

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Y AGROPECUARIAS

DIVISION DE CIENCIAS VETERINARIAS



**“ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE CULTIVOS
CELULARES (LINFOCITOS) EN *Heloderma horridum*
horridum”.**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

PRESENTAN:

***LINARES RETTALLY, MAGALY ISABEL
ESPINOSA AVILES, LEON DAVID***

DIRECTOR DE TESIS:

M.V.Z. M. en C. FRANCISCO RODRIGUEZ HERREJON

Zapopan, Jal.; Marzo de 1995.

A NUESTROS PADRES Y HERMANOS.

Por la confianza, apoyo e impulso que han tenido para nosotros, y que nos ha servido para alcanzar esta etapa.

Un especial agradecimiento a :

Ma. del Socorro Morales Martínez, Q.F.B.

Francisco Rodríguez Herrejón, M.V.Z. M. en C.

Eduardo Fanti Echegoyen, Biol.

Por habernos dedicado su tiempo, conocimientos y asesoría para desarrollar este trabajo.

CONTENIDO

	Página
Resumen.....	i
Introducción.....	1
Planteamiento del Problema.....	5
Justificación.....	7
Objetivos.....	8
Material y Método.....	9
Resultados.....	16
Discusión.....	22
Conclusiones.....	24
Bibliografía.....	26

RESUMEN

Debido a la escasez de información sobre el cariotipo en reptiles, en especial el saurio *Heloderma horridum horridum*, y ya que este último es una especie en peligro de extinción, fué necesario implementar una técnica de citogenética para obtener cromosomas, tratar de lograr su cariotipo y por consiguiente sexarlos cromosómicamente para facilitar su diferenciación, y poder reproducirlos, porque no presentan dimorfismo sexual.

Para implementar la técnica de citogenética de cultivos celulares (linfocitos) en *Heloderma horridum horridum*, se utilizaron 7 ejemplares de la colección del Herpetario del Zoológico Guadalajara. Se les tomó una muestra de sangre periférica extraída por corte de uña o por punción de la vena caudal, conservada en heparina de sodio, para procesarla y obtener cromosomas. Se identificaron, se fotografiaron, ampliaron y agruparon para tratar de caracterizarlos, sin poder obtener el cariotipo de la especie ni sexarlos cromosómicamente. Se observaron 14 macrocromosomas y entre 20 y 24 microcromosomas. Cuatro de los macrocromosomas son grandes (metacéntricos y submetacéntricos), 6 medianos (metacéntricos) y 4 pequeños (metacéntricos y submetacéntricos). Aparentemente el 4 par es el sexual.

Es necesario realizar estudios posteriores para determinar el cariotipo y sexar cromosómicamente la especie.

INTRODUCCION

La CITOGENETICA es una mezcla de CITOLOGIA y GENETICA, la cual se encarga de estudiar y analizar los cromosomas, su comportamiento en la mitosis y meiosis, además de las mutaciones y la repercusión en el fenotipo. Las técnicas citogenéticas consisten en el crecimiento de diferentes tipos de células *in vitro*. La información que se obtiene es útil en la conservación de especies, ya que nos ofrece datos sobre el cariotipo, malformaciones genéticas, sexo de especies monomórficas, subespecies, etc. (10,11)

Los primeros intentos por obtener cromosomas fueron realizados en animales domésticos desde principios del siglo XX. En las primeras 5 décadas las técnicas estaban poco desarrolladas y las preparaciones eran de baja calidad. (9)

A fines de los años 50's se crearon nuevas técnicas que permitieron cuantificar los cromosomas y observar sus características morfológicas. En 1950 se descubrió que la colchicina, solo utilizada en plantas, funcionaba bien en células de mamíferos porque se obtenían más células en metafase, ya que su acción es romper el huso mitótico, interrumpiendo así el proceso de la división celular. Utilizaban ácido acético en agua en proporción 1 : 1 y tenían que presionar 2 portaobjetos para que los cromosomas se esparcieran, luego se separaban dichos portaobjetos y se teñían, pero se perdían muchos cromosomas. En 1953 el Dr. T. S. Hsu y Pomerat descubrieron por casualidad que las células vivas se hinchaban con solución hipotónica. En 1959 el Dr. Hungerford y colegas lograron el primer cariotipo con la primera técnica. Al año siguiente Moorhead y colaboradores publicaron una técnica de secado al aire para cromosomas obtenidos de sangre periférica, utilizando metionina y ac. acético porque se evaporan más rápido. La rápida pérdida del fluido hacía que la célula se aplastara, forzando a los cromosomas a esparcirse. Es la técnica que se utiliza en la actualidad, con algunas modificaciones. (3,9)

Nowell (1960), notó que la fitohemaglutinina, un extracto de frijoles rojos, que había sido utilizada con propiedades hemaglutinantes, era un estimulante mitótico. Moorhead y Nowell (1960) describen el uso de colorante Giemsa para tinción de cromosomas. Antes se utilizaban tinciones citológicas convencionales como acetocarmin, violeta de genciana, hematoxilinas, Wright y Feulgen, pero los centrómeros no se teñían, así que era difícil la identificación correcta de los cromosomas. (3,9)

Los cromosomas son elementos estructurales de varios tamaños y portadores del material genético (ADN), contenidos en el núcleo de las células. El cariotipo de una especie es el arreglo sistematizado de los cromosomas de una sola célula, y se obtiene mediante la técnica de citogenética. Las células utilizadas son linfocitos, ya que son las únicas capaces de reproducirse *in vitro*. Para realizar la técnica se necesita, a grandes rasgos: tomar muestra de sangre periférica, sembrarla en un medio de cultivo enriquecido, preparar los reactivos y obtener la cosecha de cromosomas. Posteriormente, esta última se prepara para la observación al microscopio, los cromosomas se fotografían y se amplían para su agrupación en pares (siguiendo ciertos parámetros como el largo, posición del centrómero y otros) e identificación del par sexual, lo que constituye el cariotipo. (11,13,14,15,16)

La falta de información descriptiva acerca de citogenética en reptiles ha propiciado muchas investigaciones en este campo. (10,11)

Con adaptaciones de técnicas citogenéticas se han identificado cromosomas en reptiles como la serpiente *Pelamis platurus*, de Costa Rica, cuyo número diploide es de 38 cromosomas (20 macrocromosomas y 18 microcromosomas). Las hembras tienen un par ligeramente heteromórfico, identificado como el par sexual Z y W, donde W es el más pequeño. (10)

Otro estudio fué realizado en *Geophis omiltemanus*, un clúbrido de México, encontrándose que su número diploide es 36 cromosomas (20 macrocromosomas y 16 microcromosomas). En las hembras el cuarto par es el sexual. (20).

Los reptiles presentan variaciones en el rango de sus cariotipos, mostrando una incidencia de 36 cromosomas (20 macro y 16 micro). En estudios en 6 especies de serpientes pertenecientes a la familia *Colubridae*, *Elapidae*, *Viperidae* e *Hidrophiiidae*, se encontró que los cromosomas sexuales a veces eran morfológicamente indistinguibles, debido al diminuto tamaño del cromosoma W, y en ocasiones el cromosoma W fué más grande que el Z, o del mismo tamaño pero diferente forma. De aquí la diferenciación en familias. (18)

El monstruo de Gila y el Escorpión pertenecen a la familia *Helodermatidae* (Gray 1837) y dentro de esta al único género de saurios venenosos del mundo: *Heloderma* (Weigmann 1929). El primero de ellos, el *Heloderma suspectum* (Copel 1869) habita desde el suroeste de los Estados Unidos hasta el noroeste de México, en el Estado de Sonora y Sinaloa, el segundo, el *Heloderma horridum* o Escorpión, es poco común y habita desde el norte de Sonora, por la vertiente del pacífico, Hasta Chiapas y el norte de Guatemala. (2,5,16,19,21)

El erróneamente llamado Escorpión, debido a una confusión del sonido en español de la palabra "escupidor", por la creencia de que escupe el veneno, es un reptil que alcanza unos 70 cm de largo, es escamoso, granular, de color negro o café con manchas amarillas a naranjas, sus características lo hacen un animal único, no obstante algunas personas lo confunden con la iguana negra. Es lento de movimientos, nunca ataca al hombre, se puede estar muy cerca de ellos y no hacen el menor movimiento hostil si no se les molesta. Comprende cuatro subespecies:

Heloderma horridum horridum (Wiegmann 1829)

Heloderma horridum exasperatum

Heloderma horridum alvarezi (Bogert y Del Campo

Heloderma horridum charlesbogerti (Campbell and Vannini 1988) (4,5,8,21)

Son ovíparos, ponen aproximadamente 10 huevos, se alimentan de insectos, roedores, huevos de aves y de reptiles, sus hábitos son terrestres, diurnos y crepusculares, de vida muy sedentaria y no se alejan mucho de su madriguera, y cuando consiguen una buena presa no se les ve activos durante varios días. Los *Helodermas* permanecen aletargados dentro de sus madrigueras durante los meses de Noviembre a Mayo, y la época de ovoposición es entre Octubre y Diciembre. (2,16)

El cortejo previo al apareamiento es diferente de otros saurios: el macho persigue a la hembra, la abraza, le da golpes y caricias con la mandíbula hasta que logra introducir su hemipene, El cortejo dura aproximadamente 2 horas. (16,21)

El aparato venenoso de este animal no está tan perfeccionado como el de las serpientes, no contiene enzimas ni anticoagulantes. Tiene una poderosa mordida que permite que se inocule una gran cantidad de veneno, no suelta a su presa, a veces dura hasta 15 minutos haciendo presión, es necesario hacer palanca para que la suelte y se le puede romper la mandíbula. (1,16,17)

Las glándulas venenosas están localizadas bajo la piel, hacia el frente, en la mandíbula inferior; las glándulas tienen ductos que llevan el veneno a membranas mucosas entre los labios de la mandíbula inferior, que terminan en un doblez cerca del borde exterior de los dientes inferiores. El doblez ayuda a expulsar el veneno cuando muerde y mastica. Los dientes tienen un canal o ranura por donde escurre el veneno por capilaridad a la herida al momento de la mordida, causa la muerte por parálisis de los músculos de la respiración, del corazón, y por trombosis. Se calcula que la dosis letal para el hombre es de 5 a 7 mg. (1,2,4,17,21)

Es una especie muy valiosa para los zoológicos, cada ejemplar vale más de USD \$ 1000 (com. pers), si es que se le puede conseguir. Para proteger a este reptil de su explotación, está incluido en el apéndice II de CITES, como especie amenazada, por lo tanto no puede ser molestada, vendida o exportada de su lugar de origen sin el permiso correspondiente, ya que existe una gran demanda y tráfico ilegal del mismo. México pertenece a esta convención. (4,7,22)

Para poderlos reproducir en cautiverio es necesario sexarlos, ya que morfológicamente no existe diferencia entre hembra y macho. Se han utilizado varias técnicas para esto, como la introducción de un estilete en la cloaca para que con la longitud de lo introducido se determine el sexo, pero esto es muy variable, así como las medidas de longitud y ancho de la cabeza y cola, ya que dependen principalmente de la edad del animal. (2)

Otras de las técnicas que se utilizan para su sexado son: quirúrgica, por rayos X, y eversión de hemipenes. Las ventajas y desventajas de estos métodos se describen más adelante. (6,11)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Partiendo del hecho que es necesario reproducir especies amenazadas o en peligro de extinción, y dado que los *Helodermas* no presentan dimorfismo sexual, no es posible sexarlos por medios convencionales para formar parejas cuando están en cautiverio.

Se conocen varias técnicas para sexarlos, por ejemplo la quirúrgica (laparoscopia con fibra óptica), pero los inconvenientes son varios: hay que anestesiarnos y los reptiles son muy susceptibles, la cicatrización es muy lenta lo que predispone a padecer infecciones secundarias y por eso la recuperación es muy tardada.

La técnica de sexado radiológico requiere de mucho manejo del animal. Para esta técnica hay que tomar medidas demasiado exactas, las únicas indicadoras son el largo y ancho del isquión, el cual en hembras es mayor, pero los animales deben ser adultos para poder tomar estas referencias, que además no son muy objetivas, porque el tamaño depende de muchos factores como edad, alimentación, hábitat, genética; se necesitarían comparar dos animales con las mismas condiciones. Aparte de esto está el hecho de que solo se ha realizado en *Heloderma suspectum*, y para *Heloderma horridum* no se tienen referencias.

También se puede inyectar solución salina para evertir los hemipenes, es una técnica útil pero que requiere anestesia y además es muy traumática para el animal.

Por lo tanto, y para evitar los inconvenientes de inexactitud, riesgo para el animal, y manejo, consideramos necesario y conveniente el uso de otro método más eficaz para el sexado de esta especie, como es la adaptación de la técnica de citogenética, que además será un avance en el estudio genético de la especie.

La técnica de citogenética permite una determinación del sexo a cualquier edad, y está disponible comercialmente, aunque es costosa y necesita personal capacitado para observar los cromosomas y así sus características, no presenta riesgo para el animal, ya que se necesita de una mínima cantidad de sangre periférica (0.5 ml), y el manejo del animal es mínimo.

JUSTIFICACION

Es prioridad de todos los zoológicos reproducir sus ejemplares, principalmente los que se encuentran amenazados o en peligro de extinción.

El *Heloderma horridum horridum* es una especie que se encuentra amenazada, para reproducirla hay que sexarla y formar parejas, cosa que es difícil porque no existe dimorfismo sexual.

Una forma de lograr esto es realizar un sexado cromosómico, para lo cual se necesita determinar el cariotipo, que solo se logrará primero estandarizando la técnica de cultivos celulares (linfocitos) en esta especie.

Además esto es un avance en el estudio genético de la especie, que aportará datos muy útiles para la conservación

La escasa información descriptiva sobre citología y citogenética en reptiles propicia este tipo de investigaciones.

OBJETIVOS

GENERAL:

Estandarizar la técnica de citogenética (cultivos celulares de linfocitos) para *Heloderma horridum horridum*.

PARTICULARES:

- 1) Obtener cromosomas.
- 2) Obtener el cariotipo del *Heloderma horridum horridum*.
- 3) Sexar cromosómicamente esta especie.

MATERIAL Y METODO

Este trabajo se realizó en el Laboratorio del Zoológico Guadalajara, utilizando 7 ejemplares *Heloderma horridum horridum* de la colección del Herpetario. Figura 1.

Todos los animales estaban albergados en un terrario de 2 mts X 1.5 mts X 2.3 mts de alto. El piso era de rocas apiladas simulando su habitat natural, sin ninguna vegetación. Contaba con bebedero y la ventilación era proporcionada por una ventana en la parte superior. La iluminación estaba controlada por 1 lámpara "Vita Lite" que dá una longitud de onda similar al sol. La temperatura estaba controlada en parte por focos infrarrojos y oscilaba entre 25 - 27 C. Los animales se alimentaron cada 8 días con un promedio de 6 - 8 ratones (*Mus musculus*) por ración.

Se tomó una muestra de sangre periférica, extraída de un corte de una o varias uñas a los primeros 4 animales, y de una punción de la vena caudal a los últimos 3. Esto con la ayuda de una persona que sujetó al animal por el cuello y tronco con un guante de cuero especial para manejo de reptiles venenosos. Figura 2. Se obtuvo de 0.5 a 1.3 ml de sangre que se colectó en un tubo de ensayo con Heparina de Sodio, que no es tóxica para las células. Se recogió el plasma después de centrifugar a 800 rpm/8 min.

A un medio de cultivo (100 ml de medio RPMI-1640) se añadieron 20 ml de suero de bovino para el crecimiento, 2 ml de L- glutamina para enriquecerlo y de 1.5 - 2 ml de penicilina/streptomicina/fungus para evitar la contaminación.

La siembra se realizó colocando en un frasco el medio ya preparado, PHA-P (fitohemaglutinina) en una concentración de 1 mg/ml, Pokeweed a igual concentración de 1 mg/ml (ambos son mitógenos) y antibiótico. En un cultivo se utilizó otro mitógeno llamado phorbol en una concentración de 200 mcg/ml. Cuadro 1. Luego se incubó a tapón sellado con cinta adhesiva a 29°C durante 72 hrs, y se agitó 1 ó 2 veces al día para mezclar el contenido.

Transcurrido el periodo de incubación, se añadió colchicina en concentración de 10 mcg/ml, y se reincubó durante tiempos variables. Cuadro 2. Se pasó el contenido a un tubo de ensayo, con una pipeta, se centrifugó a 2700 rpm/8 min, se decantó y se añadió solución hipotónica de KCl (0.6 gr KCl/100 ml de agua destilada y desionizada). Se dejó reposar 20 minutos y se centrifugó nuevamente a 2700 rpm/8 min. Se volvió a decantar para poder recoger el precipitado de células en una pipeta Pasteur y se mantuvo aparte.

Se preparó el fijador un momento antes de usarlo. Se dejaron caer unas 2 a 4 gotas de fijador (metanol : ac. acético 3:1) en el tubo donde estaba el precipitado, procurando cubrir las paredes, y se agitó todo el tiempo para que las células no se pegaran. Se añadieron 6 ml aprox. de fijador y se agregó el contenido de la pipeta poco a poco, agitando fuertemente. Se agregó fijador hasta completar 9 ml aprox. del mismo. Esta preparación se dejó en el refrigerador por 30 min para centrifugarlo a 2700 rpm/8 min.

Los portaobjetos estaban previamente en alcohol en el refrigerador, se enjuagaron con agua destilada y se les dejaron caer unas 2 - 3 gotas de la preparación ya decantada, se cubrieron con más fijador y se secaron rápidamente al vapor.

Se procedió a la tinción de Giemsa (8 gotas de Giemsa/10 ml sol. Buffer) por aproximadamente 5 minutos y se observó al microscopio. Se buscaron cromosomas, se fotografiaron, se ampliaron y ordenaron según sus características morfológicas.

CUADRO No. 1**S I E M B R A****CANTIDADES DE ANTIBIOTICO, MITOGENO Y MEDIO DE CULTIVO UTILIZADOS**

expresado en ml

NOTA: Observar la cantidad de mitógenos.

cultivo	medio	PHA	POKEWEED	PHORBOL	*antibiótico
1	9	0.5	0.4	--	--
2	9	0.4	0.5	--	0.1
3	9	0.5	0.2	--	0.2
4	9	0.008	0.008	--	0.006
5	9	0.006 a 0.006 b 0.006 c	0.006 a 0.006 b 0.006 c	-- -- 0.006 c	1.0
6	8	0.006	0.006	--	1.0
7	8	0.006	0.006	--	1.0

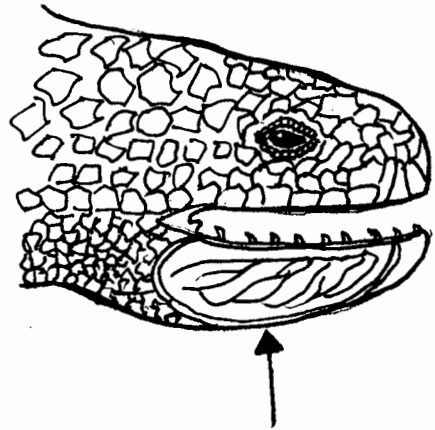
* Penicilina/estreptomicina/fungus

CUADRO No. 2**COSECHA****TIEMPO DE INCUBACION CON COLCHICINA**

CULTIVO	COLCHICINA	Tiempo de incubación
1	0.006ml	3:00
2	0.008 ml	3:00
3	0.006 ml	3:00
4	0.006ml	3:00
5	a 0.006 ml b 0.006 ml c 0.006 ml	3:10 a 4:00 b 4:30 c
6	0.008 ml	5:15
7	0.008 ml	5:15

FIGURA No. 1

Heloderma horridum horridum



DETALLE DE LA CABEZA

La flecha señala la ubicación
de la glándula venenosa.

MANEJO DEL REPTIL

OPCION A:

- 1) Con una mano se sujetó al *Heloderma* por la parte posterior de la cabeza, utilizando los dedos índice y pulgar colocados en el cuello, con la protección de un guante especial para manejo de reptiles.
- 2) Con la otra mano se sujetó al animal por su parte caudal a nivel pélvico.
- 3) Una segunda persona, encargada de extraer la sangre, le levantó la cola, y después de desinfectar el área hizo una punción con una jeringa estéril de 3 ml en la parte media, ventral, del 1er. tercio de la cola, lugar donde todavía es gruesa la vena caudal.
- 4) Esta última persona extrajo aproximadamente 1 ml de sangre y lo recolectó en un vacutainer con heparina de sodio.
- 5) Se desinfectó nuevamente el área y se regresó a su terrario, luego de identificarlo fenotípicamente.

OPCION B:

- 1) El animal se manejó de la misma manera, pero la sangre se extrajo mediante el corte de 1 o varias uñas del saurio con un cortauñas para perros, recolectándose la sangre en un tubo de ensayo con heparina y al terminar la extracción se selló la uña para evitar emorragias

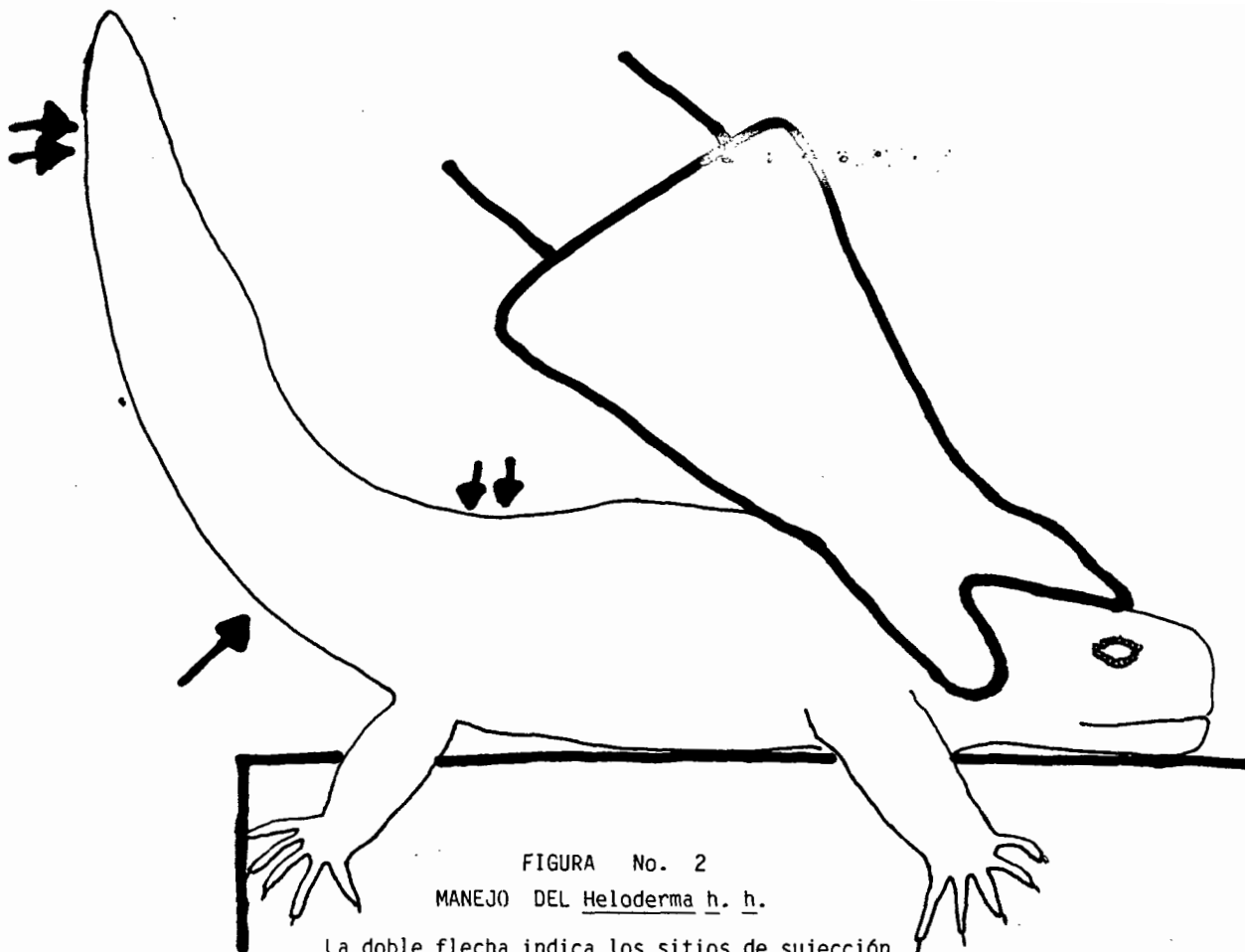


FIGURA No. 2
MANEJO DEL Heloderma h. h.

La doble flecha indica los sitios de sujeción

del animal, además del del cuello con guante protector.

La flecha única indica el sitio de extracción de sangre en la vena caudal, aproximadamente a 7 escamas de la cloaca en dirección caudal.

RESULTADOS

Se logró la obtención de cromosomas con la implementación de la técnica de cultivos celulares adaptada de la utilizada en aves, a partir de muestras de sangre de 7 ejemplares de *Heloderma horridum horridum* de la colección del Herpetario del Zoológico Guadalajara. Figura No.1.

En los primeros 5 cultivos no se observaron cromosomas, objetivo principal del trabajo, en los 2 últimos se observaron numerosos grupos de cromosomas. Cuadro No. 3.

En los 2 últimos cultivos se observaron grupos de cromosomas en cantidades de entre 58 y 86 metafases por portaobjetos revisado en las 3 preparaciones que se hicieron de cada uno. Algunos grupos se veían muy pequeños, con cromosomas muy agrupados, difusos o empalmados, pero otros se observaron de buen tamaño y con buena distribución, y, aunque no muy claros como para obtener el cariotipo, si para conocer el número total de cromosomas de la especie, número de macrocromosomas y de microcromosomas, e intentar identificar el par sexual ZW en hembras y ZZ en machos. Cuadro No. 3 y 4, Figura No. 3, 4 y 5.

No se pudo hacer el cariotipo, pero se logró un avance en la identificación de cromosomas: poseen 14 macrocromosomas, de los cuales 4 son grandes (2 metacéntricos y 2 submetacéntricos), 6 medianos (metacéntricos) y 4 pequeños (2 metacéntricos y 2 submetacéntricos), los restantes son microcromosomas en número variable de 20 a 24. Figura 5.

Tampoco se logró hacer el sexado cromosómico, pues necesitamos obtener el cariotipo para esto, pero es probable que el par sexual sea el cuarto de los macrocromosomas al igual que en otros reptiles que reporta la bibliografía.

CUADRO N° 3**OBTENCION DE CROMOSOMAS EN LOS CULTIVOS**

CULTIVO	CROMOSOMAS
1	NO
2	NO
3	NO
4	NO
5	a NO b NO c Se encontraron unos cuerpos muy pequeños que pudieran ser cromosomas, pero no se identificaron positivamente.
6	Se encontraron 86 grupos de cromosomas
7	Se encontraron 58 grupos de cromosomas

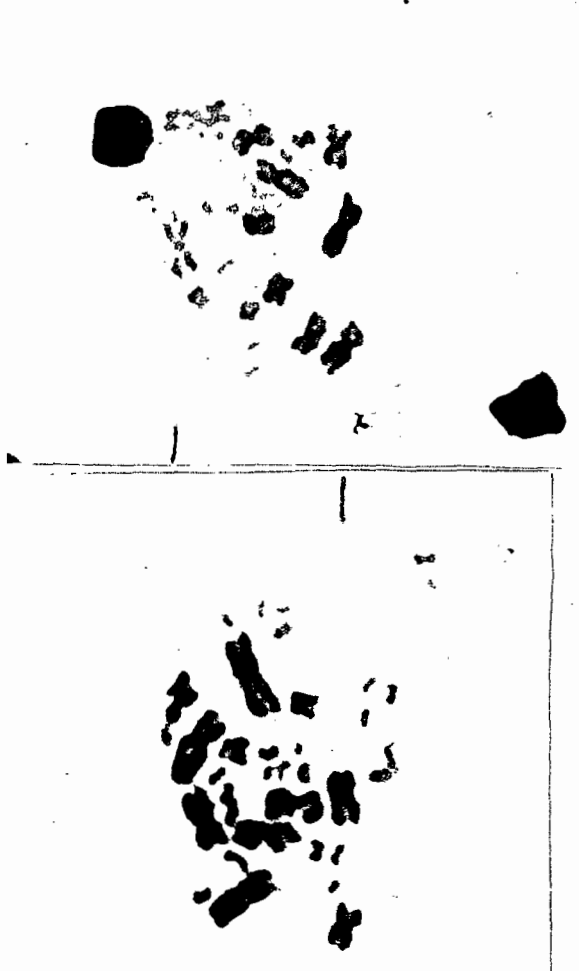
CUADRO N° 4

CONTEO DE CROMOSOMAS, CLASIFICACION E IDENTIFICACION DEL PAR SEXUAL

2n	AUTOSOMAS	CROMOSOMAS		PAR SEXUAL macrocromosomas
36	34	MACRO	MICRO	*** cuarto
		12	20-24	

*** Aparéentemente el cuarto par de los macrocromosomas puede ser el sexual, por ser el que presenta ligeras diferencias, y basándonos en referencias de cariotipos de otros reptiles donde ese es el par sexual, pero esto solo es un avance, no se podrá confirmar hasta realizar el cariotipo en trabajos posteriores.

FIGURA No. 3



Fotografías de grupos de cromosomas obtenidos después de 5 hrs 15 min de incubación con colchicina. Los puntos negros son linfocitos estimulados. Objetivo de inmersión.

FIGURA No. 4



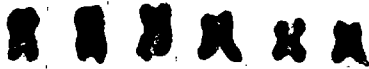
Fotografías de grupos de cromosomas vistos bajo el objetivo de inmersión, obtenidos después de incubarlos 5 hrs 15 min con colchicina.

FIGURA No. 5

MACROCROMOSOMAS



4 grandes: 2 metacéntricos y 2 submetacéntricos (los 2 últimos)

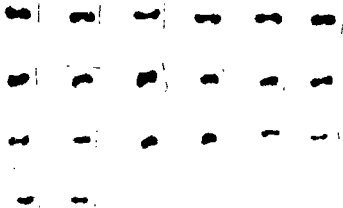


6 medianos: metacéntricos.



4 chicos: 2 metacéntricos y 2 submetacéntricos.

MICROCROMOSOMAS



20 microcromosomas.

DISCUSION

La técnica que se implementó fue una modificación a la que se utiliza en el Zoológico, para aves. Inicialmente se realizó de igual manera, exceptuando la temperatura de incubación que es de 40°C para aves debido a su temperatura corporal. Dado que los reptiles no tienen un control de la misma, ésta varía conforme a la del medio ambiente, por lo que se decidió incubar a temperatura ambiente. En el mes de Septiembre, cuando se inició el trabajo, la temperatura del terrario de los animales era similar a la del medio ambiente, y por eso se incubó de esa manera, pero conforme pasó el tiempo la temperatura ambiental descendió y se decidió incubar a 29°C, que es la misma del terrario.

La cantidad de mitógenos que se utilizó al principio estuvo dentro del rango permitido (0.005 a 0.3 ml) iniciando con el valor máximo, pero como no se obtenían resultados positivos, se disminuyeron gradualmente las cantidades, hasta llegar a 0.006 ml, pues también en exceso son tóxicos y los resultados fueron positivos en estos casos. El tiempo de incubación con estas sustancias fue de 72 horas porque es el tiempo en que las células alcanzan su pico de crecimiento, al igual que en mamíferos y aves.

Según la técnica descrita para aves, se debió agitar el cultivo dos veces al día, pero el no hacerlo no provoca cambios en los resultados, sólo es para mezclar las sustancias que se sedimentan.

El primer cultivo se contaminó porque no se tuvieron los cuidados necesarios de esterilidad al momento de la siembra.

En el segundo cultivo no se realizó ninguna variación al patrón establecido, pero por error no se selló herméticamente el envase con la siembra, de modo que no se conservó el ambiente apropiado de gases que debía ser controlado por una incubadora de CO₂, con la que no contábamos en el laboratorio, para impedir la salida de CO₂ y conservar el pH neutro del cultivo, que es de 7.2 - 7.4, y posiblemente el oxígeno que penetró provocó un cambio a pH básico reflejado en el color rosa. Con el sellado hermético se pretendía suplir la falta de la incubadora de CO₂. No se observó contaminación aparente y posiblemente esto no afectó los resultados finales, pero tampoco se observaron cromosomas.

Los cultivos 3 y 4 se realizaron siguiendo el patrón establecido y los resultados fueron negativos.

Con el quinto *Heloderma* se cambió la forma de obtener la sangre ya que con el corte de uña era muy tardado y la cantidad de sangre obtenida escasa. Al querer obtener la muestra de la vena caudal se obtuvo también un líquido desconocido hasta ese momento; por lo que se decidió variar la manera de la siembra: se realizaron 3 siembras, en la que en la primera se sembró el líquido junto con la sangre y posteriormente se observaron espermatozoides (se erró la punción en la vena y se hizo en un hemipene) por lo que se determinó el sexo del animal, pero no del modo esperado puesto que no se observaron cromosomas. La segunda siembra fue sangre completa y se realizó de la misma manera que los 4 primeros cultivos. Los resultados fueron negativos. En la tercera se separaron los glóbulos blancos por medio de densidad utilizando otra técnica en la que se necesita añadir Ficoll - paque y como mitógeno se utilizó otro llamado Phorbol que también estimula el crecimiento de las células y es más potente, también junto con el PHA y el pokeweed, solo para probar si había alguna variación. Esta muestra también cambió su pH (tampoco se cerró herméticamente) y en los resultados se observaron unos cuerpos que parecían cromosomas pero no se pudieron identificar claramente, por lo que no tenemos la seguridad de que lo hubieran sido.

En el sexto cultivo, pensando en que se habían obtenido linfocitos estimulados, pero que los resultados habían sido negativos hasta el momento, se incrementó el tiempo de incubación con la colchicina de 3 horas a 5 horas y 15 minutos, pues pensamos que las células estimuladas indicaban que sí había actividad mitótica, así que se aumentó el tiempo de acción para que se captaran mayores números de mitosis. La colchicina rompe los husos mitóticos de las células en metafase. Los resultados fueron positivos con múltiples grupos de cromosomas en las tres placas preparadas.

El último cultivo se realizó igual que el anterior y los resultados también fueron positivos, aunque la cantidad de grupos de cromosomas fue menor debido probablemente a la menor concentración de linfocitos en esa muestra.

En cuanto a los resultados obtenidos, se ampliaron las fotografías para poder hacer el cariotipo, pero sólo pudimos caracterizar los cromosomas de la siguiente manera: poseen 7 pares de macrocromosomas de los cuales 2 pares son grandes, 3 medianos y 2 pequeños; los restantes son microcromosomas, en número variable de 20 a 25, sin poder establecer su número exacto porque en algunas fotografías salieron muy pequeños y difíciles de distinguir. Para poder establecer el cariotipo se necesitarán estudios posteriores, ya que como no tuvimos referencias de estudios previos, a pesar de investigar hasta en instituciones extranjeras relacionadas con el tema, no se aprecia con claridad una diferencia significativa en los cromosomas. Por las características que observamos creemos que el par sexual debe ser el cuarto de los macrocromosomas, que son los que presentan ligeras diferencias, basándonos en referencias de cariotipos de otros reptiles, en los cuales ese es el par sexual, designado como ZZ, ZZW (machos) y ZW (hembra). Tampoco se pudo sexar cromosómicamente a esta especie, pues para lograrlo se necesita obtener el cariotipo, y no lo hemos establecido.

CONCLUSIONES

- 1) Se logró estandarizar la técnica de citogenética (cultivos celulares de linfocitos) para *Heloderma horridum horridum*.
 - a) El tiempo de incubación de la colchicina no deberá ser menor de 5 horas, para captar el mayor número de mitosis posibles.
 - b) No es necesario añadir cantidades excesivas de mitógenos, menos si su acción es sinérgica como ocurre con el Pokeweed y la Fitohemaglutinina (PHA), basta con 0.006 ml para lograr la reproducción celular.
 - c) Necesariamente los reactivos utilizados durante la cosecha (fijador solución hipotónica) deberán de ser frescos, es decir, prepararse inmediatamente antes de utilizarse para obtener resultados óptimos.
 - d) No es necesario agitar el cultivo dos veces al día para obtener resultados positivos.
 - e) Para obtener mayor cantidad de sangre periférica para el cultivo, es mejor realizar una punción de la vena caudal, que de las uñas del saurio.
- 2) Se logró la obtención de cromosomas con la estandarización de la técnica,
- 3) Para obtener cromosomas más claros y definidos las fotografías deberán tener una mayor ampliación.
- 4) Aunque no la obtención del cariotipo, se lograron avances en la caracterización de los cromosomas de los *Heloderma horridum horridum*, tales como su número cromosómico $2n = 38$, con 14 macrocromosomas: 4 grandes, 6 medianos y 4 pequeños y 20 - 24 microcromosomas en los que no se puede apreciar su morfología debido a su tamaño.
- 5) Para obtener el cariotipo de esta especie es necesario realizar trabajos posteriores como técnicas de bandeado, por ejemplo, para reunir más información y poder caracterizar los cromosomas.

- 6) No se ha sexado cromosómicamente la especie porque no se ha identificado positivamente el par sexual de los cromosomas y además no se cuenta con otros métodos de sexado (quirúrgicos, morfológicos, radiológicos, etc.) practicados en estos ejemplares.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Alagón, A.C. ; Maldonado, M. E. ; Julia, J. Z. ; Sánchez, C. R. y Passani, L. D. ; Venom from two subspecies of *Heloderma horridum*; General characterization and purification of N - Benzoil - L - Arginine ethil ester hidrolase; *Toxicon*, Vol. 20 No. 2; p. 463 - 475; U. S. A. , 1982.
- 2) Alvarez del Toro, M. A. ; Los Reptiles de Chiapas; Instituto de Historia Natural; Tuxtla Gutiérrez, Chiapas; p. 119 - 125; México, 1982.
- 3) Barch, M. J. ; The ACT Cytogenetics Laboratory Manual; Published by the author; New York, U. S. A. , 1991 .
- 4) Brown, D. G. and Carmony, N. B. ; Gila Monster: Facts and Folklore of America's Aztec Lizard; High - Lonesome Books; New Mexico, U. S. A. 1991.
- 5) Campbell, A. P. and Vanini, J. P. ; A New Subspecies of Breeding *Heloderma Horridum* from The Montagua Valley of Guatamala; *Journal of Herpetology*; Vol. 22, No. 4; p. 457 - 468 ; U. S. A. 1988.
- 6) Card, W. R. and Menaffey, D. L. ; A Radiographic Sexing Technique for *Heloderma suspectum*; *Herpetological Review*; Vol. 25, p. 17 - 18; U. S. A. March, 1994.
- 7) Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestres (CITES por sus siglas en inglés) ; Apéndice II; 16 de Abril de 1993.

- 8) Flores - Villela, O.; Herpetofauna Mexicana: Lista anotada de las especies de anfibios y reptiles de México, cambios taxonómicos recientes y nuevas especies; Museo de Zoología; Facultad de Ciencias de la U. N. A. M. ; No. 17; p. 1 - 73 ; Enero de 1993.
- 9) Gustavsson, I. ; Chromosome Aberrations and their Influence on the Reproductive Performance of Domestic Animals - a review; Department of Animal Breeding and Genetics; Swedish University of Agriculture Science, Uppsala; Vol. 30 No. 4; 1979.
- 10) Gutiérrez, J. M. y Bolaños, R.; Karotype of the Yellow Bellied Sea Snake *Pelamis platurus*; Journal of Herpetology; Vol 14 No. 2; p. 161 - 165; 1980.
- 11) Halnan, C. R. ; Cytogenetics of Animals; Cambrian Printers, Ltd.; United Kingdom, 1989.
- 12) Harrison and Harrison; Clinical Avian Medicine and Surgery Sex Determination Techniques; W. B. Saunders, Company; U. S. A. 1986.
- 13) Jacoby, W. B. and Pastan, I. H. ; Cell Culture; Methods in Enzymology; Vol. LVIII; Academic Press; Harcourt Brace Jovanovich Publishers; p. 642 London, 1979.
- 14) Karyogram; Vol. 6 No. 2; p. 17 - 19; U. S. A. , April 1980.
- 15) Kumamoto, A. T. ; Hooek, M. C. ; Charter, S. N. ; Laboratory Manual; Center for Reproduction of Endangered Species; San Diego Zoo; California U.S.A. , 1991.
- 16) Mate, G. Z. and Vanderheage, M. P. ; Guía del Terrario; Editorial Omega; p. 16, 239 - 240; Dinamarca, 1989.
- 17) Mebs, D. X. and Raudonat, H. W. ; Biochemistry of Venom of the Gila Monster, *Heloderma suspectum* and *Heloderma horridum*; Nature Wissenschaftn; Vol. 54 p.454; 1967.

- 18) Singh, L.; Chromosomes of Six Species of Indian Snakes; Herpetologica ; Vol. 30, No. 4; p. 419- 429; December 14, 1974.
- 19) Smith, H. M. ; Taylor, E. H. and Annotated Checklist and Key to the Reptiles of Mexico, Exclusive of the Snakes; Smithsonian Institution; Bulletin 199, p. 192- 227; U.S.A. 1950.
- 20) The Chromosomes of a Rare Mexican Colubrid Snake; Herpetological Notes; Vol. 1; p. 189- 191; Copeia; 1976.
- 21) Velazquez, A. C. y Guichard, C.A. ; El Escorpión Negro: Combates Ritualizados; Instituto de Historia Natural; Gobierno del Estado de Chiapas; México, 1989.
- 22) Wilson, M. P. ; Reptile Enterprises, Inc. ; P.O. Box. 1145; Bushnell, Fla. 33513, ; U.S.A. November, 1994.