que *Keiko* vive en altitud lo cual no hace ningún cetáceo en vida libre (Delgado-Casarin, 1988). Entre los principales cambios está el de la fórmula roja, en la que se ha encontrado un aumento en la cantidad de eritrocitos junto con una reducción en el volumen globular medio; dichos cambios hacen que la sedimentación de la sangre sea

mayor. La reducción del volumen de la sangre en un 50% sin alterar los volúmenes de medio de cultivo, antibióticos y agente mitógeno probó ser una buena medida: las preparaciones indican un buen nivel de transformación blástica y rindieron suficientes mitosis. Cabe señalar que la reducción de tiempo que hay entre la toma de la muestra y el procesamiento de la misma en el laboratorio, es también un factor de importancia en este procedimiento, aun cuando autores como Delgado-Casarrín (1988), Cadavid y Romero (1994) y Romero *et al.* (1994), reportaron un tiempo a veces mayor a las cinco horas entre la toma de la muestra y el procesamiento en el laboratorio sin haber encontrado dificultad alguna en la obtención de preparaciones cromosómicas a partir de muestras de sangre de cetáceos.

Ensayos con muestras de piel

En un principio, se tomaron biopsias de piel humana para su proceso en el laboratorio. Pero después se llegó a la conclusión de que los ensayos debieran ser realizados con piel de cetáceos, lo que corresponde a la Fase II del Método.

Desafortunadamente, la lógica protección a los animales en cautiverio y los obligados trámites burocráticos no permitieron que se tomaran suficientes muestras para realizar los ensayos que se tenían planeados: no se contó con un número suficiente de biopsias de piel. La idea original del trabajo consistía en hacer un número determinado de ensayos que permitieran refinar la técnica para ser aplicada en el campo. La toma de la muestra de piel y la zona de donde se tomaron las muestras son los factores que más

influyeron en los resultados. Las preparaciones citosómicas aparecieron prácticamente limpias debido a que la muestra carecía de suficiente profundidad. El empleo del medio de cultivo L-15 tuvo buenos resultados, puesto que no hubo indicio de contaminación en los cultivos realizados.

Colecta de muestras de piel de cetáceos en vida libre
Sistema de muestreo

Como ya se mencionó, para la colecta de biopsias de piel de cetáceos en vida libre se utilizó una flecha modificada que lleva en el extremo anterior un dardo. Las flechas pueden ser disparadas por distintas unidades de proyección, como rifles (Winn *et al.*, 1973), fusiles neumáticos (Aguilar y Nadal, 1984) y ballestas (Lambertsen, 1987; Mathews *et al.*, 1988; Ruiz, 1988; Medrano, 1993; Medrano *et al.*, 1996). Inicialmente, las flechas eran barras de aluminio unidas a una línea de pesca integrada al dispositivo de disparo que permitía la recuperación de la misma. La experiencia en el trabajo de campo, junto con la de otros autores (Medway, 1983; Medrano, 1993; Medrano *et al.*, 1996), mostró los inconvenientes en cuanto al costo de fabricación, el efecto de la línea de pesca en la toma de la muestra y la frecuente pérdida de las flechas.

Mathews *et al.*, (1988) reportaron el empleo de una flecha con punta modificada con un flotador que ayudase a recuperarla del agua. Este sistema, empleado independientemente por otros autores, redujo los costos de fabricación y mejoró la

eficiencia en la toma de la muestra, hasta ser en la actualidad el sistema de recolecta más utilizado (Palsbøll et al., 1991).

En 1992, se obtuvo el diseño final del dardo que se emplea hasta la fecha en la Facultad de Ciencias, UNAM (Medrano, 1993; Medrano *et al.*, 1996). Este dardo, descrito en la sección de método, es de dimensiones pequeñas en comparación a otras puntas y, no obstante su tamaño, presenta ciertas ventajas con relación a otros sistemas: es de fabricación más sencilla, presenta un mecanismo de retención muy simple, carente de accesorios, daña menos a los animales y permite su empleo en pequeños cetáceos (Figura 12). La muestra de piel que se obtiene, no es dañada por mecanismos de retención como los anzuelos o los dientes (Figuras 8, 9, 10, 11), lo que facilita su manipulación y la expone menos a la contaminación por microorganismos, lo que a su vez beneficia los trabajos de cultivo de tejidos. Quizás la única desventaja yace también en la cantidad de tejido colectada, ya que es menor que la obtenida por otros sistemas. Se muestra a continuación un resumen comparativo de los sistemas de muestreo ilustrados:

AUTOR	Winn <i>et al.</i> , 1973 (Medway, 1983)
UNIDAD DE DISPARO	fusil
FLECHAS	metálicas
DARDO	cilindro de acero inoxidable con 3 dientes insertos en la pared interna del dardo para la retención de la muestra. Topes externos para evitar que el dardo penetre más en la piel (Figura 9)
DISTANCIA DEL DISPARO	calculada para disparos a distancias mayores a los 20 m.; en pequeños cetáceos los disparos se hacen cuando éstos están aproximadamente a 60 cm bajo el agua
RECUPERACIÓN DEL DARDO	línea de pesca
EFICIENCIA	-
PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA	-
VENTAJAS	-
DESVENTAJAS	costo de fabricación, potencia del disparo -sobre todo en pequeños cetáceos- el ruido del disparo

AUTOR	Lambertsen, 1987
UNIDAD DE DISPARO	ballesta de 68 kg de empuje (Figura 8)
FLECHAS	metálicas
DARDO	cilindro metálico con dientes en bordes interiores para retención de la biopsia de piel (Figura 10)
DISTANCIA DEL DISPARO	-
RECUPERACIÓN DEL DARDO	línea de pesca de 24 kg de resistencia inserta en la unidad de proyección (Figura 8)
EFICIENCIA	-
PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA	-
VENTAJAS	-
DESVENTAJAS	flechas pesadas que se pierden con facilidad; la línea de pesca reduce la potencia del disparo, puede enredarse en sí misma, en el animal y/o romperse

AUTOR	Mathews <i>et al.</i> , 1988
UNIDAD DE DISPARO	ballesta -máximo de potencia de impacto : 11.3 kg
FLECHAS	aluminio
DARDO	cilindro metálico de 6 mm de diámetro y 10 mm de longitud con una guía de metal que hace que este gire al hacer contacto con la piel. Lleva un collarín de hule que lo hace rebotar una vez tomada la muestra (Figura 12)
DISTANCIA DEL DISPARO	rango de 10 - 25 m
RECUPERACION DEL DARDO	flotador en la base de inserción del dardo
EFICIENCIA	-
PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA	empleo de un laboratorio ambulante: caja sellada con orificios para la entrada de las manos. La caja cuenta con lámpara de luz y ventilador ultravioleta (Figura 30)
VENTAJAS	facilita el proceso del disparo y el de recuperación de las flechas; protege de la contaminación a las muestras obtenidas
DESVENTAJAS	distancia del disparo -puede verse más afectada por el viento- ; la guía de metal puede dañar la muestra

AUTOR	Medrano, 1993
UNIDAD DE DISPARO	ballesta de 23-69 kg de empuje (Figura 18)
FLECHAS	aluminio
DARDO	cilindro metálico a manera de sacabocados de 5mm de diámetro exterior y 3 mm de diámetro interior sin accesorios para la retención de la piel (Figura 13)
DISTANCIA DEL DISPARO	óptima: 5 - 15 m
RECUPERACION DEL DARDO	flotador en la base de inserción del dardo
EFICIENCIA	70% medida como muestras obtenidas por disparo (Medrano <i>et al.</i> , 1996)
PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA	campana de acrílico, técnica directa de obtención de preparaciones cromosómicas (Figura 18)
VENTAJAS	fabricación sencilla y bajos costos de la misma, manejo sencillo en el campo, mejor conservación de la muestra
DESVENTAJAS	la cantidad de tejido obtenida es más reducida, la retención de la muestra es ligeramente menor

Comentarios sobre la eficiencia del sistema utilizado

Se obtuvo una eficiencia global del 70% medida como el número de muestras obtenidas por disparo. La distancia óptima varía entre los 5 y los 15 m y se ha visto que no se obtienen muestras en disparos realizados a distancias mayores a los 16m usando ballestas con 23 kg de empuje (Medrano *et al.*, 1996). Hasta la fecha no se tienen casos de flechas perdidas, y las muestras se obtienen en muy buen estado para procesamiento de análisis citogenético (Figura 23).

Efecto de la toma de muestra en los cetáceos en vida libre

Se observó una reacción evidente de los cetáceos muestreados, definida como una sacudida en forma dorsoventral realizada con la aleta caudal (Weinrich *et al.*, 1991), previa a una inmersión. La respuesta de los animales al impacto del dardo varía desde una inmersión pronta, hasta el golpe violento con la aleta caudal. Dichas respuestas están en función del estrés al que esté sujeto el animal antes, durante y después de la toma de la biopsia: es decir, si no se le perturba más después de haberse tomado la muestra de piel, las respuestas que los animales lleguen a presentar son temporales, sin que se hayan visto efectos a largo plazo (Weinrich *et al.*, 1991).

En el trabajo en el campo la respuesta registrada fue de un 60% (Medrano *et al.*, 1996), menor al 75% reportado por otros autores (Weinrich *et al.*, 1991). La experiencia demuestra que estas reacciones de los animales son mayores a distancias menores y con disparos realizados en forma oblicua. La sacudida con la aleta caudal parece un reflejo

espinal (Lambertsen y Duffield, 1987). Como ya se ha indicado, uno de los factores que afectan directamente la toma de las biopsias de piel es la conducta de los animales. Se ha visto que, cuando la embarcación suspende la persecución, los animales recuperan sus actividades en un tiempo menor a una hora. Esta información concuerda con lo reportado por Medrano *et al.* (1996) respecto al efecto que tienen las embarcaciones en la conducta de los animales, es decir que el tránsito de éstas afectan más a los animales que el proceso mismo de la toma de la muestra; se tienen registros en un área de Bahía de Banderas, Nay., que muestran que la ocurrencia de los animales en superficie es mayor cuando hay menos embarcaciones (Medrano *et al.*, 1996; Figura 30).

Procesamiento de las muestras en el campo.

Los resultados obtenidos con las técnicas de cultivo de tejidos a partir de fibroblastos no rindieron resultados satisfactorios. En trabajos anteriores (Medrano, 1993), la muestra obtenida se limpiaba con solución salina isotónica, se cortaba y empacaba en frío para su posterior procesamiento en laboratorios de la ciudad de México tal como ha sido descrito. Hasta donde abarca la presente revisión, no se obtuvieron resultados positivos. La matriz extracelular en la piel de los cetáceos es muy fuerte y no permite que las células se liberen durante los procesos de digestión enzimática; las pocas células aisladas y viables no son suficientes para generar un medio favorable para su crecimiento *in vitro* (Jakoby y Pastan, 1979). Se realizaron ensayos con distintos tratamientos enzimáticos para disgregar las células: se empleó una mezcla de colagenasa-elastasa para

dicho efecto sin obtener resultados favorables, puesto que las células liberadas estaban maltratadas y, por tanto, no pudieron adherirse al sustrato y murieron en poco tiempo.

Los fibroblastos son células activas encargadas de la producción de la matriz extracelular que se encuentran en tejidos en proceso de cicatrización y en los conectivos jóvenes. Su número y su actividad disminuye de manera inversa al desarrollo y madurez del tejido. Las células resultantes se denominan fibrocitos (Windle, 1976). En un proceso normal de cultivo de tejidos, los fibroblastos se multiplican, y posteriormente, se desplazan hacia la superficie del medio, mediante la emisión de pseudópodos sobre una de sus caras (Maillet, 1978). Se sabe que los tejidos de mamíferos son más difíciles de cultivar cuando la edad del animal aumenta y además existen factores que pueden actuar como inhibidores de la actividad de los fibroblastos (Costero *et al.*, 1954). Se observó que las muestras obtenidas no proliferaban y se intuyó, por consiguiente, que éstas entraron en un período de latencia. Es importante considerar que este tipo de células es frágil y su actividad puede inhibirse por la acción de algunos factores como los que se mencionan a continuación:

La edad - las células superficiales de la piel de los cetáceos tienen un tiempo de vida corto; de hecho, Geraci *et al.*, (1986) mencionaron que estas células son viejas al llegar a la superficie de la piel. Otro factor es la edad del animal muestreado, misma que se desconoce al momento de tomar la biopsia y que pudiera tener influencia en la obtención de cultivos viables.

Los **antibióticos** - Ruíz (1988) y Mathews *et al.*, (1988) indicaron los efectos que ocasionan las altas concentraciones de antibióticos; éstos pueden actuar como inhibidores de la actividad de los fibroblastos.

La temperatura - Las muestras se transportan en frío hacia los laboratorios. Aún cuando éstas nunca fueron congeladas, se sabe que la baja temperatura detiene toda la actividad celular; es muy posible que esta variable, combinada con el tiempo de transporte -indicado anteriormente-, bloquearan toda la actividad de los fibroblastos puesto que las líneas de cultivo consumieron poco medio de cultivo, aún con el empleo de distintos tipos (RPMI-1640, Mc Coy 5A, Mc Coy 5A-modificado, MEM) y de agentes para suplementar los medios (L-glutamina, suero fetal de bovino y aminoácidos no esenciales).

En el presente trabajo, se combinaron ambos procesos: el de cultivo y el de cosecha directa. La aplicación de esta técnica, implementada en el Laboratorio de Genética del Hospital General de México, se basó en las experiencias obtenidas por el autor en el campo en 1991 y 1992, en los resultados de los trabajos realizados por Medrano (1993), Medrano *et al.* (1996) y en un análisis cuidadoso de la literatura consultada.

Se realizaron modificaciones menores al método implementado en aspectos como la limpieza y el transporte de la muestra. La utilización del medio de cultivo L-15 dio excelentes resultados, puesto que no hubo indicio de contaminación ni en las muestras obtenidas ni en los cultivos elaborados a partir de éstas.

En un procedimiento normal de cultivo de vellosidades coriónicas, las muestras pasan por el siguiente proceso:

- evaluación
- transferencia a medio de cultivo e incubación por 24 hrs.
- reevaluación y limpieza
- tripsinización y bloqueo de las mitosis con colcemida.

A partir de la tripsinización, las muestras pasan por dos fases: la cosecha en técnica directa y el procedimiento de cultivo *per se*. En esta última parte se emplea la colagenasa para complementar la disgregación celular (Freshney, 1983; Simoni *et al.*, 1983; Índice Merck, 1983; Niazi *et al.*, 1988; Keberg, 1989; Biochemical Organic Compounds for Research and Diagnostic Reagents, 1992).

Para el trabajo en el *laboratorio portátil*, la caja de acrílico descrita (Figura 18), se realizaron también algunas modificaciones con el fin de reducir al máximo las posibilidades de contaminación. En términos generales, estas modificaciones consistieron en disponer de los reactivos de una manera más rápida y práctica, sin embargo, las condiciones en el campo no facilitaron la labor.

El mayor obstáculo es el espacio: no se cuenta con un área de trabajo específica y se tuvo que trabajar en casas que los pescadores generosamente ofrecían o al aire libre en el campamento. A continuación se hace mención de los principales obstáculos que se presentan al trabajar en el campo:

En un procedimiento normal de cultivo de vellosidades coriónicas, las muestras pasan por el siguiente proceso:

- evaluación
- transferencia a medio de cultivo e incubación por 24 hrs.
- reevaluación y limpieza
- tripsinización y bloqueo de las mitosis con colcemida.

A partir de la tripsinización, las muestras pasan por dos fases: la cosecha en técnica directa y el procedimiento de cultivo *per se*. En esta última parte se emplea la colagenasa para complementar la disgregación celular (Freshney, 1983; Simoni *et al.*, 1983; Índice Merck, 1983; Niazi *et al.*, 1988; Keberg, 1989; Biochemical Organic Compounds for Research and Diagnostic Reagents, 1992).

Para el trabajo en el *laboratorio portátil*, la caja de acrílico descrita (Figura 18), se realizaron también algunas modificaciones con el fin de reducir al máximo las posibilidades de contaminación. En términos generales, estas modificaciones consistieron en disponer de los reactivos de una manera más rápida y práctica, sin embargo, las condiciones en el campo no facilitaron la labor.

El mayor obstáculo es el espacio: no se cuenta con un área de trabajo específica y se tuvo que trabajar en casas que los pescadores generosamente ofrecían o al aire libre en el campamento. A continuación se hace mención de los principales obstáculos que se presentan al trabajar en el campo:

Area de trabajo - el trabajo se realiza prácticamente en espacio abierto e inadecuado para mantener los reactivos, el material o la centrifuga. Asimismo, se carece de una instalación eléctrica adecuada.

Tiempo de trabajo - en un proceso de cultivo de tejidos y su cosecha en el laboratorio, el tiempo aproximado de trabajo es de 3 a 5 horas; la labor en el campo y las condiciones a las que se está sujeto hacen más largo el proceso.

Material necesario - las centrifugas y los microscopios requieren de cuidados extremos para su transporte. Se empleó una centrifuga de campo que fue muy difícil de calibrar y que alcanzó un promedio de 800 rpm de las 3500 rpm requeridas en los protocolos de cultivo y cosecha de tejidos consultados. La carencia de un area de trabajo adecuada limitó el procesamiento de las muestras: no hubo oportunidad de verificar ni la acción enzimática -tiempos y volúmenes-, ni la calidad de las mitosis obtenidas. Estos últimos, son dos aspectos de gran importancia que afectan los resultados.

El control de la temperatura - el sitio carece de sistemas de refrigeración y de incubación lo que contribuyó a que las enzimas empleadas se desnaturalizaran y perdieran actividad e incluso llegaron a contaminarse.

Algunos de los autores consultados (Lambertsen y Duffield, 1987; Mathews *et al.*, 1988; Lambertsen *et al.*, 1988) han resuelto las limitaciones antes mencionadas con el apoyo de laboratorios y equipos especializados donde el único obstáculo a salvar es el

transporte de las muestras obtenidas. Lambertsen y Duffield (1987) Lambertsen *et al.* (1988), reportaron que el fracaso en la obtención de mitosis analizables se debió principalmente al retraso en la llegada de las muestras hacia el laboratorio. Mathews *et al.* (1988), por su parte, informaron haber logrado cultivos celulares en el campo con la ayuda de un *laboratorio portátil*, que es una caja metálica sellada con dos aberturas hacia el frente por las que pueden meter las manos para manipular las muestras. Esta caja cuenta con un ventilador eléctrico y una lámpara de luz ultravioleta (Figura 30).

Una solución posible a las dificultades técnicas arriba mencionadas, es contar con la colaboración de laboratorios y personal especializados en el cultivo de tejidos; otra alternativa puede ser acondicionar un medio de transporte como un remolque, por ejemplo, de manera que en éste se reproduzcan, hasta donde sea posible, las condiciones de esterilidad necesarias para obtener buenos cultivos de células y preparaciones cromosómicas. Dicho transporte deberá contar con corriente eléctrica e instalación de gas, y ser acondicionado para trabajar en él. Asimismo, se deberá contar con centrifugas y microscopios específicos para este tipo de análisis. Los resultados analizados en el presente trabajo muestran las dificultades a las que hay que enfrentarse al cultivar células de piel obtenidas de cetáceos en vida libre. Aunado a las bajas probabilidades de éxito en la obtención de preparaciones cromosómicas, la difícil interpretación de los datos cariológicos hace a otro tipo de estudios, como los de genética molecular, más atractivos para ser aplicados al estudio de poblaciones de cetáceos en libertad.

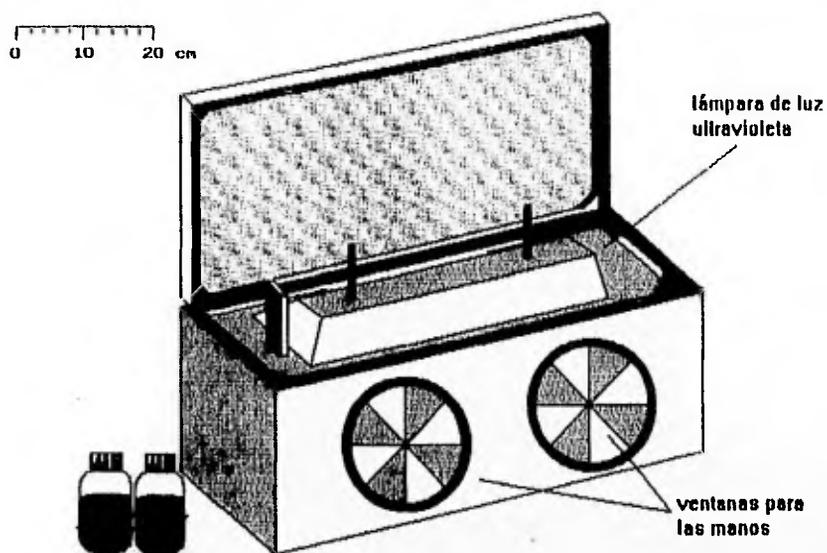


Figura 30. Dispositivo empleado por Mathews *et al.* (1988) para procesar biopsias de cetáceos en vida libre.

Diversos autores, como Lambertsen *et al.* (1988); Medrano (1993) y Medrano *et al.* (1996) han señalado las ventajas y desventajas que conllevan los estudios de las poblaciones de cetáceos mediante análisis citogenéticos. Por otra parte, los resultados obtenidos con los trabajos enfocados al análisis de poblaciones a través de métodos moleculares como los reportados por Hoelzel y Dover (1988); Amos y Hoelzel (1990); Amos *et al.* (1991); Amason, y Widegren (1984 a, b); Baker *et al.* (1991) y Duffield y Wells (1991), han aportado información que ha sido utilizada en estudios destinados a la identificación del sexo y a la caracterización de poblaciones de cetáceos en vida libre.

Otros trabajos, como el de Amos *et al.* (1992), informan sobre la utilización de descamaciones de piel de cetáceos en libertad, y su utilidad en el análisis de éstas a nivel molecular. Dicha información bien podría hacer las biopsias de piel innecesarias. No obstante, es importante tener presente que, para lograr un avance firme y palpable en el conocimiento de los mamíferos marinos, el investigador no debe apegarse a una sola técnica o disciplina por innovadora y atractiva que pueda parecer, sino que es necesario integrar la información que proporciona la conjunción de distintas disciplinas de estudio.

CONCLUSIONES

I. Logros

Los resultados muestran que tanto con los procedimientos anteriores como con los implementados para el presente trabajo se lograron obtener muestras adecuadas e íntegras para el cultivo de tejidos y estudios moleculares e histoquímicos.

El procesamiento en el campo desde la obtención de las biopsias hasta el trabajo preliminar de preparación de laminillas y el transporte del tejido se logró sin problemas de contaminación.

En la fase IV del trabajo, se logró obtener una metafase analizable (aunque pequeña), demostrándose así que la técnica aplicada es de utilidad, aunque se requiere mayor trabajo, como experimentar más, y mejorar las condiciones de trabajo en el campo con el fin de definir una técnica más eficaz para aplicarse en estudios poblacionales de cetáceos.

II. Problemas

Si bien el resultado obtenido en este trabajo es satisfactorio, el aislamiento de las células continúa siendo difícil, en virtud de la fuerte matriz extracelular presente en la piel de los cetáceos. En los trabajos anteriores se empleó una mezcla de colagenasa-elastasa y DNAsa para disgregar a las células sin que se obtuvieran buenos resultados. Es posible que las células en cultivo, aunque vivas, carezcan de actividad mitótica, inducida tal vez por los efectos del enfriamiento y el ataque con antibióticos. En opinión del autor, las células entran en una especie de *letargo* del que no fue posible sacarlas (Kruse, 1972; Fresliney, 1972; Jakoby y Pastán, 1979). Estos resultados refuerzan la idea de que, si se desea continuar con los trabajos en citogenética de cetáceos, la mejor opción es la obtención de preparaciones cromosómicas por técnica directa en el campo, a falta de recursos y de una infraestructura para poder realizarlos en un laboratorio de campo.

III. Perspectivas

Los resultados de este trabajo son adelantos promisorios. No son, de ninguna manera, un resultado óptimo, puesto que se requiere de un mayor número de pruebas de la técnica directa, así como de mejorar las condiciones de trabajo en el campo.

Los resultados obtenidos con las muestras de sangre de cetáceos en cautiverio, son una opción que bien puede ser aplicada en poblaciones de lobos marinos que se estudian actualmente mediante técnicas de marcaje-captura-recaptura.

La obtención de preparaciones cromosómicas a partir de biopsias de piel de cetáceos en vida libre es una tarea que enfrenta numerosos obstáculos debido a la dificultad que existe en el cultivo, el procesamiento de las mismas y la interpretación de los resultados. Sin embargo, los estudios citogenéticos son necesarios para establecer una base de estudio sobre la relación y la estructura de poblaciones de cetáceos, puesto que revelan heteromorfismos o variantes cromosómicas en los cariotipos que pueden emplearse como **marcadores genéticos, los cuales a su vez, ayudan a investigar las relaciones genéticas entre poblaciones de cetáceos que no están aisladas.** En conjunción con los estudios moleculares, que ya se realizan en el país, los estudios citogenéticos son de gran utilidad para el conocimiento de los cetáceos y, en general, de los mamíferos marinos en México.

Apéndice 1

Especies de cetáceos de los que se ha descrito el cariotipo.
De acuerdo con la clasificación de Barnes *et al.* (1985):

ORDEN CETACEA

Suborden Mysticeti

Familia Balainidae

Balaena mysticetus (Jarrel, 1979)

Familia Eschrichtidae

Eschrichtius robustus (Arnason, 1974 y 1981)

Familia Balainopteridae

Balaenoptera physalus (Arnason, 1969)

B. acutorostrata (Arnason, 1974; Arnason *et al.*, 1977)

B. borealis (Kasuya, 1966; Arnason, 1970 y 1974)

B. musculus (Arnason, *et al.* 1985)

Subfamilia Megapterinae

Megaptera novaeangliae (Lambertsen y Duffield, 1987, Ruiz, 1988).

Suborden Odontoceti

Superfamilia Platanistoidea

Familia Inidae

Inia geoffrensis (Duffield *et al.*, 1971; Kulu, 1972)

Superfamilia Delphinoidea

Familia Monodontidae

Subfamilia Monodontinae

Monodon monoceros (Andrews *et al.*, 1973)

Subfamilia Delphinapterinae

Delphinapterus leucas (Jarrel y Arnason, 1981)

Familia Phocoenidae

Subfamilia Phocoenoidinae

Phocoenoides dalli (Makino, 1948; Duffield *et al.*, 1971, Yabu y Ogi, 1986).

-
- Subfamilia Phocoeninae
Phocoena phocoena (Amason, 1974)
- Familia Delphinidae
- Subfamilia Steninae
Steno bredanensis (Kulu, 1972)
- Subfamilia Delphininae
Delphinus delphis (Duffield *et al.*, 1971; Arnason, 1974)
D. bairdi (Kulu, 1972)
Lagenorhynchus obliquidens (Duffield *et al.*, 1967)
L. albirostris (Arnason, 1980)
Tursiops truncatus (Walen y Madin, 1965; Duffield, 1967)
T. gilli (Arnason, 1974)
Stenella clymene (Arnason, 1974 y 1980)
S. attenuata (Stock, 1981)
S. dubia (Arnason, 1974; Stock, 1981)
S. longirostris (Stock, 1981)
- Subfamilia Globicephalinae
Globicephala scammonii (Walen y Madin, 1965; Arnason, 1974)
G. meadana (Andersen y Friedrich, 1986)
- Subfamilia Orcininae
Orcinus orca (Duffield *et al.*, 1971; Kulu, 1972; Arnason, 1980)
- Superfamilia Ziphoidea
- Familia Ziphiidae
Ziphius cavirostris (Benirschke y Kumamoto, 1978)
Mesoplodon europaeus (Arnason *et al.*, 1977)
M. carlhubbsii (Arnason *et al.*, 1977)
- Superfamilia Physeterioidea
- Familia Physeteridae
Physeter catodon (Atwood y Ravazi, 1965; Arnason, 1970; 1981; Arnason y Benirschke, 1973)
- Familia Kogiidae
Kogia breviceps (Arnason y Benirschke, 1973)
-

Apéndice 2

Preparación de los reactivos

Medios de cultivo

- RPMI-1640

Contiene L-Glutamina; sin glucosa ni bicarbonato de sodio. De Microlab y Bioexport.

- Leibowitz (L-15)

Contiene L-Glutamina. De Microlab.

- McCoy 5A (modificado)

Contiene L- Glutamina, sin bicarbonato de sodio. De Microlab y Bioexport.

- Medio de cultivo MEM

Medio esencial mínimo (Minimal Essential Medium Eagle). Contiene sales de Earle, L-glutamina, aminoácidos no esenciales y 0.05% de lactoalbúmina hidrolizada. No contiene bicarbonato de sodio.

Para su preparación:

0.5g	glucosa
0.7g	bicarbonato de sodio
0.5ml	penicilina 1×10^6 U
0.5ml	estreptomina 1×10^6 U
0.5ml	rojo fenol (5%)
4.7g	medio de cultivo
500 ml	agua destilada
filtrado en papel Whatman 42 y swinnex GS de 22 micras	

(Seglen, 1976)

Reactivos

Fitohemaglutinina

Se extrae del *Phaseolus vulgaris*, consiste de dos especies moleculares: PHA-E y PHA-L. Ésta última: la leucoaglutinina, tiene actividad mitogénica alta, Microlab, Bioexport.

Suero fetal de bovino

Microlab, Bioexport.

Heparina

Con sales de litio, extracto de la mucosa intestinal de porcinos. Empleado como anticoagulante, Clave 621-SSA.

Solución de antibióticos

1g penicilina G (800,000 U) en 5 ml de agua estéril,
1g estreptomina (clave 2403) en 5 ml de agua estéril,
- mezclar y aforar a 10 ml (en agua estéril), tomar 1 ml de la solución y agregar a 100 ml de medio de cultivo.

Colchicina (0.02%)

$C_{22}H_{25}NO_6$ Agente mitostático; Sigma

Tripsina

Extracto de páncreas de bovino

1g Tripsina
100 ml agua destilada
0.025g EDTA

Agitar por 4 hrs., pasar por filtros de 0.22 μ

Colagenasa (Sigma)

Tipo IV Aislada a partir de *Clostridium histolyticum*. Liofilizada 500 u mg. Estándar para disolución de tejidos conjuntivos humanos y animales, particularmente, el aislamiento de hepatocitos en ratas. Contiene clostridiopeptidasa, proteasas semejantes a la tripsina, clostripaina y caseinasas.

Tipo V Especialmente usada en el estudio de la estructura del colágeno y para la desintegración de tejidos

(Tissue Culture Manual, 1972; Seglen, 1976; Biological, compounds for Research and Diagnostic Reagents, 1992).

Solución hipotónica

KCl de Sigma

Cristales-dens 1.98

1g de KCl en	2.8g	de agua
	1.8	agua dest.
	14.0 ml	glicerol
	250 ml	alcohol

A) KCl al 0.075 mol/l

B) KCl al 0.4% y citrato de sodio al 4% mezclar y aforar a 25ml previo a su empleo (solución B)

Fijador de Carnoy

Ácido acético glacial - un volumen - y metanol - tres volúmenes (proporción 1:3)

hidróxido de bario

2[Ba(OH)₂] al 1% de Sigma.

2xSSC

Solución salina citratada (citrato de sodio y cloruro de sodio) al 2.7% de Sigma.

Solución Tripsina-EDTA

Tripsina (1:250)	2.5g
EDTA 0.4 Na	0.38
Solución CMF-PBS	1 lt.

Solución CMF-PBS

Kcl	0.4g
KH ₂ PO ₄	0.06
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.1
NaCl	8.0
NaHCO ₃	0.35
Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	0.09
glucosa	1.0
agua destilada	1 lt.

(Verma y Babu, 1989)

REFERENCIAS

- Aguayo, L. A. 1982. "Biología de los Mamíferos Marinos en el Pacífico". Programa de Investigación. Laboratorio de Vertebrados. Facultad de Ciencias, UNAM. México, D. F. No publicado.
- Aguilar, A. y J. Nadal. 1984. "Obtención de biopsias hipodérmicas de cetáceos en libertad". *Investigación Pesquera*. 48, 1: 23-24.
- Álvarez, F. C. M. 1987. *Fotoidentificación del rorcuol jorobado "Megaptera novaeangliae" (Borowski 1781), en las aguas adyacentes a Isla Isabel, Nayarit*. Tesis profesional, Facultad de Ciencias UNAM. México, D. F.
- Álvarez, C. A., Aguayo, R., Rueda, y J. Urbán. 1991. "A note on the Stock size of Humpback Whales Along the Pacific Coast of Mexico". *Reports of the International Whaling Commission* (special issue 12): 191-193.
- Amos, B. y A. R. Hoelzel. 1990. "DNA Fingerprints of Cetacean Biopsy Samples for Capture Recapture Population Census". *Reports of the International Whaling Commission* (special issue 12): 79-85.
- Amos, W., Barret, J. y Dover, G. A. 1991. "Breeding Behaviour of Pilot Whales Revealed by DNA Fingerprinting". *Heredity* 67: 49-55.
- Amos, W., Whitehead, H., Ferrari, M. J., Glockner-Ferrari, D. A., Payne, R. y Jarrel G.H. 1992. "Restrictable DNA from Sloughed Cetacean Skin; its Potential for Use in Population Analysis". *Marine Mammal Science* 8, 3: 275-283.
- Andersen, L. W. y V. Friedrich. 1986. "The Karyotype of the Long Finned Pilot Whale, *Globicephala mealea*". *Hereditas* 109: 245-251.
- Andrews, J. C., Dill, F. J., Masui, S. y Fisher, H. D. 1973. "The Chromosome Complement of the Narwhal (*Monodon monoceros*). *Canadian Journal of Genetic Cytology* 15, 2: 349-352.
- Arakaki, D. T. y R. S. Sparkes. 1963. "Microtechnique for Culturing Leucocytes from Whole Blood". *Cytogenetics* 2:57.
- Ámason, U. 1969. "The Karyotype of the Fin Whale". *Hereditas* 62: 273-284.

-
- Árnason, U. 1970. Karyotypes of a Male Sperm Whale (*Physeter catodon* L.) and a Female Sei Whale (*Balaenoptera borealis* LESS.). *Hereditas* 64: 291-193.
 - Árnason, U. 1972. "The role of Chromosomal Rearrangement in Mammalian Speciation with Special Reference to Cetacea and Pinnipedia". *Hereditas* 70: 113-118.
 - Árnason, U. 1974. "Comparative Chromosome Studies in Cetacea". *Hereditas* 77: 1-36.
 - Árnason, U. 1980. "C- and G- Banded Karyotypes of three Delphinids: *Stenella chymene*, *Lagenorhynchus albirostris* and *Phocoena phocaeni*". *Hereditas* 92: 197-187.
 - Árnason, U. 1981. "Banding Studies on the Gray and the Sperm Whale Karyotypes". *Hereditas* 95: 277-281.
 - Árnason, U. 1982. "Karyotype stability in marine mammals". *Cytogenetics. Cell Genetics*. 33: 274-276.
 - Árnason, U. y Benirschke, K. 1973. "Karyotypes and Idiograms of Sperm and Pigmy Sperm Whales". *Hereditas* 75: 67-74.
 - Árnason, U. y B. Widegren. 1984A. "Studies on ribosomal DNA in Cetaceans (Whales)". *Hereditas* 101: 149-154.
 - Árnason, U. y B. Widegren. 1984B. "Different Rates of Divergence in Highly repetitive DNA of Cetaceans". *Hereditas* 101: 171-177.
 - Árnason, U., Benirschke, K., Mead, J. G. y Nichols, W. W. 1977. "Banded Karyotype of three Whales: *Mesoplodon europaeus*, *Mesoplodon carlhubbsi* and *Balaenoptera acutorostrata*". *Hereditas* 87: 189-200.
 - Árnason, U., Purdom, Y. F. y Jones, K. W. 1978. "Conservation and Chromosomal Localization of DNA Satellites in Balaenopterid Whales". *Chromosoma (Berl.)* 66: 141-159.
 - Árnason, U., Lutley, R. y Sandholt, B. 1980. "Banding Studies on six Killer Whales: an Account of C-Band Polymorphism and G-Band Patterns". *Cytogenetic Cell Genetics* 28: 71-78.
 - Árnason, U., Bellamy, H., Eypórrsson, P., Lutley, R., Sigurjónsson, J. y Widegren, B. 1985. "Conventionally Stained and C-Banded Karyotypes of a Female Blue Whale". *Hereditas* 102: 251-253.

-
- Árnason, U., Spillaert, R., Palsdóttir, A. y Árnason, A. 1991. "Molecular Identification of Hybrids between the two Largest Whale Species, the Blue Whale (*Balaenoptera musculus*) and the Fin Whale (*B. physalus*)". *Hereditas* 115: 183-189.
 - Atwood, R. P. y L. Ravazi. 1965. "Chromosomes of the Sperm Whale". *Nature* 207: 328.
 - Avers, C. J. 1983. *Biología Celular*. Grupo Editorial Iberoamérica. Cap. 11, p.377 México. D.F.
 - Ayala, F.J. 1978. "The Mechanisms of Evolution". *Scientific American* 239, 3:38-61.
 - Baker, C. S., Perry, A. y Herman, L. M. 1987a. "Reproductive Histories of Female Humpback Whales, *Megaptera novaeangliae* in the North Pacific". *Marine Ecology Progress Series* 41: 103-114.
 - Baker, R. J., Qumsiyeh, M. B. y Hook, C. S. 1987b. "Role of Chromosomal Banding Patterns in Understanding Mammalian Evolution" p. 67-95. En Genways H.H. (ed). *Current Mammology*, VI.
 - Baker, C.S., Lambertsen, R.H., Weinrich, M.T., Calambokidis, J., Early, G. y O'Brien, S.J. 1991. "Molecular Genetic Identification of the Sex of Humpback Whales (*Megaptera novaeangliae*). Reports of the International Whaling Commission (special issue 13): 105-111.
 - Baker, C. S., Perry, A., Bannister, J. L., Weinrich, M. J., Calambokidis, J., Lien, J., Lambertsen, R. H., Urbán, J. R., Vázquez, O., Clapham, P. J., Alleng, A., O'Brien, S. J., y Palumbi, S. R. 1993. "Abundant Mitochondrial DNA Variation and World-Wide Population Structure in Humpback Whales. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 90:8239-8243.
 - Barnes, L.G., Domning, D.P. y Ray, C.E. 1985. "Status of Studies on Fossil Marine Mammals". *Marine Mammal Science* 1, 1: 15-53.
 - Basur, P. K., Basur, V. R. y Gilman, J. P. W. 1962. "A simple Method for Short Term Cultures from Small Biopsies". *Experimental Cell Research* 30: 229-232.
 - Benirschke, K. y A. Kumamoto. 1978. "The Chromosomes of Cuvier's Beaked Whale, *Ziphius cavirostris*". *Mammal Chromosomes Newsletters* 19(3): 70-72.
 - Bernardi, G., Olofsson, B., Filipski, J., Zerial, M., Salinas, J., Cuny, G., Meunier-Rotival, M. y Rodier, F. 1985. "The Mosaic Genome of Warm-Blooded Vertebrates". *Science* 228: 953-958.
-

-
- Bernardi, G. y Bernardi, G. 1986 "Compositional Constraints and Genome Evolution". *Journal of Molecular Evolution* 24: 1-11.
 - Bianchi, N. O. 1978. "Duplicación cromosómica y heterocromatina a nivel molecular y citogenético". *Monografía de la Secretaría General de la OEA*, Washington. p 1-10 y 45.
 - *Biochemical Organic Compounds for Research and Diagnostic Reagents*. SIGMA Chemical Company. 1992.
 - Brown, S. W. 1966. "Heterochromatin". *Science* 151: 417 - 425.
 - Brown, M. W., Kraus, S. D. y Gaskin, D. E. 1991. "Reaction of North Atlantic Right Whales (*Eubalaena glacialis*) to Skin Biopsy Sampling for Genetic and Pollutant Analysis". *Reports of the International Whaling Commission*(special issue 13): 81-89.
 - Bush, G. L., Case, S. M., Wilson, A. C. y Patton, J. L. 1977. "Rapid Speciation and Chromosomal Evolution in Mammals". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 74: 3942-3946.
 - Campos, R. 1989. *Fotoidentificación y comportamiento del rorcual jorobado, "Megaptera novaeangliae" (Borowski 1781), en las aguas adyacentes al Archipiélago de Revillagigedo, Méx.* Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. México, D. F.
 - Cadavid, L. E. y B. S. Romero 1994. *Metodologías para la caracterización del cariotipo y determinación electroforética de proteínas sanguíneas en delfines de la especie "Sotalia fluviatilis."* Tesis de pregrado. Facultad de Biología Marina, Fundación Universitaria de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. 110p.
 - Caspersson ,T., Farber, S., Followy, E., Kudynowski, J., Modest, E. J., Simonsson, E., Wagh W., y Zech, L. 1968. "Chemical Differentiation along Metaphase Chromosomes". *Experimental Cell Research* 49: 219.
 - Caspersson ,T., Lomakka, G. y Zech, L. 1971. "The 24 Fluorochrome Patterns of the Human Metaphase Chromosomes -distinguishing characters and variability". *Hereditas* 67: 89.
 - Cavalier-Smith, T. 1985. *The evolution of Genome Size*. Wiley, New York, NY.
 - Claphan, P. J. y Mattila, D. K. 1993. "Reactions of Humpback Whales to Skin Biopsy Sampling on a West Indies Breeding Ground". *Marine Mammal Science*, 9, 4: 382-391.

-
- Cervantes, A. 1983. *Estructura molecular de los cromosomas humanos: su correlación con las técnicas de Bando y su aplicación a la clínica*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Medicina. UNAM. México, D. F.
 - Conferencia de París. (1971). *Standardization in human cytogenetics. Birth Defects, Original Article Series. XI: 9*. The National Foundation. New York, NY.
 - Conferencia de París. (1972). *Standardization in human cytogenetics. Birth Defects, Original Article Series. VIII: 7*. The National Foundation. New York, NY.
 - Cohn, J. 1990. "Genetics for Wildlife Conservation". *Bioscience*, **40**, 3: 167-171.
 - Costero, Y., Barroso-Moguel, R., Pomerat, C. M. y Chévez, A. 1954. "Caracterización del Sistema Fibroblástico II. Fibrogénesis intracelular en tejido conectivo cultivado. Trabajo presentado a la Sociedad Mexicana de Cardiología. México, D. F.
 - Darlington, C. D. 1937. *Recent advances in Cytology*. Churchill, London.
 - Delgado-Casarin, F. 1988. *Hallazgos hematológicos de "Orcinus orca" a la altura de la Ciudad de México*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. México, D. F.
 - Doolittle, W.F. 1982. "Selfish DNA after Fourteen Months". p. 3 - 28. En: G. A. Dover y R.B. Flavell (eds), *Genome Evolution*. Academic Press, New York.
 - Duffield, D. A., Ridgeway, S. H. y Sparkes, R. S. 1967. "Cytogenetic Studies of two Species of Porpoises". *Nature* 213: 189-190.
 - Duffield, D. A., Veomett, I. y Sparkes, R. S. 1971. "Cytogenetic Comparisons of four Species of Cetaceans". *Journal of Mammalogy*. **52**, 4: 828-832.
 - Duffield, D.A. y R.S. Wells 1991. "The Combined Application of Chromosome Protein and Molecular Data for the Investigation of Social Unit Structure and Dynamics in *Tursiops truncatus*". *Reports of the International Whaling Commission* (special issue 13): 155-169.
 - Dutrillaux, B. y J. Couturier. 1972. "Techniques d'analyses chromosomiques". p.5. En: L. Hartmann et J. LeJeune, *Biologie génétique* (Monographie annuelle de la Société Française de Biologie Clinique). Paris. *Expansion Scientifique*.

-
- Flavell, R. B. 1982 "Sequence Amplification, Deletion and Rearrangement". p. 301 - 323. En: G. A. Dover y R.B. Flavell (eds). *Genome Evolution*. Academic Press, New York.
 - Freshney, R. I. 1983. *Culture of Animal Cells: A manual of Basic Technique*. Alan R. Liss. New York, N.Y., p. 99,113-116.
 - Gales, R. S. 1966. "Pick up, Analysis and Interpretation of Underwater Acoustic Data". p. 435-444. En: Norris (ed.) *Whales, Dolphins and Porpoises*. University of California Press. Berkeley and L. A., CA.
 - Garber, E. D. 1972. *Cytogenetics: An Introduction*. Mc Graw Hill Book Co. Cap. 1. p. 1- 26.
 - Gaskin, D.E. 1982. *The Ecology of Whales and Dolphins*. Heinemann, London and Exeter and New Hampshire. Cap. 8, p. 279-289.
 - Geraci, J. R., St. Aubin, D. J. y Hicks, B. D. 1986. "The Epidermis of Odontocetes: a View from within". p. 3-22. En: M. M. Bryden y R. Harrison (eds.) *Research on Dolphins*. Clarendon Press. Oxford. Part I.
 - Glockner D. A. 1983. "Determining the Sex of Humpback Whales (*Megaptera novaeangliae*) in their Natural Environment. pp. 447-464. En R. Payne (ed). *Communication and Behavior of Whales*. Westview Press Boulder, Colo.
 - Glockner, D. A. y Venus, S. 1983. "Identification, Growth Rate and Behavior of Humpback Whales (*Megaptera novaeangliae*) Cows and Calves in the Waters of Maui, Hawaii. 1977-1979". p.223-258. En: R. Payne (ed). *Communication and behavior of Whales*. Westview Press Boulder, Colo.
 - Gómez-Eichelmann, M. C. 1987. "Estrategias de regulación de la expresión genética". *Mensaje Bioquímica*. vol.X: 15 - 62. Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.
 - Gosden, J. R., Mitchell, A. R., Gosden, C. M., Roedeck, C. H. y Morsman, J. 1982. "Direct Vision Chorion Biopsy and Chromosome Specific DNA Probes for Documentation of Fetal Sex in first Trimester Prenatal D". *Lancet* 2:163.
 - Greenwood, A. G., Harrison, R. J. y Whiting, H. W. 1974. "Functional and Pathological Aspects of the Skin of Marine Mammals". p. 73-100. En: R. J. Harrison (ed). *Functional anatomy of marine Mammals*. Vol. 2, Academic Press, New York.
 - Grouchy, J. de, Roubin, M. y Billardon, C. 1970. "Etudes chromosomiques à partir de Cultures cellulaires. Modifications Techniques". *Ann. Génétique* 13:141-143.
-

-
- ISCN. 1985. *An International System for Human Cytogenetics Nomenclature*. Birth Defects Original Article Services 21(1) The National Foundation March of Dimes, New York, NY.
 - Harnden, D. G. 1960. "A Human Skin Culture Technique used for Cytological Examination". *British Journal of Experimental Pathways* 41: 31.
 - Harrison, R. J. y Thurley, K. W. 1974. "Structure of the Epidermis in *Tursiops*, *Delphinus*, *Orcinus* and *Phocoena*". 2: 45-71 En: R. J. Harrison (ed). *Functional Anatomy of Marine Mammals*. Academic Press, London and New York.
 - Heitz, J. 1926. "Vaisseaux". En: *Traité de Pathologie Médicale et de thérapeutique appliquée. Appareil circulatoire*. Leconte, Bosviel et Grellety. Paris.
 - Hicks, B. D., St. Aubin, D. J., Geraci, J. R. y Brown, W. R. 1985. "Epidermal growth in the bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*". *Journal of Investigation in Dermatology* 85, 60-5.
 - Hoelzel, A. R. y G. A. Dover. 1988. "Molecular Techniques for Examining Genetic Variation and Stock Identity in Cetacean Species". *Reports for the International Whaling Commission (SC/39/07)*.
 - Hoelzel, A. R., Hancock, J. M. y Dover, G. A. 1992. "Evolution of the Cetacean Mitochondrial D-loop region". *Molecular Biology and Evolution* 8: 475-493.
 - Hsu, T.C. 1975. "A possible Function of Constitutive Heterochromatin: The Bodyguard Hypothesis". *Genetics* 79(supplement): 135-150.
 - Hsu, T.C. y Arrighi F.E. 1971. "Distribution of Constitutive Heterochromatin in Mammalian Chromosomes". *Chromosoma (Berl.)* 34, 243-253.
 - Hsu, T. C. y Pomerat, C. M. 1953. "Mammalian Chromosomes *in vitro*. II. A Method for Spreading the Chromosomes of Cells in Tissue Culture". *Journal of Heredity* 44: 23-29.
 - Jacky, P. B. y F. J. Dill. 1980. "Expression in Fibroblast Culture of the Satellited X-Chromosome Associated with Familial Sex-linked Mental Retardation". *Human Genetics* 50: 247-251.
 - Jakoby, W. B. y Y. H. Pastan, (eds.) 1979. *Cell Culture. Methods in Enzymology* 58. Academic Press, London.

-
- Jarrel, G. H. 1979. "Karyotype of the Bowhead Whale (*Balaena mysticetus*)". *Journal of Mammalogy* 60: 607- 610.
 - Jarrel, G. H. y U. Ámason. 1981. "Banded Karyotypes of a Belukha Whale, *Delphinapterus leucas*". *Hereditas* 95: 37-41.
 - Jarrel, G. H. 1984. "Adaptative radiation of Whales: Is Constitutive Heterochromatin an intrinsic Isolation Mechanism?" *Evolutionary Theory*:7:53-62.
 - Jeffreys, A. J., Wilson, V. y Thein, S. L. 1985. "Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA". *Nature* 314: 67-73.
 - Kasuya, T. 1966. "Karyotype of a sei whale". *Scientific Reports to the Whales Research Institute (Tokyo)* 20: 83-88.
 - Katona, S., Baxter, H., Brazier, O., Kraus, S., Perkins, J. y Whitehead, H. 1979. "Identification of Humpback Whales by Fluke Photographs". p. 33-44. En: H.E. Winn y B.L. Olla. (eds). *Behavior of Marine Mammals - Current Perspectives in Research*. Vol. 3. Cetaceans. Plenn. Press, New York
 - *Keberg Cytogenetics Laboratory Procedure Manual*. 1989. Baylor College of Medicine.
 - Komberg, R. 1974. "Chromatin Structure: A repeating unit of Histones and DNA". *Science*. 184:868.
 - Kulu, D. D. 1972. "Evolution and Cytogenetics".p. 503-527. en: Ridgway, S. H. (ed). *Mammals of the Sea. Biology and Medicine*. Charles C. Thomas Publisher.
 - Kruse, P. 1972. *Tissue Culture, Methods, and Applications*. Academic Press.
 - Lambertsen, R. M. 1987. "A Biopsy system for large Whales and its use for Cytogenetics". *Journal of Mammalogy* 68(2): 443 - 445.
 - Lambertsen, R.H. y D. A. Duffield. 1987. "Biopsy Studies of the Humpback Whale *Megaptera novaeangliae*". *Reports to the U.S.National Marine Fisheries Service and the Scientific Committee of International Whaling Commission*.
 - Lambertsen, R.H., Baker, C.S., Duffield, D. A. y Chamberlin-Lea, J. 1988. "Cytogenetic Determination of Sex Among Individually Identified Humpback Whales (*Megaptera novaeangliae*)". *Canadian Journal of Zoology* 66: 1243-1248.
 - Lande, R. 1991. "Application of Genetics to Management and Conservation of Cetaceans". *Reports for the International Whaling Commission*. (special issue 13):301-311.
-

-
- Lawce, H. y Hack, M. 1980. "Tissue Culture". *Human Genetics* 50: 247-251.
 - Leatherwood, S. y R. R. Reeves. 1983. *The Sierra Club Handbook of Whales and Dolphins*. Sierra Club books. San Francisco, CA.
 - León-Cázares, J. M., Sosa Segura, M. J. y Salcedo-Burke, M. 1967. "Conservación de cultivos de sangre periférica por refrigeración para la obtención de cromosomas humanos". *Anuarios del Instituto de Biología UNAM* 38, *Series de Biología Experimental* 1: 1-4.
 - Lewin, B. 1994. *Genes V*. Oxford University Press.
 - Levan, A., Fredga, K. y Sandberg, A. A. 1964. "Nomenclature for Centromeric Position Chromosomes". *Hereditas* 52: 201-220.
 - Li, W. H. y D. Graur. 1991. *Fundamentals of Molecular Evolution*. Sinaure Associates Inc. Sunderland, MA. Chapt. 8. p 204.
 - Ling, J. K. 1974. *The Integument of Marine Mammals*. p. 1-44. En: Harrison R. J. *Functional Anatomy of Marine Mammals*. Academic Press. New York, NY.
 - Luperini, S. R. 1985. *Polimorfismos cromosómicos: Metodología y Aplicación en Diagnóstico Citogenético Prenatal*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México, D. F.
 - Madin, S. H., Andriese, B. S. y Darby, N. B. 1957. "The *in vitro* Cultivation of Tissues of Domestic and Laboratory Animals". *American Journal of Veterinary Research* 18: 932.
 - Maillet, M. 1978. *Manuel de Citología*. De. Toray-Masson, S. A., Barcelona, España.
 - Makino, S. 1944. "The Chromosome Complexes of the Pig. (*Sus scrofa*)". *Zoology Magazine Tokyo*. 56: 8-15.
 - Makino, S. 1948. "The Chromosomes of Dall's Porpoise, *Phocoenoides dallii* (True), with Remarks on the Phylogenetic Relation of the Cetacea". *Chromosoma*, 3: 220-231.
 - Mathews, E. A., Keller, S. y Weiner, D. B. 1988. "A Method to Collect and Process Skin Biopsies for Cell Culture from Free Ranging Gray Whales (*Eschrichtius robustus*)". *Marine Mammal Science*, 4, 1: 1-12.
 - Medrano, L. 1987. *El cariotipo como criterio taxonómico en el orden Cetacea*. Seminario de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. México, D. F.
-

-
- Medrano, L. 1993. *Estado Genético del rorcual jorobado en el Pacífico Mexicano*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias UNAM. México, D. F.
 - Medrano, L., Miramontes, P. y Aguayo, A. 1993. "Aplicación de la teoría de Test al estudio de los cariotipos de los cetáceos". *Revista de Investigaciones Marinas* 14, 1: 50 - 61.
 - Medrano, L., Ortega, M., Corado, N. A., Vázquez, C. M. J. y Pérez, A. 1996. "Métodos de recolecta y usos de biopsias de piel de cetáceos en vida libre". *Revista de Investigación científica de la UABCS (núm. especial SOMEMMA 3)*. En prensa.
 - Medway, W. 1983. "Evaluation of the Safety and Usefulness of Techniques and Equipment Used to Obtain Biopsies from Free Swimming Cetaceans". *Reports for the National Technical Information Service from the U.S. Marine Mammal Commission*. (MMC-82/01).
 - Meléndez, R. 1991. *Polimorfismos cromosómicos y su posible correlación con aborto habitual*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina, UNAM. México, D. F.
 - *The Merck Index*. 1983. *An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals*. Martha Windholz, de Merck & Co., Inc. Rahway, N. J., U. S. A.
 - Miklós, G. L. G. 1982. "Sequencing and Manipulating Highly Repeated DNA". p: 41 - 68. En: G. A. Dover y R. B. Flavell (eds). *Genome Evolution*. Academic Press, New York, NY.
 - Miyashita, T., Kasuya, T. y Mori, K. 1990. "An Examination of the Feasibility of using Photo-Identification Techniques for a Short-finned Whale Stock of Japan". *Reports for the International Whaling Commission* (Special issue 12): 425-428.
 - Moore, S. E. 1988. "Potential of Bioacoustics in Conjunction with Photographic and DNA Identification to Examine Cetacean Stocks". *Reports to the U.S. Marine Mammal Commission*.
 - Moorehead, P. S., Nowell, R. C., McIlman, W. S., Battips, D. M. y Hungerford, D. A. 1960. "Chromosomes Preparations of Leucocytes Cultured from Peripheral Blood". *Experimental Cell Research* 20: 613-616.
 - Niazi, M., Coleman, D.V., y Loeffler, F.E. 1988. "Trophoblast Sampling in Early Pregnancy. Culture of Rapidly Dividing Cells From Immature Placental Villi". *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 88: 1081-1085.
 - Oguma, K. y Makino, S. 1946. "A New List of the Chromosome Numbers in Vertebrata". *Journal of the Faculty of Sciences Hokkaido Imp. Univ. Ser. VI, Zool.* 5, 297-356.
-

-
- Palmer, E. y G. Wedell. 1964. "The Relationship between Structure Inervation and Function of the Skin of the Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*)". *Proceedings of the Zoology Society of London*. 143: 553 - 368.
 - Palsbøll, P. J., Larsen, F. y Hansen, E. S. 1991. "Sampling of Skin Biopsies from Free-Ranging Large Cetaceans in West Greenland: Development of New Biopsy Tips and Bolt designs". *Reports for the International Whaling Commission* (special issue 13):71-79.
 - Palsbøll, P. J., Vader, A. y Bakke, Y. y Rajaat EtGeweky, M. 1992. "Determination of Gender in Cetaceans by the Polymerase Chain Reaction". *Canadian Journal of Zoology*. 70: 2166 - 2171.
 - Radway, K. (1980). *Conservation and Mangement of Whales*. University of Washington Press.
 - Ridgway, S. H. 1972. "Homeostasis in an Aquatic Environment". p.590. En: S.H. Ridgway (ed.) *Mammals of the Sea. Biology and Medicine*. Charles C.Thomas, Springfield, Illinois.
 - Romero, B. S., Cadavid, L. E., Sicard, D. y Groot, H. 1994. "Primera descripción del cariotipo de la forma marina del delfin *Sotalia fluviatilis*". *II Congreso de Genética Latinoamericana y III de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental, Pto. Vallarta, Jal. México*. Septiembre, 1994.
 - Ruiz, R.C. 1988. *Reporte sobre un método de obtención de biopsias de piel de ballena jorobada, su cultivo y uso en análisis cromosómicos*. Seminario de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. México, D. F.
 - Salamanca, F. 1983. "Desarrollo de la metodología citogenética: contribuciones al conocimiento de la estructura cromosómica y sus aplicaciones en la clínica". *Gaceta Médica de México* 119:315.
 - Salamanca, G. F. 1990. *Citogenética humana*. Editorial Médica panamericana, México, D.F. Caps. 4, 5, 6 y apéndices de metodología; p.37 - 62.
 - Sánchez, O. y J. J. Yunis. 1974. "The Relationship Between Repetitive DNA and Chromosomal Bands in Man". *Chromosoma* 48: 191-202.
 - Seglen, P. O. 1976. *Methods in Cell Biology* 13: 29.

-
- Simoni, G., Brambati, B. y Fraccaro, M. 1988. "Efficient Direct Chromosome Analyses and Enzyme Determinations from Chorionic Villi Samples in the First Trimester of Pregnancy". *Human Genetics* 63: 349-567.
 - Simpson, J. G. y M. B. Gardner. 1972. "Comparative Microscopic Anatomy of Selected Marine Mammals". p. 812. En: S.H. Ridgway (ed.) *Mammals of the Sea. Biology and Medicine*. Charles C. Thomas, Springfield, Illinois.
 - Sly, W. S. y J. Grubb. 1979. "Isolation from Fibroblasts in Patients". p. 444. En: Jakoby W. B. y Pastan Y. H. (eds) *Cell Culture. Methods in Enzymology*. v59. Cap.4
 - Smidt-Jensen, S. y N. Hahnemann. 1984. "Transabdominal Fine Needle Biopsy from Chorionic Villi in the First Trimester". *Prenatal Diagnosis* 4:163.
 - Smith, A. L., Weathersbee, P. S. y Lodge, J.R. 1972. "Whole Blood Leukocyte Culture Technique for Mammalian Cytogenetic Analysis". *Laboratory Animal Science* 26 (6): 936 - 938.
 - Steinberg, J. C. 1966. "Acoustic-video Techniques for the Observation of Cetaceans". pp.489-495. En: K. Norris *Whales, Dolphins and Porpoises*. Univ. Of California Press. Berkeley and L.A.
 - Stock, A. D. 1981. "Chromosomal Variation and Constitutive Heterochromatin in three Porpoises Species (Genus *Stenella*)". *Cytogenetics and Cell Genetics* 31: 91-100.
 - Sumner, A. T. 1972. "A Simple Technique for Demonstrating Centromeric Heterochromatin". *Experimental Cell Research* 50: 247-251.
 - Taruski, A. G., Olney, C. E. y Winn, H. E. 1975. "Chlorinated Hydrocarbons in Cetaceans". *Journal of Fisheries Board of Canada* 32: 2205-2209.
 - Therman, E. y M. Susman. 1993. "Human Chromosomes. Structure, Behavior and Effects". Springer-Verlag, Cap. 6, p. 60-69.
 - Verma, R. y A. Babu. 1989. *Human Chromosomes. Manual of Basic Techniques*. Pergamon Press. New York.
 - Walen, K. H. y S. H. Madin. 1965. "Comparative Chromosome Analysis of the Bottlenosed Dolphin (*Tursiops truncatus*) and the Pilot Whale (*Globicephala scanunonii*)". *The American Naturalist* 99: 349-354.
 - Wang, H. C. and S. Fedoroff. 1972. "Banding in Human Chromosomes Treated with Trypsin". *Nature new Biology* 235: 52-53.
-

-
- Weinrich, M. T., Lambertsen, R. H., Baker, C. S., Schilling, M. R. y Belt, R.C. 1991. "Behavioural Responses of Humpback Whales (*Megaptera novaeangliae*) in the Southern Gulf of Maine to Biopsy Sampling". *Reports of the International Whaling Commission* (Special issue 13): 91-97.
 - Wells, R. S. y M. D. Scott. 1990. "Estimating Bottlenose Dolphin Population Parameters from Individual Identification and Capture-release Techniques". *Reports of the International Whaling Commission* (Special issue 12): 407-415.
 - Wilson, A. C., Sarich, V. M. y Maxson, L. R. 1974. "The Importance of Gene rearrangements in Evolution: Evidence from studies on Rates of Chromosomal, Protein and Anatomical Evolution". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 71: 3028-3030.
 - Wilson, A. C., Bush, G. L., Case, S. M. y King, M. C. 1975. "Social Structuring of Mammalian Populations and Rate of Chromosomal Evolution. *Proceedings of the National Academy of Science* 72, 12: 5061-5065.
 - Windle, W. F. 1976. *Textbook of Histology*. McGraw-Hill Book Co., Inc., U. S. A.
 - Winn, H. F., Bischoff, W. L. y Tarushi, A. G. 1973. "Cytological Sexing of Cetacea". *Marine Biology* 23: 343-346.
 - Woltenholme, J. 1992. "An Introduction to Human Chromosomes and their Analysis". p. 1-30. En: D. E. Rooney y B. H. Czepulkowski (eds). *Human Cytogenetics. A Practical approach*. Vol. 1 IRL Press.
 - Yunis, J. J. y W. G. Yasminch. 1971. "Heterochromatin, satellite DNA and Cell Function". *Science*. 174: 1200 - 1209.
 - Yabu, H. y H. Ogi. 1986. "Chromosome number of two color types of the Dall's Porpoise". *Scientific Reports to the Whales Research Institute* 37: 99-102.