



Manual de Usuario

Banco de Recursos Genéticos



CRÉDITOS

La presente publicación entrega la metodología necesaria para la creación y mantenimiento de un banco de recursos genéticos. Los datos presentados son el resultado de investigaciones realizadas en el marco del proyecto (código: FIA-PI-C-2005-1-P-097):

"Conservación de genofondos de especies animales silvestres nativas y endémicas en peligro de extinción"

El proyecto ha sido desarrollado entre los años [2005 y 2009], con el apoyo financiero de la Fundación para la Innovación Agraria (FIA).

Este Manual fue confeccionado por Fidel Ovidio Castro y Lleretny Rodríguez-Alvarez. Los protocolos, fotografías y resultados presentados en este manual son producto del trabajo colectivo de los siguientes profesionales:

- Dr. Oscar Skewes
- Dr. Daniel González Acuña
- MV. Felipe Navarrete
- Lic. Heribelt Tovar
- MV. Paula Aravena
- Dr. Fidel Ovidio Castro
- C.Dr. Lleretny Rodríguez-Alvarez

Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Concepción



NECESIDAD DE CONSERVAR LOS RECURSOS GENÉTICOS

La diversidad biológica es vital para mantener la vida del modo que la entendemos. Sin embargo, el rápido crecimiento de la población del planeta ha puesto una extraordinaria presión sobre los ecosistemas, como la destrucción ambiental a gran escala, la conversión, reducción y destrucción de hábitats y la polución. Una de las reacciones a este problema, ha sido el surgimiento de la biología de la conservación, mezcla de disciplinas científicas que se enfocan en la biodiversidad a través de la cooperación de ideas, informaciones y aproximaciones a la realidad actual de la flora y fauna del planeta.

Actualmente hay más de 5000 especies de animales ubicadas en las diferentes gradaciones de peligro de extinción. De éstas, 25% son mamíferos y 11% aves (Cofré y Marquet; 1999). Un gran número de especies de reptiles, anfibios y peces también se encuentran amenazadas. Chile es hogar para una diversidad única de hermosos ejemplares de peces, aves y mamíferos, cuya función no es meramente decorativa, sino que cumplen un importante papel en el funcionamiento del ecosistema. En el país se han iniciado esfuerzos por entender la magnitud del problema de conservación de la fauna autóctona, con vistas a trazar estrategias de salvamento y protección. Como resultado se han identificado 49 de 82 (60%) especies de mamíferos en Chile que deben ser priorizadas en programas de conservación.

Del total de especies en algún grado de peligro, 16 son consideradas en equilibrio frágil, 12, como vulnerables, 11 en peligro y 3 críticas. Igualmente 8 especies de aves fueron consideradas como críticas (Cofré y Marquet; 1999).

El enfoque científico actual para la protección de estas especies, combina los avances en las técnicas de cultivo celular, biotecnología reproductiva e ingeniería genética y biología molecular, en aras de desarrollar programas multidisciplinarios que permitan salvaguardar el potencial genético autóctono para las futuras generaciones, así como a la conservación y aseguramiento de las mejores razas de la agricultura doméstica con vistas a su empleo comercial.

BANCOS DE RECURSOS GENÉTICOS

Una de las estrategias esenciales para la salvaguarda ha sido la creación de criobancos o Bancos de Recursos Genéticos (BRG), que constituyen reservorios de muestras colectadas sistemáticamente, ya sean gametos, productos sanguíneos, tejidos o ADN con fines de conservación. Los BRGs pueden mitigar los efectos de la presión selectiva artificialmente ejercida por el hombre sobre los animales, la deriva genética y la consanguinidad mediante la oferta de nuevas fuentes de germoplasma, o sea de nuevos genes que pueden ser introducidos en poblaciones pequeñas o fragmentadas.

A nivel global ha ocurrido una importante contracción de los recursos genéticos debido a presiones de índole económica y social. Como resultado de esto, durante los años 90 se produjo un dramático incremento de las actividades relacionadas con la conservación de estos recursos. Se iniciaron numerosos programas nacionales. La FAO conjuntamente con las Naciones Unidas jugó un papel prominente en la coordinación de las acciones nacionales. De este modo se han iniciado programas nacionales dirigidos a la conservación in situ, ex situ y al intercambio de información.

Se ha creado a nivel internacional clara conciencia en algunos estados y pactos regionales de la importancia de la conservación de las especies en peligro de extinción y se toman iniciativas importantes destinadas a salvaguardar el patrimonio genético de cada nación o pacto regional. Este tipo de actividad es impensable sin la participación decisiva de fondos del estado y del trazado de políticas coherentes en materia de conservación. Uno de los elementos críticos lo constituye la creación de bancos de material biológico criopreservado. Numerosos países iniciaron colecciones congeladas de múltiples especies tanto de importancia económica, como zoológica.

Experiencia internacional

Destacan los esfuerzos de la Unión Europea, Australia y los Estados Unidos. De este modo, el ERFP (European Regional Focal Point; por sus siglas en inglés) es reconocido oficialmente por el programa de la FAO como el coordinador de una red global de Recursos Genéticos Animales. Entre sus actividades destaca la creación de las guías para la criopreservación de recursos genéticos animales en Europa y actúa como entidad coordinadora de los numerosos BRG que existen en los países miembros de la Unión Europea. La crioconservación es entendida en la Unión Europea como herramienta fundamental para conservar la variabilidad genética de especies de uso ganadero y para el uso en programas de conservación de especies en peligro de

extinción. En otros países como Australia y los Estados Unidos, también existen bancos de recursos genéticos, de modo general asociados a zoológicos, museos o centros de investigaciones y universidades. El Grupo de Especialistas en Crianza y Conservación (CBSG; por sus siglas en inglés) perteneciente a la Comisión y Unión Mundial de Conservación de Especies Sobrevivientes posee una red mundial de 700 miembros y sirve como un catalizador neutral y un facilitador de los planes de conservación a nivel mundial. De este modo mantiene un sitio web (<http://www.cbsg.org/cbsg/>).

El CBSG ha contribuido al proceso de creación de BRGs en dos modos, primero facilitando talleres en regiones de gran biodiversidad y cuyos gobiernos y autoridades estén realmente interesados en el salvamento de especies en peligro de extinción y recomendando estrategias para asegurar su recobrado (Ellis y Seal 1995, Westley y Vredenburg 1997). De ese modo el CBSG ayuda de modo objetivo a la identificación de aquellas especies que más se pueden beneficiar de la conservación, incluyendo la creación de bancos congelados de tejidos y muestras de estas especies.

Segundo, el CBSG ha promovido la preocupación internacional y el debate sobre el uso y la utilidad de los BRGs como parte de las estrategias y de los planes de conservación (Bartels y Wildt 1994, Wildt y Seal 1995). En Australia, se ha creado el GSRCA que es una unión entre el Instituto de Reproducción y Desarrollo de la Universidad de Monash en Melbourne y la Junta de Parques Zoológicos de Nueva Gales del Sur. En la actualidad, el centro opera a nivel nacional en colaboración con una decena de otras entidades públicas y privadas. Como resultado han logrado crear uno de los BRGs más importantes del mundo en el cual se combinan técnicas avanzadas de biotecnología reproductiva, biología de la conservación y manejo de recursos genéticos contribuyendo al salvamento de decenas de especies.

La experiencia de Chile

Chile ratificó en 1994 el Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB) adoptado y abierto a la firma en Río de Janeiro en 1992 y tiene rango de Ley de la República desde 1998. Entre los objetivos de ese convenio destacan la conservación de la diversidad biológica, la utilización sostenible de sus componentes y la participación justa y equitativa en los beneficios que se deriven de la utilización de los recursos genéticos.

Como parte de los mecanismos de control y ejecución de esta ley y de forma paralela, se creó en Chile la Comisión Nacional del Medio Ambiente (CONAMA) acorde a la Ley 19.300. Esta es la institución encargada de velar por los recursos genéticos del país en su conjunto.

En el Convenio sobre la Diversidad Biológica, ratificado por Chile, en su artículo 9 se refiere a la

implementación de medidas para la conservación ex situ, según proceda, de componentes de la diversidad biológica. Sugiriendo la creación y mantenimiento de instalaciones para la conservación ex situ y la investigación en plantas, animales y microorganismos.

A pesar de la voluntad política y el marco legal para la implementación de BRG en Chile, éstos no existen sino en forma de reservorios de distinta magnitud de especímenes biológicos. Esto ocurre principalmente en instituciones universitarias como es el caso del Herbario de la Universidad de Concepción que alberga una amplia colección de cerca de 200 mil especímenes, la gran mayoría nativos de Chile. Otro ejemplo es el banco de semillas de distintas variedades vegetales en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA Quilamapu) con el objetivo de preservar semillas de alto valor genético y de servicio a productores interesados en dichas semillas. Un tercer ejemplo es el banco de embriones y semen congelado de razas bovinas, ovinas y caprinas de alto valor genético, conservado en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Concepción en Chillán.



BANCO DE RECURSOS GENÉTICOS DE ESPECIES ANIMALES SILVESTRES NATIVAS Y ENDÉMICAS EN PELIGRO DE EXTINCIÓN

De acuerdo a los antecedentes mencionados, la Fundación para la Innovación Agraria (FIA) y la Universidad de Concepción, co-financiaron y ejecutaron un proyecto mediante el cual se estableció el primer Banco de Recursos Genéticos de animales en amenaza de extinción en Chile, con sede en la Facultad de Ciencias Veterinaria de la Universidad de Concepción, en el Campus Chillán. Las especies cuyas líneas celulares se encuentran conservadas en nuestro BRG se listan en la tabla siguiente.

Nombre común	Nombre científico
Huemul del Sur	<i>(Hippocamelus bisulcus)</i>
Zorro chilote	<i>(Pseudalopex fulvipes).</i>
Guiña	<i>(Leopardus guigna)</i>
Comadreja trompuda	<i>(Rhyncholestes raphanurus)</i>
Chinchilla chilena	<i>(Chinchilla lanigera)</i>
Picaflor de Juan Fernández	<i>(Sephanoides fernandensis)</i>
Llaca	<i>(Thylamis elegans)</i>
Pudú	<i>(Pudu puda)</i>

Tabla 1. Especies cuyas líneas celulares se encuentran conservadas en el BRG de la Universidad de Concepción, Campus Chillán.

Ver Anexo para datos de cada ejemplar



CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS

METODOLOGÍAS DE BIOPSIAS Y CONSERVACIÓN *IN SITU*

Para la toma de muestras y subsiguiente establecimiento de cultivos celulares, se requiere en primer lugar, disponer de los especímenes biológicos. En este manual no se pretende establecer condiciones de captura para alguna especie en particular, pues las mismas variarán en dependencia de los proyectos específicos, de las especies contempladas en cada uno de ellos y del tipo de muestras a obtener. Adicionalmente la especie a muestrear puede ser susceptible de captura/inmovilización, sedación o anestesia o ser animales que dado su porte o comportamiento, no sea recomendable un enfoque de este tipo, sino que sería preferible la toma de muestra a distancia, como por ejemplo a través de dardos especializados (Fig. 1A). Este puede ser el caso de algunos cérvidos (huemul, taruca) o de cetáceos.

En aves, de igual modo, se pueden tomar biopsias de piel, pero se prefieren aquellas que causen el mínimo daño a los animales, por lo que se recomienda siempre que esto sea posible la obtención de células a partir de plumas (Fig. 1B).



A



B

Figura 1. Métodos de biopsias para animales silvestres y aves. A: Dardos de biopsia. B: Plumas de sangre de picaflor de Juan Fernández.

BIOPSIAS EN MAMÍFEROS

Para obtener biopsias de mamíferos existen 2 estrategias:

1. muestreo e inmediata desagregación del tejido (condiciones ideales)
2. muestreo y conservación (en frío o congelada) hasta su transporte al laboratorio (condiciones de campo).

La primera estrategia es viable especialmente cuando el animal a muestrear se encuentra en la institución en la cual se realiza el aislamiento de las células, o relativamente cerca de ésta, de modo que el tiempo entre la toma de muestra y la desagregación no supere las 2-3 horas. Es el caso de los centros de rescate en las sedes universitarias, por ejemplo.

La segunda y sin dudas la más frecuente y probable en condiciones de campo, consiste en tomar la muestra, conservarla en condiciones de hipotermia o congelación, trasladarla al laboratorio, desagregarla y cultivarla. Los detalles de la conservación se discutirán más adelante. Para ambas estrategias se requiere la implementación de un protocolo estándar de toma de muestras, que se describe a continuación.



Figura 2. Toma de muestra en condiciones de campo

PROTOCOLO DE TOMA DE BIOPSIAS PARA CULTIVO DE TEJIDOS A PARTIR DE UNA MUESCA DE OREJAS

La oreja es la porción anatómica más usada para la toma de biopsias destinadas al aislamiento de cultivos celulares a partir de animales vivos. Esto se debe en primer lugar a su fácil acceso en la mayoría de las especies, está relativamente poco vascularizada, de fácil desinfección y mínima invasión. No obstante, en algunos ejemplares de exposición, puede ser estéticamente poco conveniente tomar muestras del pabellón auricular. En este caso se recomienda encontrar la zona menos visible y que cumpla

con requisitos como los descritos para la oreja, por ejemplo, alguna parte de la cola.

El factor más importante a tener en cuenta, para la toma de las biopsias, es la limpieza adecuada del sitio de muestreo. El tejido debe ser estéril, ya que las bacterias y los hongos matan los cultivos celulares.

Materiales requeridos

- ◆ Muescadora de orejas (idealmente Nasco tamaño medio, #C00024N) (Fig. 3A)
- ◆ Etanol al 70%
- ◆ Gasa y algodón estériles
- ◆ Pinzas y bisturís estériles
- ◆ Máquina de afeitar desechable o rasuradora eléctrica
- ◆ Viales para las biopsias con medio de colecta
- ◆ Marcador permanente



A

Protocolo para toma de muestra

1. Con la rasuradora o la máquina de afeitar, eliminar la mayor cantidad de pelo que se pueda del área a muestrear.
2. Humedecer el tejido (borde externo de la oreja) con etanol al 70% (en ningún caso emplear antisépticos como mercurio-cromo o yodo).
3. Con el algodón empapado en etanol al 70%, lavar la oreja muy meticulosamente, teniendo cuidado de que el alcohol no caiga en los ojos o el interior del pabellón auricular. Continuar limpiando, pero con la gasa estéril (el algodón sólo debe usarse en el primer lavado, ya que deja hilazas) hasta que no se aprecie más suciedad en la gasa. Terminar el lavado volviendo a humedecer el tejido con etanol al 70%, dejar secar muy brevemente.
4. Tener listo el vial de biopsia, con la tapa aflojada. Asegurarse que el medio de colecta este transparente y de color rosa.



B

Figura 3. A: Muescadora. B: toma de muestra con muescadora en condiciones de campo.

Si presenta turbidez o está amarillo, se encuentra contaminado. En este caso descartar y tomar otro vial.

5. Usando el muescador, obtener una porción de la oreja y colocar inmediatamente en el vial de biopsia, el cual debe ser cerrado herméticamente de inmediato.
6. Rotular el vial de biopsia con el marcador permanente e incluir la siguiente información: nombre de la especie, sexo, fecha, identificación del animal si la tiene.

7. Proteger la tapa del vial de biopsia con parafilm para evitar goteo y colocar en gradilla en posición vertical.
8. Proceder con el cultivo de tejido o conservar según se encuentre en el laboratorio o el campo. En este último caso, si la llegada al laboratorio ocurriera en las próximas 6-8 horas desde su envío, mantener a temperatura ambiente, si ésta no supera los 25°C. Si sobrepasara los tiempos y temperaturas indicados, refrigerar la biopsia de piel en el propio tubo a 2-8°C, pero **NUNCA CONGELAR**.
9. Antes de tomar muestras de un segundo animal, esterilizar el muescador en etanol al 70% para evitar la contaminación cruzada de las muestras.

Algunas consideraciones adicionales

1. El medio de colecta, es Earle's balanced salt solution (EBSS, Sigma # de catálogo 02-010-1) suplementado con 1% penicilina, estreptomicina y fungizona y 10% de suero fetal bovino.
2. Dependiendo del tamaño de la especie, utilizar muescadores más chicos, o tijeras de cirugía, teniendo en cuenta que una biopsia de 3 mm de diámetro, rinde suficientes células viables como para obtener cultivos y líneas a partir de ella.
3. Para el trabajo en condiciones de campo, de ser posible, realizar la biopsia en un sitio con escasa ventilación (dentro del automóvil por ejemplo) o generando un ambiente propicio (dentro de una carpa, debajo de una capa de agua) para evitar contaminación microbiana.

PROTOCOLO DE TOMA DE BIOPSIAS PARA CULTIVO DE TEJIDOS A PARTIR DE UN DARDO

Para el caso de las biopsias tomadas en mamíferos terrestres con dardos disparados con rifles, se precisa estandarizar aspectos referentes a:

- ◆ Intensidad del disparo (tipo de fulminante, presión del disparo, etc)
- ◆ Alza del rifle (trayectoria, margen de error)
- ◆ Condiciones atmosféricas (velocidad del viento, altitud, horario, visibilidad)

No se pretende en este manual dar orientaciones de uso de un rifle o un sistema de dardos en concreto, pues las condiciones de uso, variarán dependiendo de la especie, el sitio, la hora, las condiciones atmosféricas, el rifle, el dardo, el fulminante, la experiencia del tirador, entre otras. Adicionalmente la recuperación del dardo varía. Por ejemplo, en mamíferos marinos se requieren sistemas distintos para no perder los dardos, mientras que en mamíferos terrestres, por lo general su colecta posterior al impacto y caída del animal son sencillas, aunque pueden suceder complicaciones debido al sitio, la hora, etc.

En nuestra experiencia, se empleó para el muestreo de cérvidos, un dardo de biopsia especial de la firma PneuDart Inc. Williamsport, PA, Estados Unidos y se ajustó una distancia de disparo efectiva de unos 20 metros, aunque la misma varió en dependencia de los elementos descritos anteriormente.

El protocolo seguido fue el siguiente

1. Disparo preferentemente en los muslos traseros (el dardo cae por sí mismo del animal).
2. Colecta del dardo con el tejido en su interior.
3. Usando un escalpelo estéril cortar longitudinalmente el tejido que queda enroscado en la espina del dardo.
4. Con pinzas estériles, retirar el tejido del dardo tomando extremas precauciones para que el tejido no caiga al suelo.
5. Cortar el tejido adiposo y quedarse sólo con la piel y músculo.
6. Proceder de manera idéntica a lo descrito para el método de biopsia de oreja por muesca.



Figura 4. Toma de muestras utilizando dardo de biopsia.

BIOPSIAS EN AVES

Para aves, no se requiere la toma de biopsias de piel, ya que las plumas jóvenes o de sangre que son plumas recién salidas y en crecimiento (Fig. 1A) contienen una pulpa rica en células, a partir de las cuales se pueden establecer cultivos celulares *in vitro*.

PROTOCOLO DE COLECTA DE MUESTRAS A PARTIR DE PLUMAS

1. Localizar en las alas las plumas de sangre. Para ello, extender las alas del ave gentilmente, de modo que cada pluma sea visible. Estas plumas suelen estar escondidas entre plumas más viejas, por lo que se debe buscar cuidadosamente, sobre todo en la base.
2. La gran mayoría de las aves adultas tienen al menos una pluma de sangre en todo momento.
3. Una vez localizada, halar por la base para extraerla, teniendo cuidado de no apretar demasiado la base para evitar la salida de la pulpa que se encuentra contenida en el interior del estilete de la pluma y en donde se hallan las células. Tomar cuantas plumas de sangre existan.
4. Colocar en una bolsa limpia del tipo zip-lock (o similar).
5. Marcar la bolsa con la identificación del ave, fecha, sexo de ser posible.
6. Colocar la bolsa en un contenedor plástico (por ejemplo, envase o táper convencional de supermercado) para evitar que la bolsa sea aplastada. Proteja la pluma de calores o fríos extremos.
7. Enviar al laboratorio y proceder con el cultivo de las células. **NO REFRIGERAR.**



Figura 5. Plumas de distintas edades. Sólo las dos de encima, son plumas de sangre. La pluma más grande, ya ha alcanzado su talla máxima y no contiene pulpa suficiente para extraer células de ella.



CONSERVACIÓN DE LAS BIOPSIAS ANTES DEL CULTIVO

Debido a que no siempre es posible enviar las biopsias al laboratorio, se adaptaron los protocolos de conservación de los tejidos, antes de iniciar el cultivo. De este modo, se desarrollaron dos metodologías:

1. Conservación de las biopsias de tejido a temperaturas de refrigeración (+2 a +8°C; posibles de alcanzar en un refrigerador doméstico o cooler comercial).
2. En nitrógeno líquido en termos especiales para conservaciones a más largo plazo.

Mediante la primera estrategia es posible mantener las muestras de biopsia durante 5-7 días con poco o ningún detrimento de la viabilidad celular. Nosotros recomendamos este procedimiento siempre que sea posible (ver Tovar y cols., 2008).

Si dadas las circunstancias de la toma de muestra no es posible acceder al laboratorio en un plazo máximo de una semana, ni enviar las muestras por correo, se recomienda entonces la segunda estrategia. Esta permite una conservación a más largo plazo (dependiendo del termo de nitrógeno líquido que se disponga, entre 15-30 días por lo general) aunque se debe tener en cuenta que disminuye notablemente la viabilidad de las células que se aislarán posteriormente. El tipo de muestra (biopsia por muesca o dardo) también influye sobre la viabilidad de los cultivos. De este modo se obtienen más fácilmente y con mayor viabilidad, cultivos a partir de muescas de oreja congeladas que de muestras de biopsias tomadas por dardos.

CONSERVACIÓN DE LAS BIOPSIAS A TEMPERATURA DE REFRIGERACIÓN

Para biopsias obtenidas por muescador

1. Tomar la muestra como se describió anteriormente en EBSS suplementado con antibióticos, en viales de conservación.
2. Colocar los viales en un refrigerador portátil, cooler con hielo, o cualquier otra solución que mantenga la temperatura a 4°C. Si el instrumento de enfriamiento no mantiene la temperatura por períodos prolongados de tiempo, se recomienda traspasar las muestras a un refrigerador doméstico.

3. Proceder al tratamiento de aislamiento de las células tal y como se describió. De acuerdo a nuestra experiencia, las muestras sin procesar y mantenidas en EBSS a 4°C pueden permanecer hasta 5-7 días y rendir cultivos celulares de excelente viabilidad (Tovar y cols., 2008).

Para biopsias obtenidas por dardos (tipo PneuDart) recomendamos

1. Eliminar en condiciones de campo y respetando la asepsia el tejido adiposo, cortando con un bisturí o tijeras estériles.
2. Proceder como se describió para biopsias de muescador.

Este procedimiento es válido sólo para mamíferos, las muestras de plumas de aves en ningún caso pueden ser refrigeradas.

CONSERVACIÓN DE LAS BIOPSIAS A TEMPERATURA DE CONGELACIÓN

Este procedimiento implica cortar el tejido una vez obtenida la biopsia, lo que puede resultar difícil en condiciones de campo. Para ello se requiere de una tienda de campaña o el interior de un vehículo en donde se minimice la circulación del aire. Las superficies de trabajo deben ser lavadas con etanol al 70% antes de comenzar a trabajar.

Materiales requeridos

- ◆ Placas de Petri estériles
- ◆ Viales de biopsias
- ◆ Medio de cultivo (DMEM:F12; 1:1) suplementado con 10% suero fetal, 1% glutamine, 1% pen-estrep y fungizona
- ◆ Dimetil sulfoxido (DMSO)
- ◆ Tubos cónicos de 15 y de 50 cc estériles
- ◆ EBSS suplementado con 1% pen-estrep y fungizona
- ◆ Pipetas desechables de plástico estériles de 5 y 10 ml, bulbos de pipeteo
- ◆ Jeringas de 10 cc

- ◆ Filtros de 0.2-micras
- ◆ Pinzas y bisturíes estériles
- ◆ Viales de criconservación de 2 ml de capacidad (NUNC)
- ◆ Termo portátil de nitrógeno líquido

Protocolo de congelación de tejidos (usar técnicas estériles)

1. Preparar el medio de congelación con 10% DMSO, 30% suero fetal y el resto de medio de cultivo en un tubo de centrífuga. Se deben preparar al menos 1 ml por vial de congelación. Filtrar el medio a través de un filtro de 0.2 micras. Guardar en frío.
2. Sacar la biopsia del vial, enjuagar en etanol al 70% por un minuto en una placa de Petri. Transferir a otra placa de Petri con EBSS y enjuagar.
3. En una placa Petri estéril cortar el tejido en fragmentos pequeños de 1 mm², usando para esto pinzas y bisturí. No permitir que se seque el tejido, para ello humedecer con EBSS a discreción. Es necesario eliminar la mayor cantidad posible de pelo o lana de la oreja.
4. Reunir los fragmentos y colocarlos cuidadosamente en el vial de congelación.
5. Añadir 1 ml de medio de congelación frío a cada vial. Cerrar herméticamente y agitar el vial gentilmente para propiciar que todos los fragmentos queden expuestos al crioprotector.
6. Marcar apropiadamente empleando un marcador resistente a alcohol.
7. Colocar directamente en nitrógeno líquido.



OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS

Una vez en el laboratorio, nuestra experiencia recomienda ceñirse al siguiente protocolo para la obtención de los cultivos primarios.

PROCEDIMIENTOS PARA MAMÍFEROS

Obtención de cultivos primarios empleando digestión con colagenasa

Materiales requeridos

- ◆ Colagenasa B (Boehringer Mannheim # catálogo 088831). Preparar solución de trabajo al 0.5% en medio de captura
- ◆ Placas de Petri estériles para cultivo de tejidos
- ◆ Tijeras y pinzas quirúrgicas estériles
- ◆ Tubos de cultivo de 15 cc con fondo cónico, estériles (tipo Falcon)
- ◆ EBSS suplementado con 1% de penicilina-estreptomicina y fungizona
- ◆ Medio de cultivo*
- ◆ Cajas de cultivo de 25 cm² (T25)
- ◆ PBS
- ◆ Tripsina 0.5% + EDTA

*DMEM:F12 (1:1) suplementado con 10 ng/ml de EGF, 10 µg/ml de insulina, 30% de suero fetal bovino inactivado por calor, 1% penicilina-estreptomicina y fungizona, 1mM de piruvato y 2 mM de L-glutamina.

Protocolo de colagenasa (usar todo el tiempo condiciones de esterilidad en la manipulación)

1. Depositar la biopsia en una placa de 100 mm tipo Petri estéril. Utilizando tijeras y pinzas estériles, cortar la biopsia, en pequeños fragmentos de aproximadamente 0.5 mm³). Los fragmentos más pequeños serán digeridos con mayor facilidad.
2. Formar grupos de unos 20 fragmentos aproximadamente, lavar por pases en EBSS + antibióticos. Después de 5 lavados, colocar en un tubo cónico de 15 cc.

3. Añadir unos 0.3 - 0.5 cc de la solución de 0.5% colagenasa de modo que cubra completamente los fragmentos.
4. Colocar en una incubadora a 37°C, con agitación. Incubar toda la noche (12-20 horas). Los fragmentos se verán como crispados y el medio algo turbio debido al debris celular.
5. Cuando el tejido luzca suficientemente digerido, añadir 5 ml de medio de cultivo, resuspender vigorosamente mediante pipeteo para despegar las células que puedan hallarse adheridas a los fragmentos que aún queden. Colocar todo el contenido en una caja de cultivo (T25 por ejemplo= 25 cm² de área de cultivo). Rotular como Pase Cero (P0), fecha, especie, hora de inicio del cultivo.
6. Incubar a: humedad 100%, nivel de oxígeno 5%, nivel de CO₂ 5%, nitrógeno 90%, temperatura 37-39°C.
7. Dejar la caja sin tocar por al menos 3 días. Observar al microscopio para la aparición de pequeños parches de células. Puede que aparezcan sólo algunos pocos parches, en cuyo caso, debe reemplazarse la mitad del medio de cultivo, dejar otros 3 días y observar. Si existen abundantes parches, reemplazar el medio cada 3 días hasta que se llene por completo el fondo de la caja de cultivo (Fig. 6).
8. Una vez llena la caja, proceder a subcultivar (pasar). Para ello, eliminar el medio de cultivo, lavar dos veces con PBS, añadir 1 ml de Tripsina 0.25% + EDTA, incubar por 3-8 minutos a 37°C, hasta que las células se despeguen del fondo de la caja de cultivo.
9. Añadir 11 ml de medio de cultivo y sembrar en 3 cajas nuevas de T25 a razón de 4 ml por caja, lo que rendirá una dilución de 1:3 del cultivo P0 y generará 3 cajas de cultivo (T25) de Pase 1 (P1).
10. Chequear los cultivos cada 2 días y cambiar medio según necesidad. Los cultivos pueden ser pasados indefinidamente o congelados.

Protocolo alternativo empleando digestión enzimática con tripsina

Materiales requeridos

- ◆ Tripsina 05% + EDTA (Invitrogen # de catálogo 25300054)
- ◆ Placas de Petri estériles para cultivo de tejidos
- ◆ Tijeras y pinzas quirúrgicas estériles

- ◆ EBSS suplementado con 1% de penicilina-estreptomicina y fungizona
- ◆ Medio de cultivo*
- ◆ Cajas de cultivo de 25 cm² (T25)
- ◆ PBS
- ◆ Tripsina 0.5% + EDTA

*DMEM:F12 (1:1) suplementado con 10 ng/ml de EGF, 10 µg/ml de insulina, 30% de suero fetal bovino inactivado por calor, 1% penicilina-estreptomicina y fungizona, 1mM de piruvato y 2 mM de L-glutamina.

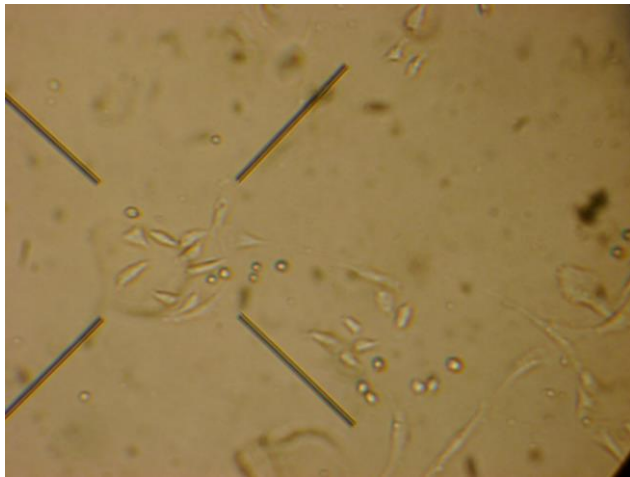
Protocolo de tripsina (usar todo el tiempo condiciones de esterilidad en la manipulación)

1. Proceder según los puntos 1 al 3 del protocolo de colagenasa.
2. Colocar en una incubadora a 37°C, con agitación. Incubar por 1 hora.
3. Aspirar el sobrenadante y proceder como en los puntos 5-10 del protocolo de digestión con colagenasa. Si se considera pertinente, cubrir de nuevo los fragmentos que queden e incubar en tripsina por períodos de tiempo adicionales. Tener en cuenta que la acción de la tripsina es más fuerte que la de la colagenasa. Alternativamente se puede dejar incubando (permeabilizando) toda la noche en tripsina a 4°C y proceder a partir del punto 2, pero por 15 minutos como máximo.

Protocolo alternativo para la obtención de cultivos primarios empleando digestión enzimática con colagenasa, tripsina y sembrando los explantes

Para este protocolo, se deben haber realizado las digestiones enzimáticas con colagenasa y tripsina de modo secuencial. En vez de descartar los fragmentos remanentes de tejido, éstos se colocan en una caja de T25 y se los deja sin medio de cultivo por 3-6 horas para lograr que se adhieran a la superficie de plástico. Posteriormente, se le añade 1 ml de medio de cultivo suplementado con 50% de suero fetal, de modo que la tensión superficial sea grande y los fragmentos permanezcan pegados al plástico. Se incuban toda la noche a humedad 100%, nivel de oxígeno 5%, nivel de CO₂ 5%, nitrógeno 90%, temperatura 37-39°C y al día siguiente se completa el volumen de 5 ml con medio sin suero.

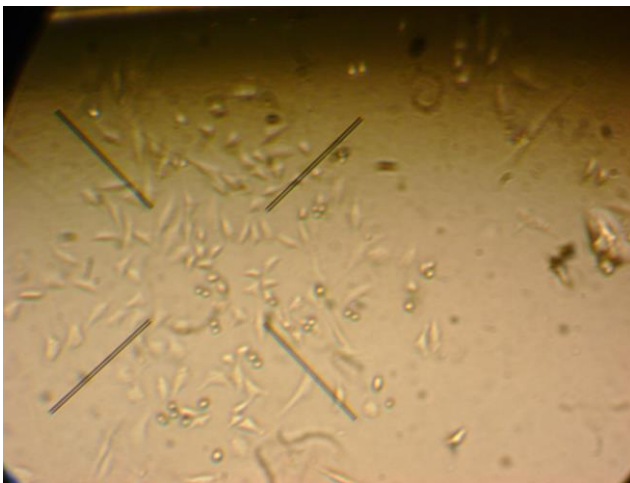
Se dejan los explantes sin tocar por una semana y transcurrido ese tiempo, se retiran con una pinza estéril. Debajo de ellos, se observará el crecimiento de parches de células y se procede tal como se ha descrito en el protocolo de colagenasa, puntos 8 al 10. En caso de no disponer de colagenasa o tripsina, el método de explantes sería la única opción. Proceder como se describió en este párrafo y el anterior.



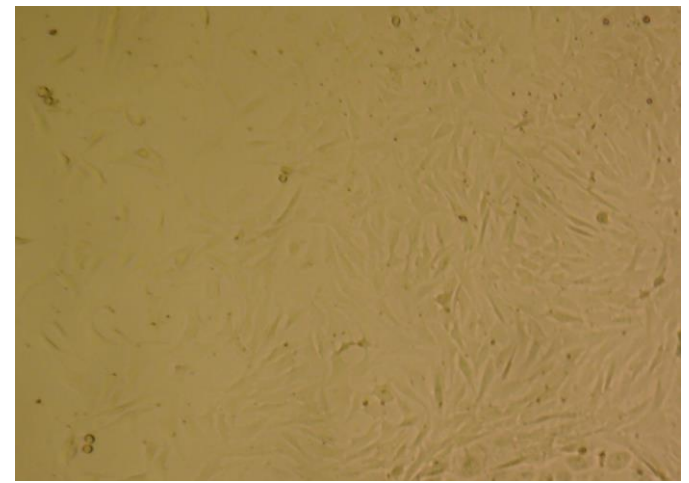
A



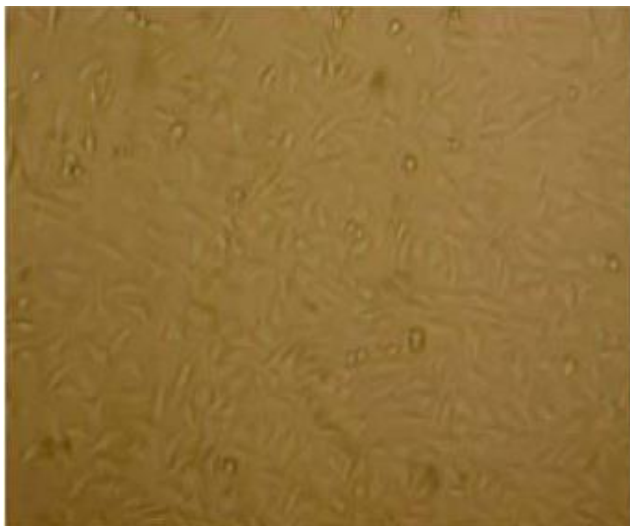
B



C



D



E



F

Figura 6. Cultivos celulares primarios en diferentes estados de confluencia. A: Células de aproximadamente 24 horas de cultivo. F: Cultivo completamente confluyente.

PROCEDIMIENTOS PARA AVES

Obtención de cultivos primarios empleando digestión enzimática con **colagenasa** (todos los procedimientos deben realizarse en condiciones de esterilidad)

1. Colocar las plumas de sangre en una placa de Petri de 100 mm. Lavar el estilete de la pluma con una gasa empapada en etanol al 70% y posteriormente con EBSS.
2. Con un bisturí cortar el estilete a lo largo, para exponer la pulpa. Tomar la pulpa con la pinza y colocarla en 0.3 cc de EBSS.
3. Corte en pequeños trozos según se describió para mamíferos y coloque los fragmentos en un tubo cónico de 15 cc.
4. Proceder según se describió en el protocolo de colagenasa para mamíferos, reducir el tiempo de incubación a un máximo de 6 horas. Incubar a 40-42°C.

En el caso de aves muy pequeñas, como por ejemplo, el picaflor de Juan Fernández, dado el tamaño tan chico de las plumas de sangre (Fig. 7), se debe proceder a un protocolo combinado de lavado y digestión enzimática, desarrollado en nuestro laboratorio:

Colocar las plumas de sangre en una placa de Petri de 100 mm. Lavar el estilete de la pluma con una gasa empapada en etanol al 70% y posteriormente con EBSS. Con un bisturí cortar el estilete a lo largo, para exponer la pulpa. **!Dejar la pulpa!** e incubar en colagenasa la pluma cortada con la pulpa adentro. Esto es necesario adaptarlo para no perder el poco material que se obtiene de las plumas de sangre del picaflor. Proceder según se describió en el protocolo de colagenasa para mamíferos, reducir el tiempo de incubación a un máximo de 6 horas. Como detalle distintivo, incubar a 40-42°C.

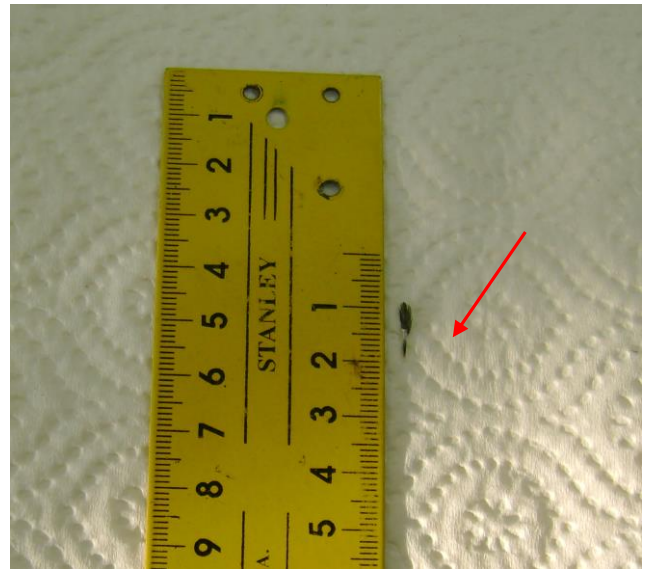


Figura 7. Pluma de sangre de picaflor de Juan Fernández. Tamaño de la pulpa no excede los 3 mm.

METODOLOGÍAS DE CULTIVO Y CONGELACIÓN DE LAS CÉLULAS

CONGELACIÓN DE CÉLULAS DERIVADAS DE LOS CULTIVOS PRIMARIOS

Las células deben congelarse según las características de cada especie y teniendo en cuenta la viabilidad y morfología de éstas al momento de iniciar la congelación. Los protocolos estándar de congelación (Freshney 2000, por ejemplo) pueden ser empleados. El principio fundamental a respetar es que las células sean congeladas empleando un método que permita el descenso de la temperatura a una velocidad de 1 grado por minuto, esto se puede lograr en un equipo de congelación especializado o mediante técnicas más sencillas, como la congelación en cajas de polipropileno (sistema Mr. Frosty de Nalgene Corporation).

1. Preparar medio de congelación consistente en dimetil sulfóxido (DMSO) al 10% en 80% de suero fetal bovino y 10% de medio de cultivo DMEM:F12 sin suplementos. Este medio de congelación se mantiene frío en hielo.
2. Tripsinizar las células según lo descrito para el subcultivo en los protocolos anteriores, una vez añadido el medio de cultivo, las células tripsinizadas, se centrifugan y se ajusta su concentración a 3-5 millones por ml.
3. Descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado en el medio de congelación frío.
4. Colocar las células en los viales de congelación previamente enfriados y adecuadamente marcados y éstos en la caja de polipropileno, previamente rellena con isopropil alcohol y congelada a -20 grados.
5. Colocar la caja en un congelador de -86 grados.
6. Transcurridas al menos 72 horas pasar los viales directamente al reservorio con nitrógeno líquido.

Gracias al material plástico aislante y a las características térmicas del isopropil alcohol, se garantiza un descenso gradual de la temperatura de congelación de un grado por minuto. Esta tasa de descenso es similar a la que se obtiene con equipos programables, con la consiguiente ventaja de ahorro de costos. Nuestro grupo ha empleado exitosamente esta sencilla técnica en la criopreservación de células somáticas empleadas para la clonación de ganado bovino (Hayes y cols., 2005a y b; Rodríguez y cols., 2008).

PROTOCOLO PARA EVALUAR LA VIABILIDAD CELULAR POSTERIOR A LA DESCONGELACION

Una vez congeladas, las células pueden permanecer a -80 grados por hasta 6 meses y en nitrógeno líquido por tiempo indefinido. Para evaluar la viabilidad celular posterior a la congelación, las células se descongelan por inmersión durante 30 segundos en un baño con agitación a 37°C grados y se siembran a razón de un vial por caja de 25 cm² (T25).

El % de células viables después de la descongelación se evalúa por: 1) la adhesión al fondo de la placa; 2) la morfología de las células y 3) por el test de exclusión de células muertas de Tripan azul. Los dos primeros métodos son subjetivos y sólo permiten semi-cuantificar la viabilidad y el último es cuantitativo. Para el método de Tripan Azul, las células una vez descongeladas y diluidas en medio de cultivo son centrifugadas a 800 rpm por 10 minutos, se descarta el sobrenadante y se resuspende el precipitado en 0.4% Tripan Azul en PBS a 37°C. Se cuenta el número total de células en una cámara de Neubauer, el número de células muertas (aquellas azules, que incorporaron el colorante Tripan Azul) y se calcula el % de sobrevivencia a la congelación.

El tiempo de doblaje de las células se define como el tiempo requerido para que todas las células se repliquen una vez y se calcula por la siguiente ecuación:

$$TG = (\log 2 \times T) / (\log Y - \log X)$$

Donde:

T es el tiempo en cultivo (horas) al momento del conteo

Y es el conteo final

X es el conteo inicial

Para evitar el conteo final, con el ahorro consiguiente de insumos y tiempo, se estima de acuerdo con la literatura que una placa de 60 mm de diámetro (20.4 cm²) es capaz de albergar aproximadamente 5 millones de células de fibroblastos. Por ello se siembran 2.5 millones de células en una placa de 60 mm y se mide el tiempo requerido para que la placa obtenga un 100% de confluencia.

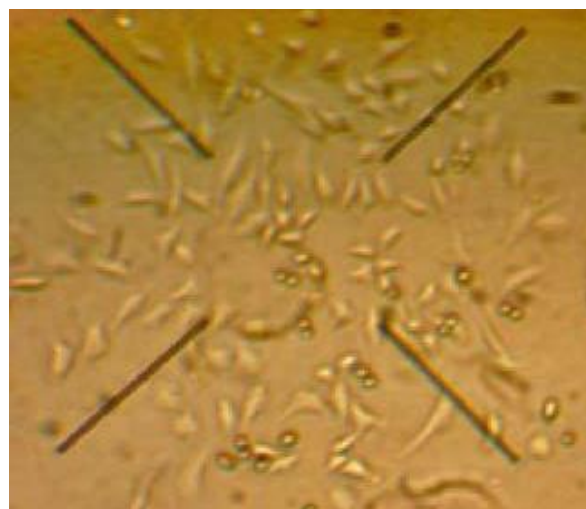


Figura 8. Cultivo primario de células de mamífero.



PROCEDIMIENTOS DE CONTROL Y BASES DE DATOS

Es esencial el establecimiento de estándares para monitorear efectivamente el control de calidad de los bancos. Existen protocolos que se han implementado para asegurar germoplasma de origen agrícola y de microorganismos que pueden ser prototipos para bancos de germoplasma animal. Por ejemplo, la ATCC (American Tissue Culture Collection) es un modelo a seguir para la conservación segura ex situ de una enorme gama de diferentes organismos. Las muestras son guardadas en 57 reservorios de nitrógeno líquido con una capacidad de más de 2 millones de viales cada uno, 37 refrigeradores de ultra bajas temperaturas que guardan más de 150 mil viales a -80°C o en cámaras frías de 900 pies de área, a 4°C . Todas las unidades son monitoreadas de modo electrónico, continuamente para las variaciones de temperatura. Todo el funcionamiento del BRG tiene que cumplir con los más altos estándares de calidad y están duplicados en dos lugares diferentes para minimizar las pérdidas en casos de catástrofe. Se implementan de modo obligatorio programas de cuarentena para evitar la introducción de enfermedades y se introducen nuevos métodos de diagnóstico molecular para prevenir las enfermedades contagiosas a tejido animal o humano.

Bases de datos

El valor real de todo material biológico único o exclusivo de un animal o planta viva, radica no sólo en las muestras colectadas, sino en la calidad y confiabilidad de los datos recopilados sobre ellos. Particularmente son importantes los datos sobre el tipo de espécimen, estatus zoo-sanitario, calidad de la muestra, procedencia, pedigree, forma de congelación, abundancia, etc.

Los bancos de recursos genéticos, tienen forma física en un tanque de nitrógeno líquido equipado para recibir los viales que contienen las células congeladas.



Figura 9. Tanque de almacenamiento con sistema de alarma para nivel de Nitrógeno.

Los termos o tanques de nitrógeno deben ser de proveedores fiables y con controles de calidad establecidos. Existen numerosas empresas, sobre todo de origen norteamericano que ofrecen tanques de alta calidad. Idealmente se requiere un tanque de almacenamiento (Fig. 9) y un tanque auxiliar. El primero alberga el BRG y debe ser usado solamente para ese propósito y abrirse sólo el mínimo de veces y por el menor tiempo necesario. Debe existir un suministro confiable y constante de nitrógeno líquido e idealmente debe contar con un sistema de alarma que indique los niveles reales de nitrógeno líquido.

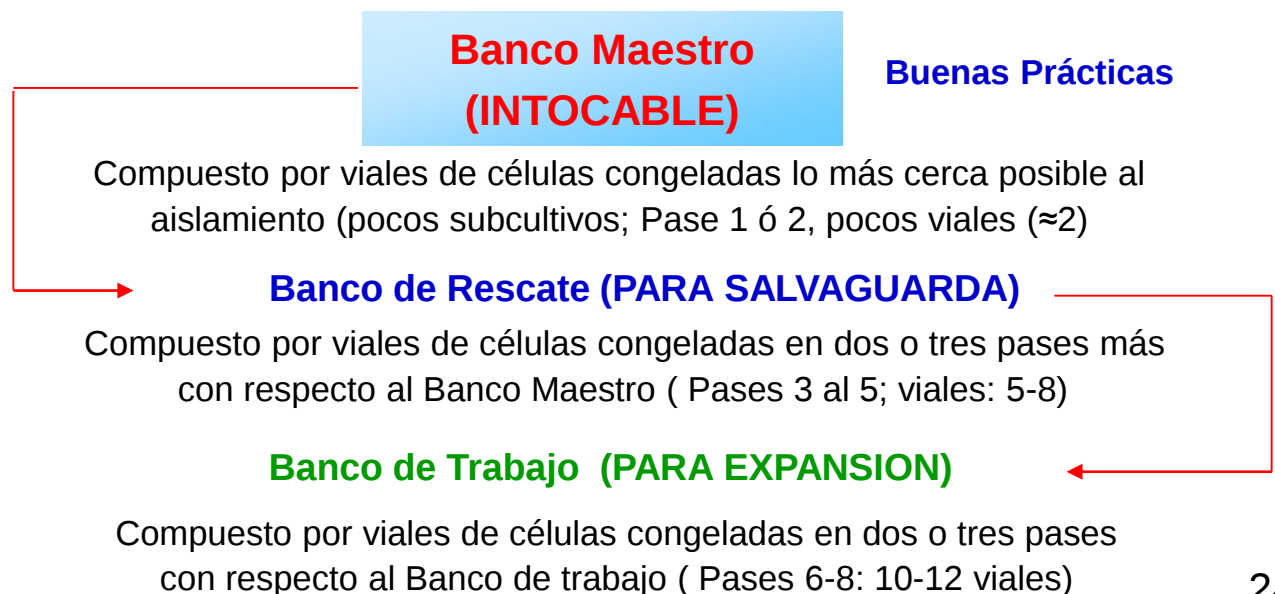
Las cajuelas que guardan los viales en el interior del tanque también pueden variar según el fabricante. Se prefieren aquellas que puedan guardar cajas en gavetas o cajones. Cada caja posee una tapa cuadrículada en la cual se muestran coordenadas (Fig. 10). Se debe anotar meticulosamente en qué caja y en qué posición se encuentra cada muestra. Los



Figura 10. Cajas con cuadrículas para guardar viales en nitrógeno líquido.

reservorios en forma de cesta no son recomendados por no contar con la posibilidad de ordenar las muestras en su interior, además de la frecuente pérdida (caída al fondo del tanque) de las muestras.

Estrategia general para la conservación del BRG



FICHA DE REGISTRO DE MUESTRAS TOMADAS EN TERRENO

INFORMACION DE CAPTURAS PROYECTO FIA-UdeC

Ficha No _____

Fecha _____

Lugar _____ Zona _____

Localidad _____ Ciudad _____

Coord. Geográficas _____

Método de Captura

Trampa Cebo ☐ Dardo ☐ % Efectividad _____

Distan. Disparo _____

%Efectividad / Noches trampa

Temperatura _____ Humedad Relativa _____ Altura _____

Descripción del hábitat _____

Especificaciones del espécimen

Nombre Común _____

Nombre Científico _____

Clase _____

Orden _____

Familia _____

Peso Vivo _____ Edad aproximada _____ Sexo _____

Condición Corpórea _____

Obtención de muestras

Hora _____ Tipo de muestra _____

Anestesia si ☐ no ☐ Tipo _____

Protocolo Muestra

Desinfección alcohol 70% si ___ no ___ **Tiempo** _____

Medio de cultivo _____

Tratamiento posterior _____

Observaciones _____

Colector _____

Nota: Una vez realizados los procedimientos anteriores, el animal es liberado nuevamente en su ambiente natural.

ANEXO: CARACTERÍSTICAS DE LAS ESPECIES DE NUESTRO BRG

Huemul

Nombre común: Huemul

Nombre científico: *Hippocamelus bisulcus*

Clase: Mammalia

Familia: Cervidae



Zorro

Nombre común: Zorro Chilote

Nombre científico: *Pseudalopex fulvipes*

Clase: Mammalia

Familia: Canidae



Gato Guiña

Nombre común: Guiña

Nombre científico: *Leopardus guigna*

Clase: Mammalia

Familia: Felidae



Comadreja trompuda

Nombre común: Comadreja trompuda

Nombre científico: *Rhyncholestes raphanurus*

Clase: Mammalia

Familia: Caenolestidae



Chichilla

Nombre común: Chinchilla Chilena

Nombre científico: *Chinchilla lanigera*

Clase: Mammalia

Familia: Chinchillidae



Picaflor de Juan Fernández

Nombre común: Picaflor de Juan Fernández

Nombre científico: *Sephanoides fernandensis*

Clase: Aves

Familia: Trochilidae



Llaca

Nombre común: Llaca

Nombre científico: *Thylamis elegans*

Clase: Mammalia

Familia: Didelphidae



Pudú

Nombre común: Pudú.

Nombre científico: *Pudu puda*

Clase: Mammalia

Familia: Cervidae



REFERENCIAS

1. Wildt DE., Seal US., eds. (1994). Population biology aspects of genome resource banking. Apple Valley (MN): IUCN-World Conservation Union Species Survival Commission's Conservation Breeding Specialist Group.
2. Hayes O., Ramos B., Rodriguez LL., Aguilar A., Badia T., Castro FO. (2005a) Anim. Reprod. Sci 873–4: 181–192.
3. Freshney RI. (2000). Culture of animal cells: a manual of basic technique. Wiley, Toronto, 2000.
4. Hayes O., Rodriguez LL., Gonzalez A., Falcon V., Aguilar A., Castro FO. (2005b) Zygote 134: 277–282.
5. Tovar H., Navarrete F., Rodríguez LL., Skewes O and Castro F.O. (2008). In Vitro Cell.Dev.Biol.—Animal 44:309–320.
6. Rodríguez LL., Navarrete FI., Tovar H., Cox JF and Castro, F.O. Journal of Assist Reprod Genet 25:13–16.
7. Cofré H., Marquet PA. (1999). Biological Conservation: 53-68.
8. Bartels P., Wildt DE. 1994. Genome resource banking for conservation in Africa. Apple Valley (MN): IUCN-World Conservation Union Species Survival Commission's Conservation Breeding Specialist Group.