

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**“Desarrollo y conservación de cultivos celulares de caballo de Przewalskii
(*Equus ferus przewalskii*).Una especie en peligro de extinción”**

por

María José ESTRADÉ ECHEGUÍA



TESIS DE GRADO presentada como uno
de los requisitos para obtener el
Título de Doctor en Ciencias Veterinarias
Orientación Medicina Veterinaria

MODALIDAD: Estudio de Caso

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2012**



FV-29572

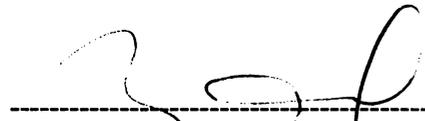
Tesis de grado aprobada por:

Presidente de Mesa:



ALEJANDRO BIELCI
Nombre completo y Firma

Segundo Miembro (Tutor):

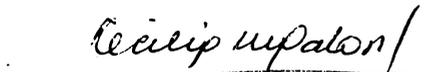


Nombre completo y Firma
R. PUENTES

Tercer Miembro:

Nombre completo y Firma

Co tutor:

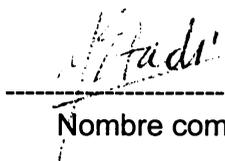


Nombre completo y Firma
GALOSI CECILIA

Fecha:

31/5/2012

Autor:



MARÍA I. ESTRADÉ
Nombre completo y Firma

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a quienes contribuyeron en la realización esta tesis. Especialmente a mi tutor Rodrigo, que me tuvo mucha paciencia cuando postergué varias veces mi tesis por irme de viaje, y que me ha dado el ejemplo de lo que es un profesional responsable y dedicado. A mi co tutora Cecilia, una persona maravillosa a quien tuve la suerte de conocer a través de esta tesis. A Gabi, el Gato, el Zorro y Rafa, que compartieron el inicio de este proyecto y me han enseñado tanto. Al Zoológico de Villa Dolores, por permitirnos extraer las muestras para este trabajo, especialmente al Doctor Cirilo y a la Doctora Zipitría, quien me abrió las puertas del zoo hace años y me trató de la mejor manera. Al Doctor Mirazo, por darme fotos del caballo de Przewalskii de Montevideo. Y a todos los Veterinarios y Científicos de los Zoológicos de San Diego, Washington, y Praga, que me brindaron su tiempo contestando mis mails y facilitándome protocolos.

Con esta tesis finaliza una etapa que fue para mí un largo camino y gran desafío personal. No podría haber terminado esta carrera sin el apoyo de mis padres y mi hermana, mi abuela y el resto de mi familia; y todos mis amigos, que me acompañaron en los buenos momentos, y me sostuvieron en los no tan buenos.

A todos ellos, muchas gracias.

TABLA DE CONTENIDO

Página

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	6
1. <u>RESUMEN</u>	7
2. <u>SUMMARY</u>	8
3. <u>INTRODUCCIÓN</u>	9
4. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	11
4.1. EL CABALLO DE PRZEWALSKII.....	11
4.1.1. Taxonomía y nomenclatura.....	11
4.1.2. Características morfológicas.....	12
4.1.3. Comportamiento y ecología.....	12
4.1.4. Desarrollo y reproducción.....	13
4.1.5. Historia de la especie.....	14
4.1.5.1: Descubrimiento para Occidente.....	14
4.1.5.2: Captura.....	14
4.1.5.3: La especie en cautiverio.....	15
4.1.5.4: La especie en su hábitat.....	15
4.1.5.5: La recuperación de la especie.....	16
4.1.5.6: Problemas enfrentados en la recuperación.....	16
4.1.6. El caballo de Przewaslki en la actualidad.....	17
4.1.7. Importancia de la especie.....	17
4.1.8. El ejemplar de Montevideo.....	18
4.2. CONSERVACIÓN DE LAS ESPECIES EN PELIGRO.....	19
4.2.1 Qué es la biodiversidad y porqué es importante conservarla.....	19
4.2.2 Estrategias de conservación.....	20
4.3. LOS BANCOS DE RECURSOS GENÉTICOS.....	21
4.3.1 Concepto y generalidades.....	21
4.3.2 Importancia de conservar gametos y embriones.....	22
4.3.3 Importancia de conservar muestras de tejidos diploides viables.....	23
4.3.4 Los bancos de recursos genéticos en la actualidad.....	24
4.4. LOS CULTIVOS CELULARES Y SU APLICACIÓN EN LA CONSERVACIÓN DE LAS ESPECIES.....	27
4.4.1 Generalidades sobre cultivos celulares.....	27
4.4.2 Aplicaciones en conservación de especies en peligro.....	28

5. <u>HIPÓTESIS</u>	29
6. <u>OBJETIVOS</u>	30
6.1 OBJETIVO GENERAL.....	30
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
7. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	31
7.1 MUESTRAS DE TEJIDOS.....	31
7.2 PROCESAMIENTO.....	31
7.2.1 Criopreservación de tejidos.....	31
7.2.2 Desarrollo de cultivos celulares a partir de tejido fresco.....	31
7.3 ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD DEL MATERIAL CONGELADO.....	32
7.3.1 Trozos de tejidos.....	32
7.3.2 Cultivos celulares congelados.....	32
7.4 INFECCIÓN VIRAL DE LOS CULTIVOS CELULARES.....	32
7.5 RECUPERACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE LA COLA DEL EPIDÍDIMO Y ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO DEL TESTÍCULO.....	33
8. <u>RESULTADOS</u>	34
8.1 TEJIDOS CULTIVADOS DIRECTAMENTE COMO EXPLANTOS.....	34
8.2 FRAGMENTOS CONGELADOS.....	34
8.3 INFECCIÓN DE LOS CULTIVOS CON HERPESVIRUS EQUINOS.....	34
8.4 RECUPERACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE LA COLA DEL EPIDÍDIMO Y ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO DEL TESTÍCULO.....	35
9. <u>DISCUSIÓN</u>	36
10. <u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	40
11. <u>FIGURAS</u>	46

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Página

Fig. 1: <i>Equus ferus przewalskii</i> , macho adulto.....	46
Fig. 2: <i>Equus ferus przewalskii</i> , macho adulto	46
Fig. 3: Warszawa 18, o “Tabún” en el Zoo de Villa Dolores en 2003.....	47
Fig. 4: Explanto de piel, al día 12 de cultivo.....	48
Fig. 5: Monocapa de células fibroblásticas.....	48
Fig. 6: Monocapa de células fibroblásticas de caballo de Przewaski infectada con EHV-1.....	49
Fig. 7: Monocapa de células fibroblásticas de caballo de Przewaski infectada con EHV-2	49
Fig. 8: Monocapa de células fibroblásticas de caballo de Przewaski infectada con EHV-3	49
Fig. 9: Monocapa de células fibroblásticas de caballo de Przewaski infectada con EHV-4	49
Fig. 10: Inmunocitoquímica: Células de caballo de Przewalski infectadas con EHV-1 (Aumento 100X).....	50
Fig. 11: Inmunocitoquímica: Células de caballo de Przewalski infectadas con EHV-1(Aumento 400X).....	50
Fig. 12. Inmunocitoquímica. Monocapa de células de caballo de Przewaslki sin infectar (Control negativo de infección) (MO 100x).....	50

1. RESUMEN

El caballo de Przewalski o caballo salvaje mongol (*Equus ferus przewalskii*), es la única especie salvaje de caballo que existe en la actualidad. Originario de Asia, es una especie seriamente amenazada. En el Uruguay, existió un solo ejemplar de esta especie, que murió en 2009 sin dejar descendencia. El objetivo de este trabajo fue conservar tejidos y desarrollar cultivos primarios a partir de muestras tomadas del ejemplar de caballo de Przewalski muerto. Se extrajeron muestras de piel, músculo esquelético, músculo cardíaco y cartílago auricular del animal luego de quince horas de su muerte, y se conservaron refrigeradas en buffer fosfato salino (PBS) con antibióticos hasta su procesamiento. Parte de las muestras fueron procesadas y congeladas directamente, y parte fueron cultivadas como explantos. Se utilizó el Medio mínimo esencial (MEM) suplementado con Suero Fetal Bovino y se siguieron protocolos estándares para el desarrollo y la propagación de los cultivos celulares. Se obtuvieron monocapas de cultivos de fibroblastos a partir de muestras de piel, de músculo esquelético y de cartílago auricular. No fue posible obtener cultivos a partir del músculo cardíaco. Las células obtenidas fueron subsecuentemente propagadas, con un bajo número de pasajes para evitar alteraciones genéticas y fenotípicas, y luego congeladas en nitrógeno líquido. Muestras de los tejidos y cultivos congelados fueron posteriormente descongelados para evaluar su viabilidad y crecimiento *in vitro*, y su posible aplicación para estudio de virus equinos. Se generó un banco de células del caballo de Przewalski que existió en el Uruguay, que podrán ser utilizadas en el futuro con propósitos de investigación científica y de conservación de la especie.

2. SUMMARY

The Przewalski's horse or Mongolian wild horse (*Equus przewalskii*, Poljakov, 1881) is presently the only species of wild horse in existence. Originally from Asia, it is classified as in extremely high risk of extinction. There was a single specimen of this species in Uruguay, which died in 2009 leaving no offspring. The aim of this work was the preservation of tissues and the development of cell cultures from tissue samples obtained from this Przewalski's horse after its death. Biopsies of skin, skeletal muscle, cardiac muscle, and ear cartilage were removed from the horse 15 hours after its death, added to Phosphate Buffer Saline (PBS) with antibiotics and refrigerated until processing. Some of the samples were frozen in liquid nitrogen and the other were grown as explants. For the development and propagation of the cell cultures, Minimum Essential Media (MEM) supplemented with bovine fetal serum (FCS) was used, and culture was performed following standard procedures. Monolayers of fibroblasts were obtained from skin, skeletal muscles and ear cartilage samples. It was not possible to obtain cultures from the cardiac muscle samples. The cell cultures obtained, were subsequently propagated with low passages, and frozen in liquid nitrogen, thus avoiding genetic and phenotypic alterations. Then tissues and cell cultures were thawed to ascertain their viability by checking its progressive growth in a flask, and their possible use in studies with viruses affecting equines. A bank of tissues and cells from the single Przewalskii's horse that existed in Uruguay was generated, and can be used for scientific purposes and for the conservation of the species in the future.

3. INTRODUCCIÓN

La conservación de la biodiversidad es clave para mantener la vida en el planeta (Wilson, 1992). El rápido crecimiento demográfico humano ha puesto grandes presiones sobre los ecosistemas, destruyéndolos y desplazando a las otras especies de sus hábitats naturales. Como respuesta a esto, y para evitar la desaparición de las especies, surgió la necesidad de desarrollar estrategias de conservación (Wildt y col., 1997). De acuerdo con Soulé (1991), la estrategia con mayor impacto para la conservación, es la protección *in situ* dentro de los hábitats naturales de las especies, pero en la actualidad esta estrategia puede no ser practicable para algunos casos. Luego se encuentra la protección de las especies fuera de sus hábitats, o protección *ex situ*. El desarrollo de programas de conservación *ex situ* apropiados para especies en peligro de extinción, debería incluir conservación a largo plazo de tejidos y células de las especies (Tovar y col., 2008). La conservación de gametos y embriones brinda beneficios muy importantes en el manejo reproductivo de las poblaciones cautivas de especies salvajes. La conservación de células diploides viables es igualmente importante, ya que entre otras aplicaciones, proporciona el material genético necesario para la investigación científica que sustenta la conservación de las especies. En la práctica, es común el uso de tejidos de piel para la generación de líneas de células somáticas para distintas aplicaciones, pudiéndose obtener directamente de tejidos frescos o de biopsias congeladas (Tovar y col., 2008). Es sabido que el establecimiento de cultivos celulares *in vitro* es costoso, susceptible a la contaminación (Lincoln y Gabridge, 1998), y proclive a la deriva genética y genotípica (Simione, 1992; Freshney, 2005).

El caballo de Przewalski o caballo salvaje mongol (*Equus ferus przewalskii*), originario de Asia, es la única especie de caballo salvaje que existe en la actualidad. Posee 66 cromosomas, por lo que difiere genéticamente del caballo doméstico (*Equus caballus*) que tiene 64 (Benirschke y col., 1965; Myka y col., 2003); sin embargo su cruzamiento produce descendencia fértil (Ahrens y Stranzinger, 2005).

Es una especie seriamente amenazada (IUCN, Red List, *Equus ferus przewalskii*). Fue una especie extensamente extendida en Asia y particularmente en Mongolia, extinguiéndose de la naturaleza en la década de 1960 (Van Dierendonck y Wallies De Vries, 1996). La situación de especie alcanzó su estado más crítico en la década de 1950, en que quedaban unas pocas decenas de animales en cautiverio, y en esas fechas empezaron los esfuerzos conservacionistas a escala mundial que salvaron al a especie de la extinción definitiva.

En la actualidad existen en el mundo aproximadamente 2000 ejemplares de *Equus ferus przewalskii*. A partir de la década de 1990, y luego de etapas de adaptación en condiciones semi salvajes en reservas, se han reintroducido exitosamente algunos ejemplares en parques nacionales en Mongolia.

Uno de los principales problemas enfrentados en la recuperación de la especie fue el bajo número de animales fundadores con los que se contaba para los programas de reproducción asistida, con la consiguiente escasez de variabilidad genética que esto supone. La depresión endogámica o *inbreeding*, con sus consecuencias deletéreas para la supervivencia de la especie, debieron ser manejadas con consideración. Todos

los caballos de Przewalski que existen en la actualidad son descendientes de 13 individuos, el último de los cuales fue capturado en Mongolia en el año 1947 (Oakenfull y Ryder, 1998; Bowling y col., 2003).

Parte de la importancia mundial de esta especie está relacionada al éxito obtenido en su recuperación, que sirve como ejemplo y antecedente para programas actuales y futuros con otras especies amenazadas.

En nuestro país, en el Zoológico Municipal de Villa Dolores (Montevideo - Uruguay), existió un único ejemplar de la especie desde el año 1985, proveniente de Polonia. El mismo estaba inscripto en el Studbook de la especie con el número 1106, y bajo el nombre de Warszawa 18. En Mayo del 2009, el animal debió ser sacrificado, con 26 años de edad, y sin haber dejado descendencia.

El objetivo de este trabajo fue la conservación de tejidos y el desarrollo de cultivos celulares primarios a partir de muestras tomadas de este ejemplar de caballo de Przewalski, de forma tal que el material genético de este animal se conservará y quedará disponible para su uso futuro en investigación.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 EL CABALLO DE PRZEWALSKI

4.1.1 Taxonomía y nomenclatura

- Reino: Animal
- Phylum: Cordados
- Clase: Mamíferos
- Orden: Perisodáctilos
- Familia: Equidae
- Género: Equus
- Especie: Equus ferus
- Subespecie: Equus ferus spp przewalskii

Nombre comunes: Caballo salvaje asiático, caballo salvaje Mongol, Caballo de Przewalski, Takhi.

La Familia *Equidae* comprende un único género, el *Equus*, que alberga varias especies de burros, cebras y caballos. En la actualidad sólo existen dos especies de caballo: el caballo doméstico *Equus caballus* (Linnaeus, 1758), y el caballo de Przewalski *Equus ferus przewalskii* (Boyd y King, 2011). El nombre de *Equus ferus* (*ferus*, de feral, que significa salvaje) hace referencia a las especies salvajes de caballo, del cual el Przewalski es el único representante vivo en la actualidad. La otra subespecie que existió, el Tarpán, *Equus ferus tarpan*, se extinguió alrededor de 1897 (Bouman, 1986). La designación de la especie como *Equus ferus przewalskii* es reciente, de 1986 (Boyd y King, 2011). La especie no fue descrita por Linneo en el *Systema Naturae*, (si lo fue el caballo doméstico *Equus caballus*). Luego de su descubrimiento para occidente, fue denominado *Equus przewalskii*, en 1881 por el zoólogo ruso I.S. Polyakov, en honor a su descubridor, como se describirá más adelante.

El caballo doméstico y el de Przewalski comparten la gran mayoría de su material genético (Myka y col., 2003). La relación evolutiva entre ambas especies ha sido más controvertida. En un principio se pensaba que el Przewalski era un ancestro del caballo doméstico (Ballou, 1986). Se pensó también que el Przewalski derivaba de algún linaje de caballo doméstico (Lau y col, 2009), o que las dos especies se mezclaron en algún

punto luego de derivar ambas de un ancestro común (Oakenfull y Ryder, 1998). El estudio más reciente sobre el tema deja claro que el Przewalskii no es ancestro del doméstico, y que ambos derivarían de un ancestro común (Goto y col., 2011).

Desde el punto de vista cariotípico, el caballo de Przewalski cuenta con un número diploide de $2n=66$ cromosomas, mientras que el caballo doméstico cuenta con $2n=64$. Hay estudios que sustentan que la única diferencia entre los cariotipos de ambas especies está dada por una translocación Robertsoniana, que hace que el cromosoma número 5 del caballo doméstico corresponda a los cromosomas 23 y 24 del Przewalskii unidos (Myka y col., 2003; Ahrens y Stranzinger, 2005; Goto y col., 2011). Recientemente se informó que el estado ancestral correspondía al número diploide $2n=66$ del Przewalskii, y que la traslocación Robertsoniana resultó en el $2n=64$ del caballo doméstico (Goto y col., 2011).

Ambas especies pueden reproducirse entre sí, y su descendencia es fértil, a diferencia de lo que ocurre entre otros cruzamientos interespecíficos entre équidos, en que los híbridos no son capaces de reproducirse (Myka y col., 2003).

4.1.2 Características morfológicas

El Caballo de Przewalski, como perteneciente a la especie Equina, presenta un aspecto muy similar a un caballo doméstico. Hay algunas diferencias morfológicas a destacar. Son más pequeños y compactos que la mayoría de los caballos domésticos, con un cuello fuerte y ancho, y miembros cortos. Los pelos de la crin y la cola se mudan cada año, a diferencia del caballo doméstico. Las crines son erectas, cortas, y no tienen cerquillo (Fig. 1). La base de la cola cuenta con pelos cortos. Con respecto al pelaje, hay dos tipos de capas principales, uno marrón rojizo más oscuro; y otro más pálido, amarillento-grisáceo. La cabeza y el cuello son más oscuros que el cuerpo, y éste es más oscuro que las partes declives. El hocico es claro, gris, con los ollares más oscuros (Fig. 2).

La altura a la cruz de los machos promedia 1.42 m, y en las hembras 1.37 m. El largo promedio de cabeza y cuerpo es de 2.10m. El peso está entre 200-300 kg.

Presentan una línea oscura a lo largo del cuello y del dorso hasta la base de la cola; y pueden presentar líneas oscuras horizontales en los miembros, en las regiones carpianas y tarsianas (Boyd y Houpt, 1994).

4.1.3 Comportamiento y ecología

Lo que se sabe sobre el comportamiento de la especie procede de observaciones de los animales en cautiverio en zoológicos y reservas, y se han hecho inferencias a partir de comportamiento en otros caballos salvajes. Luego de la reintroducción se ha observado la adaptación de los caballos a la vida salvaje nuevamente.

Los caballos de Przewalski son animales gregarios, que viven en grupos. Hay dos tipos principales de grupos: los harenes o familias, y los grupos de machos jóvenes. Las familias están compuestas por un semental y 3 o 4 hembras, junto con sus pequeñas crías y algunos potrillos mayores, de alrededor de un año. Los grupos presentan una estructura jerárquica. El padrillo es el individuo dominante, y cumple función de defensa y protección del grupo. El semental suele rodear al grupo de hembras ante una amenaza, y enfrentarla. Existe también una jerarquía entre las hembras, y la hembra dominante es quien guía a la manada cuando se desplazan, mientras que el semental va a la retaguardia. Suelen desplazarse en una fila aproximada. Los machos jóvenes son expulsados del grupo por el padrillo cuando tienen alrededor de dos años, y pasan a formar parte de los grupos de machos jóvenes. La pertenencia a estos grupos es importante para la socialización y aprendizaje. Las potrancas abandonan las familias más tarde que los potrillos, y pueden pasar a otras familias, o ser reclutadas por algún macho joven para formar su propio harén. Los grupos de machos están formados por machos jóvenes, y también tienen un padrillo mayor que los guía. Permanecen con el grupo unos 3 o 4 años, y luego lo abandonan para buscar su propio harén, ya sea uno nuevo, o más raramente a tomar posesión de uno ya formado, a cuyo semental desplazan mediante un combate, que suele ser mucho más agresivo que un encuentro entre machos de grupos familiares.

Los grupos tienen un territorio, a través del cual se desplazan varios kilómetros por día, en busca de abrigo, alimento y agua. Los territorios de varios grupos pueden superponerse, y se producen enfrentamientos entre los sementales cuando los grupos se encuentran, pero estos enfrentamientos suelen consistir en una serie de interacciones no demasiado agresivas (Bouman, 1986).

4.1.4 Desarrollo y reproducción

Las yeguas pueden concebir desde los dos años de edad, aunque suelen tener la primera cría a los 4 años. Permanecen fértiles hasta los 20 años, pero hay registros de hembras que han parido a los 24 años. Son poliéstricas estacionales. Las manifestaciones de estro incluyen acercamiento al semental, labios relajados, micción ante estímulos.

Los machos también presentan cambios estacionales en la producción de esperma y en el comportamiento sexual, aumentando en primavera y verano. Los testículos de los machos descienden más tarde que en el caballo doméstico, a los 2 o 3 años de edad. Los machos jóvenes pueden presentar incapacidad para copular debido a subordinación ante machos mayores.

La gestación, de un solo potrillo, dura 11 meses. Los potrillos pesan aproximadamente 30 kilogramos al nacimiento. Las hembras que quedan preñadas inmediatamente luego del parto, destetarán su potrillo al año. (Monfort, y col., 1991; Boyd y Houpt, 1994).

4.1.5 Historia de la especie

4.1.5.1 Descubrimiento para Occidente

Los caballos salvajes habitaban toda Europa y Asia en tiempos prehistóricos. Hay pinturas rupestres en cuevas en Francia e Italia que muestran caballos salvajes, de aspecto similar al Przewalski, que tienen alrededor de 20 000 años. El crecimiento demográfico humano en Europa forzó a los caballos salvajes a desplazarse hacia Europa del Este y Asia. El Tarpán, *Equus ferus tarpan*, la otra especie de caballo salvaje, vivió en las estepas de Ucrania y del sur de Rusia; y se extinguió alrededor del 1900. El Przewalski fue desplazado más hacia el Este, y sus últimos territorios corresponden a las actuales Mongolia y China, específicamente la región del desierto de Gobi.

El caballo de Przewalski permaneció desconocido para Occidente por mucho tiempo. Los primeros reportes datan del siglo XVIII, en que un médico escocés al servicio del Zar de Rusia reporta haber visto caballos salvajes en la zona de la actual frontera entre Mongolia y China. Al final del siglo XIX, el Coronel Nikolai Przewaskii, un explorador también al servicio de Rusia, retornó a San Petersburgo con un cráneo de un equino, obtenido en China. Este cráneo fue examinado por I.S Poliakov, en el Museo Zoológico de la Academia de Ciencias de San Petersburgo, quien determinó que se trataba de una especie desconocida, y lo bautizó *Equus przewalskii*, en honor al explorador. Los primeros en observar a los caballos en libertad fueron los hermanos Grum-Grzhimailo, cazadores rusos, que describieron el aspecto de las manadas, y que también mataron ejemplares y los llevaron a San Petersburgo para su estudio (Bouman, 1986; Boyd y King 2011).

4.1.5.2 Captura

El descubrimiento de esta nueva especie generó interés, y surgieron proyectos para capturar ejemplares vivos. En esa época era común que gente adinerada adquiriera ejemplares de especies salvajes para colocarlos en sus tierras, y existían mercaderes de animales salvajes que se dedicaban a capturar fauna silvestre para vender a zoológicos y particulares. Se organizaron varias expediciones para capturar caballos. Fue rápidamente evidente que los adultos eran rápidos, resistentes y agresivos, y por tanto difíciles de apresar. Se optó por capturar potrillos jóvenes, luego de agotarlos tras largas persecuciones, y usualmente dando muerte a los adultos de la manada que protegían a sus crías. Seis potrillos fueron capturados de esta manera en 1898, pero murieron rápidamente al no ser alimentados de forma óptima. Los potrillos capturados en años subsiguientes fueron colocados con yeguas nodrizas para asegurar su crianza. Entre 1899 y 1903 se capturaron muchísimos potrillos, pero unos pocos llegaron a Occidente vivos. Un adinerado alemán, el Barón von Falz-Fein, fue uno de los promotores de las capturas, y logró establecer un grupo de caballos de Przewalskii en sus tierras en Askania Nova, en Ucrania. Este sitio y esta población tienen importancia en la posterior historia de la especie. Otros potrillos fueron diseminados por diversos sitios en Europa. Luego el interés de los zoológicos por la especie disminuyó, entre

otras razones por su aspecto tan similar al de un caballo doméstico que no llamaba demasiado la atención del público, y por el enorme costo de su captura; por lo que las capturas cesaron. En 1947 se capturaron unos pocos individuos más. Pocos animales llegaron vivos a occidente por el largo viaje que debían realizar desde su lugar de origen en el centro de Asia. Una vez capturados los potrillos debían recorrer largas distancias a pie con sus nodrizas, bajo climas extremos, hasta una estación del tren transiberiano, en el que eran cargados y llevados hasta Hamburgo, en Alemania, desde donde eran distribuidos por el mundo, generalmente en pares o grupos pequeños. El viaje podía llevar hasta 8 meses. Muchos de los caballos murieron al poco tiempo en su lugar de destino, debido probablemente a complicaciones de los largos viajes (Bouman, 1986).

4.1.5.3 La especie en cautiverio

Acostumbrados a los grandes espacios abiertos, y a la vida en grupo, la adaptación al confinamiento en espacios reducidos y a vivir en pares fue difícil para los Przewalski. De los sobrevivientes, sólo unos pocos se reprodujeron. En los años previos a la segunda guerra mundial, había unas pocas decenas de caballos en 20 zoológicos de Europa y Estados Unidos. Muchos murieron por bombardeos y actividades militares durante la guerra, entre ellos todos los caballos de Askania Nova. En 1945, quedaban sólo 31 individuos en cautiverio, la mayoría en Munich y Praga, desde donde fueron redistribuidos a zoos de todo el mundo. En 1957 llegó a Askania Nova, el último caballo capturado de su hábitat silvestre 10 años antes, una yegua llamada Orlitza III (Bouman, 1986).

4.1.5.4 La especie en su hábitat

La historia de la población salvaje también está marcada por los acontecimientos humanos. Cuando la especie fue descubierta, a fines del siglo XIX, aún podían verse manadas en China y Mongolia, y aunque se desconoce su número, los escasos avistamientos reportados hacen pensar que no eran demasiado numerosos. Se supone que hasta la segunda guerra mundial, la población no cambió sustancialmente. Pero para el final de dicha guerra, la población había sido diezmada. Se proponen varios factores que contribuyeron a este descenso. Hubo cambios políticos en la zona, que hicieron que el hábitat del Przewalski fuera escenario de actividades militares, por lo que los caballos fueron cazados, y expulsados de su territorio y de sus fuentes de alimento y bebida, y obligados a retirarse a áreas más inhóspitas. Debieron además competir por sus recursos con los una vez nómades habitantes y sus cultivos y rebaños; especialmente por sus fuentes de agua, que quedaron inaccesibles para el Przewalski en medio de territorios habitados por humanos. Se cree que las expediciones de caza a principio de siglo también contribuyeron al descenso, pues muchos individuos murieron y otros fueron dispersados en las cacerías.

El último registro que se tiene de los caballos de Przewalski en la libertad data del año 1969, realizado por un científico mongol en el área de Gobi, en Mongolia. Expediciones

posteriores en busca de la especie fueron infructuosas. Se declaró a la especie extinta en su hábitat natural (Bouman, 1986; Boyd y King 2011).

4.1.5.5 La recuperación de la especie

Ya en la década de 1950 se hizo evidente que el estado de la especie era preocupante, y en 1959 se realizó el primer simposio internacional sobre protección del caballo de Przewalski, organizado por el zoo de Praga (Kus, 2009). Se concluyó que el estado de la especie en la naturaleza era catastrófico, y se urgió a los países en que el Przewalski habitaba que evaluaran el estado real de la población silvestre, y a tomar medidas de protección, que en ese momento no fueron aplicadas. Se creó el primer Studbook de la especie, que registraba a todos los animales en cautiverio y que por años fue la base fundamental para dirigir los cruzamientos futuros. Las conclusiones a las que se llegó en este simposio fueron el impulso para que se intensificara la cría de los caballos en cautiverio. Y ya en este simposio se planteó el objetivo de, algún día, reintroducir la especie en su hábitat original, y por tanto, se marcó la importancia de estudiar a la especie en profundidad, su ecología, su biología y su comportamiento (Kus, 2009). Hubo más simposios en 1965, 1976, 1980, 1990, y 1999.

En 1979, se creó el plan de supervivencia de la especie en Norteamérica (SSP Species Survival Plan), y en 1986 el plan europeo (EEP Europäisches Erhaltungszucht-Programme). Uno de los primeros esfuerzos para la conservación de la especie fue la creación de la Fundación para la preservación y protección del caballo de Przewalski en Holanda, en 1977. Su objetivo último era la reintroducción de la especie en la libertad. Se crearon otras organizaciones similares con los mismos objetivos (Bouman, 1986).

Dado que la especie fue conservada en cautiverio por numerosas generaciones, previo a su reintroducción en la naturaleza, se pasó por etapas en “semi reservas”, que son grandes extensiones de terreno fuera del hábitat originario del Przewalski, en que se mantuvo a la especie para que se fuera readaptando gradualmente a la vida en libertad. Finalmente, y luego de extensa investigación para elegir los lugares adecuados, se produjo la reintroducción de la especie en la naturaleza, desde el año 1992 (Bouman, 1986; Boyd y King 2011).

4.1.5.6 Problemas enfrentados en la recuperación de la especie

Como se mencionó anteriormente, sólo unos pocos de los ejemplares que llegaron a occidente a principios del siglo XX se reprodujeron. De hecho, sólo 12 ejemplares originarios de su hábitat natural contribuyeron con genes al pool actual de la población. Once de ellos fueron capturados entre 1897 y 1902, el último de los cuales murió en 1939. El fundador número 12 es la yegua capturada en 1947. Los fundadores 13 y 14 son híbridos, producto de cruzamiento entre ejemplares machos Przewalski y hembras domésticas de tipo Mongol y Tarpán (Boyd y King, 2011). Cuando se dejaron de ver los

individuos en la naturaleza, quedó claro que no se contaría con nuevas sangres para introducir entre los ya muy emparentados individuos cautivos (Kus, 2009).

Por tanto, y como ocurre en todas las especies cuyo número se ve reducido tan drásticamente, sólo se contaba con un escaso número de fundadores para los programas de reproducción, con la escasa variabilidad genética. El *inbreeding* o depresión endogámica era un hecho, y ya se reconocían caballos que tenían problemas asociados con este fenómeno. Además, no había conocimiento suficiente sobre la biología general de la especie.

4.1.6 El caballo de Przewalskii en la actualidad

Hoy en día, el studbook de la especie ha superado ampliamente el número 5000, y hay alrededor de 300 individuos en libertad en Mongolia (Boyd y King, 2011). Hay tres lugares de reintroducción: la reserva Takhin Tal en el desierto Dzungarian Gobi (9 000 km²) desde 1992, el parque Nacional Hustai en la estepa Daguur (570 km²) desde 1994, y en preparación se encuentra un tercer sitio, Khomiin Tal, (2,500 km²), en la depresión de los grandes lagos de Mongolia. Además, alrededor del mundo siguen existiendo las grandes semi reservas, donde los animales viven sueltos, para preparar individuos aptos para su liberación. Además, representan la oportunidad de hacer observaciones de la especie en condiciones semi salvajes. Las principales son Le Villaret (Massif Central, Francia); Buchará (Uzbekistán); Hortobagy National Park (Hungría); Chernobyl (Ucrania); Jimsar (China) ; Gansu National Park (China) ; Anxi Gobi Nature Reserve (China) (Boyd y King, 2011); pero hay muchas otras (Zimmermann, 2005).

La situación de la especie ha mejorado en los últimos años. Está catalogada como en peligro de extinción por la IUCN (International Union for the Conservation of Nature), que es la máxima autoridad mundial en conservación. Esto representa una mejora, pues en la evaluación previa de 2008 se encontraba en peligro crítico de extinción, y la evaluación anterior a ésta, en 1996, lo catalogaba como extinto en la naturaleza (Boyd y King 2011).

De todas formas, el futuro de la especie no está asegurado, y un gran número de amenazas se ciernen sobre él. Hoy los caballos de Przewalskii reintroducidos en la naturaleza conviven con los nómades, con personal militar, y con los ganados de éstos; por lo que hay competencia por los recursos. El riesgo de hibridización con el caballo doméstico es muy grande, así como la transmisión de enfermedades. Los depredadores como los lobos, son causa de muertes de potrillos (Hoesli y col, 2009). Recientemente, en la semi reserva de la zona de exclusión de Chernobil, se han encontrado casos de ejemplares que parecen haber sido matados por humanos para consumo de carne (Gill, 2011).

4.1.7 Importancia de la especie

Además de su importancia intrínseca como especie, y como símbolo de Mongolia, un país cuya historia se ha visto tradicionalmente relacionada a los caballos, el caballo de

Przewalski ha cobrado importancia como ejemplo y antecedente de la recuperación de una especie en extinción.

4.1.8 El ejemplar de Montevideo

El zoológico de Villa Dolores albergó un único caballo de Przewalski desde el 12 de julio de 1985, hasta su muerte el 26 de mayo de 2009. Se trataba de un ejemplar macho, localmente llamado Tabún, nacido en Polonia el 23 de marzo de 1983, inscripto en el Studbook de la especie con el número 1106, bajo el nombre de Waszawa 18 (Fig. 3). Su pedigree se puede consultar en el sitio web del studbook de la especie, llevado a cabo por el zoológico de Praga (<http://przwhorse.pikeelectronic.com/>).

Junto con este ejemplar, desde Polonia viajó a Montevideo una hembra llamada Maja, con número 707 en el studbook. Lamentablemente, la yegua falleció durante el viaje, y futuros esfuerzos para enviar otra hembra a Montevideo, para que se reprodujera con Tabún, fueron infructuosos (Comunicación personal, Evzen Kus 2012*).

En mayo del 2009, Tabún, a los 26 años de edad, debió ser eutanasiado por complicaciones relacionadas con la edad avanzada.

La razón por la cual este individuo fue enviado a Uruguay en fechas en que se estaban haciendo esfuerzos internacionales por reproducir a la especie, fue que su pool genético no era de particular importancia en el momento, ya que su línea genética estaba suficientemente representada por otros individuos en el programa de reproducción. En Latinoamérica, el único lugar donde los caballos de Przewalski se siguen reproduciendo es en el zoológico de La Habana, en Cuba (Comunicación personal, Evzen Kus 2012).

* Evzen Kus, encargado del Studbook del Caballo de Przewalski

4.2 CONSERVACIÓN DE LAS ESPECIES EN PELIGRO

4.2.1 Qué es la biodiversidad y porqué es importante conservarla

Biodiversidad o diversidad biológica son términos utilizados para describir la variedad de la vida en la Tierra. El concepto hace referencia a la variedad y la variabilidad que existe entre los seres vivos y en los complejos ecológicos en que se desarrollan, organizado en múltiples niveles, desde los ecosistemas completos hasta las estructuras químicas que constituyen las bases moleculares de la herencia (Medina Robles y col., 2006). La diversidad biológica es clave para mantener la vida tal como la conocemos (Wilson, 1992). Es indispensable para que los ecosistemas que permiten nuestra vida en el planeta funcionen adecuadamente (IUCN, 2012).

El mantenimiento de la biodiversidad no es sólo importante por razones económicas para el suministro de nuestras materias primas, sino que es esencial para la seguridad energética y alimentaria mundial futura (IUCN, 2012). Las especies animales y vegetales que se utilizan en ganadería y agricultura actualmente son derivados genéticos de especies silvestres. La diversidad genética favorece la adaptación al cambio, por ejemplo al cambio climático, y a la resistencia frente a enfermedades. Además hay razones estéticas y, finalmente pero no menos importante, hay razones éticas para preservar la biodiversidad. Las razones éticas pueden considerarse desde un punto de vista antropocéntrico, en que se conserva la naturaleza por estar ésta al servicio del hombre, e indirectamente se está protegiendo al hombre; o desde un punto de vista intrínseco: conservar la naturaleza por sí misma, por su mismo valor de existir y porque cada individuo y cada especie tienen el mismo derecho a existir que la humana (Medina Robles y col., 2006).

La creciente crisis de extinción muestra que la biodiversidad no está en condiciones de soportar la presión que ejerce la humanidad sobre el planeta. Cada día se pierde biodiversidad a un ritmo muchas veces mayor que la tasa natural (IUCN, 2012). El rápido crecimiento de las poblaciones humanas ha dado lugar a extraordinarias presiones sobre los ecosistemas, tales como la fragmentación del hábitat, la conversión de las tierras para la agricultura y otros usos, el cambio climático, la contaminación y la propagación de especies invasoras. Estas son sólo algunas de las amenazas que provocan la presente crisis (Wildt y col., 1997).

Como ejemplo, entre los mamíferos, de las 4856 especies evaluadas por la IUCN, hay 1093 que se sabe que están amenazadas o que son vulnerables, o sea, el 23 % de las especies de las que se tiene información. Y las cifras reales son probablemente mucho mayores (IUCN, 2012).

Una reacción a estos problemas fue el surgimiento de la biología de la conservación. Un conjunto de disciplinas científicas que se centran en el mantenimiento de la biodiversidad a través de una síntesis cooperativa de ideas, información y enfoques (Wildt y col., 1997). Los problemas en la conservación van más allá de la ciencia; y por lo tanto, la biología de la conservación debe incluir el trabajo conjunto de economistas,

sociólogos y políticos. Muchos países en desarrollo tienen que balancear sus necesidades de conservación de la fauna salvaje con sus responsabilidades para con su población humana (Holt y col., 2003). Y muchos de los países que poseen la mayor biodiversidad son países subdesarrollados, con escasos recursos para destinar a la conservación.

4.2.2 Estrategias de conservación

Michael Soulé, el llamado “padre” de la Biología de la Conservación, describió en 1992 una jerarquía para proteger la biodiversidad, en que la prioridad era conservar las especies en su hábitat natural (protección *in situ*). Otra estrategia es la conservación *ex situ*, que se define como “la conservación de muestras genéticamente representativas de las especies o cultivos, que se mantienen viables a través del tiempo, fuera de sus hábitats naturales o lugares de cultivo, en ambientes controlados y con el apoyo de tecnologías adecuadas” (Frankel y Soulé 1992). Entre las técnicas de conservación *ex situ* se encuentra la creación de los llamados bancos de material genético (Wildt y col., 1997).

Casi todos los biólogos de la conservación han estado de acuerdo en que la preservación del hábitat es la mejor manera de conservar la biodiversidad. Pero este enfoque también ha sido caracterizado como “anticuado” dada la realidad del mundo actual y futuro (Soulé, 1992). Para muchas especies, en la actualidad no hay espacio para sostener a las poblaciones de vida libre. Como los hábitats que quedan disponibles se hacen más pequeños y más aislados, las especies que ocupan estos hábitats también se vuelven más vulnerables a la depresión endogámica, enfermedades epidémicas, desastres naturales y sociales y al cambio climático. En casos como éstos es que se inician programas de cría en cautiverio. Este tipo de programas han salvado a un cierto número de especies de la extinción, por ejemplo, al hurón de patas negras (*Mustela nigripès*), al caballo de Przewalski (*Equus ferus przewalskii*), y la gacela de Speke (*Gazella spekei*) (Roldán y col., 2006).

Tradicionalmente, el objetivo de los programas de cría en cautiverio era producir un gran número de individuos, para luego poder reintroducirlos a la naturaleza. Este objetivo tiene varias desventajas: el costo de mantener grandes cantidades de animales en cautiverio es muy elevado, y los resultados de las reintroducciones a la naturaleza de estas especies han sido limitados. Estos problemas han llevado a la reevaluación de los objetivos de los programas de cría en cautiverio, y hoy en día se los considera un complemento a la protección de la población natural, y no la única estrategia. Entonces, ahora uno de los principales objetivos de estos programas es usar un número limitado de individuos para mejorar el entendimiento de la biología reproductiva de la especie, algo esencial para la reproducción exitosa, y para poder aplicar biotecnologías reproductivas para maximizar la diversidad genética y minimizar el *inbreeding* (Roldán y col., 2006).

4.3 LOS BANCOS DE RECURSOS GENÉTICOS

4.3.1 Concepto y generalidades

El concepto de un banco de recursos genéticos no es una novedad, pues hace tiempo que se almacenan materiales vegetales y animales, con un objetivo principalmente económico y para garantizar fuentes seguras de alimento para el futuro. La organización de depósitos a gran escala es más fácil para plantas que animales, puesto que es más sencillo almacenar semillas, pero de hecho la ganadería se ha beneficiado enormemente de la existencia de bancos de esperma y embriones. En el contexto de la investigación médica, también se han almacenado biomateriales para asegurar la existencia a largo plazo de ciertos genotipos estándar de animales usados en experimentación para asegurar la repetibilidad de los resultados obtenidos por los diferentes investigadores. Y existen bancos de microorganismos que se utilizan habitualmente en investigación (Wild y col., 1997).

La aplicación de los bancos de recursos genéticos para la conservación de las especies en peligro es algo más reciente, y está ligada al desarrollo de la criobiología, y al conocimiento de la biología de las especies a conservar.

En este contexto, los bancos de recursos genéticos son depósitos organizados de gametos y embriones congelados, pero también de tejidos somáticos, como productos sanguíneos, tejidos viables y ADN; recolectados sistemáticamente, para los programas de conservación (Wild y col., 1997; Holt y col., 2003; Pickard y Holt, 2004)

Los científicos rutinariamente han recogido muestras de animales y plantas como especímenes de estudio, dando lugar a las colecciones de los museos tradicionales, los jardines botánicos y los zoológicos. Los bancos de genes son otro tipo de colección, con mucho mayor impacto en la conservación (Wildt y col., 1997).

Por lo general, el concepto de los depósitos de biomateriales congelados se asocia con gametos y embriones, y dentro de los gametos, de esperma en particular, puesto que aún no se ha dominado la técnica de criopreservación y almacenamiento de ovocitos. El esperma puede obtenerse de los individuos vivos mediante diferentes técnicas, pero también a partir del epidídimo de ejemplares muertos (Bruemmer, 2006). Se está avanzando en la conservación de tejidos testicular y ovárico viables, que pueden luego ser implantados en individuos maduros para la producción de gametos (Pickard y Holt, 2004).

Pero la colecta y almacenamiento de otros tejidos y de muestras de sangre también es importante. Sin embargo, es bien sabido que el establecimiento del cultivo *in vitro* de células es muy costoso, susceptible de contaminación (Lincoln y Gabridge, 1998), y propenso a la deriva genética y fenotípica (Simione, 1992; Freshney, 2000). En la práctica, es común el uso de tejidos de la piel como una fuente de líneas de células somáticas para diferentes aplicaciones, y la obtención de muestras puede realizarse directamente de los tejidos frescos, o de muestras congeladas (Tovar y col., 2008).

4.3.2 Importancia de conservar gametos y embriones en el marco de los programas de conservación de especies en peligro

- Permiten un movimiento fácil y barato de material genético entre poblaciones separadas geográficamente. Uno de los objetivos de la conservación es mantener poblaciones animales y vegetales sanas y genéticamente diversas. En vez de transportar animales silvestres sensibles al estrés de un sitio a otro, la heterogeneidad genética podría ser mantenida por el envío de gametos o embriones, y así mitigar los efectos de las presiones de selección natural, deriva génica y la depresión por endogamia (Wildt y col., 1997).
- Reducen o eliminan la necesidad de extraer a los animales del medio silvestre para mantener poblaciones en cautiverio. Pueden obtenerse gametos de los especímenes salvajes y utilizarlos en los programas en cautiverio.
- Podrían funcionar como una reserva de genes, una especie de “seguro” para especies de las que quedan únicamente pequeñas poblaciones en la naturaleza. Las pequeñas poblaciones son vulnerables a las catástrofes ambientales, trastornos políticos y sociales en las regiones que habitan, y los brotes de enfermedades (Wildt y col., 1997). No todas las especies en peligro se benefician de la intervención del hombre mediante reproducción controlada y el uso de técnicas de reproducción asistida. Pero las poblaciones que no la necesitan en un determinado momento pueden requerirlas en el futuro, y se beneficiarán de la creación de bancos de recursos genéticos pues se dispondrá de gametos congelados (Pickard y Holt, 2004).
- Extienden la vida reproductiva de un individuo. La diversidad genética se pierde sólo cuando los animales ya no están disponibles para reproducirse (Ballou, 1992). Mientras se almacenen gametos, embriones o células viables, los genes no mueren con el animal (Wildt y col., 1997). Transportar semen entre poblaciones no solo conecta a las poblaciones a través del espacio, sino también a través del tiempo (Pickard y Holt, 2004).
- Contribuyen a aumentar la eficiencia de la cría en cautividad. En los programas de cría, los cruzamientos son dirigidos estrictamente, para asegurar el mantenimiento de la diversidad genética de las especies. Sin embargo, estas parejas de animales seleccionadas en base a sus genes a veces no suelen ser sexualmente compatibles, y no es raro que estos apareamientos “ideales” no se produzcan después de que los animales han sido enviados desde largas distancias (Roldán y col., 2006). Por lo tanto, cuando las especies se crían estrictamente sobre la base de la genética, habrá una necesidad de recurrir a las técnicas de reproducción asistida tales como inseminación artificial, transferencia de embriones y fertilización *in vitro*, y a los gametos y embriones criopreservados.
- Resuelven problemas de espacio, pues se reduce el número de animales necesarios para el mantenimiento de la diversidad genética (Wildt y col., 1997).

Hoy en día hay muchas especies que requieren atención, pero los zoológicos cuentan con escaso espacio y escasos recursos, por lo que deben priorizar.

4.3.3 Importancia de conservar muestras de tejidos diploides viables

- Los cultivos celulares conservan material genético, y además proporcionan muestras de genoma completo para estudios genéticos (Lermen y col., 2009; Lin-feng Li y col., 2009). Estos materiales tienen amplia aplicaciones para el estudio de la variación genética, filogenia, la paternidad y los procesos como el flujo de genes, la selección y apareamiento (Lermen y col., 2009).
- Otra forma de almacenar material genético por largo tiempo es conservar ADN puro, que se extrae y se purifica a partir de muestras de tejidos (Hleap y col., 2009). Las muestras tradicionales de ADN conservadas en alcohol no son adecuadas para su uso en reproducción o en muchos estudios genéticos, por lo que la criopreservación de células viables obtenidas a partir de pequeñas biopsias es la técnica de elección. Las líneas celulares preservadas contienen todo el genoma y el proteoma necesario para la investigación biológica moderna. Además, pueden ser regenerados cuando se usan, por lo que representan una fuente casi indefinida de información (Lermen y col., 2009).
- Para diseñar un programa de reproducción, es esencial conocer el status genético de una población, y cómo éste varía. Determinar el grado de variabilidad genética presente en una población no es una tarea sencilla, y hay debate entre los genetistas sobre los métodos a emplear. Los *studbooks* han sido tradicionalmente una buena forma de evaluar el parentesco entre los individuos, y hoy en día hay software que permiten analizar los *pedrigrees* de los animales en los *studbooks* y diseñar cruzamientos estratégicos para minimizar el *inbreeding*. Pero para que esto sea efectivo, la información en los *studbooks* debe ser correcta, cosa que no siempre es así. Por ejemplo, el del caballo de Przewalskii comenzó a redactarse en 1959, año en el cual no se manejaban tecnologías que permitieran verificar la paternidad de un individuo. Se pueden usar marcadores moleculares que indican la variabilidad genética de la población (Pickard y Holt, 2004). Pero para ello se debe contar con muestras que contengan el genoma completo de los individuos.
- Los avances recientes en clonación por transferencia nuclear somática de especies domésticas y de laboratorio han hecho pensar que esta biotecnología puede ser una opción para la conservación de las especies en peligro (Ryder, 2002; Holt y col., 2004; Pickard y Holt, 2004). Incluso se ha propuesto recrear especies ya extintas, como el mamut. Ya hay historias de éxito en la clonación de especies en peligro. Se logró obtener clones de lobo gris, utilizando transferencia nuclear y utilizando oocitos de perro (Min Kyu Kim y col., 2007); y de muflón (Ryder, 2002). Pero la aplicación de esta tecnología tiene muchos aspectos a discutir. La clonación es una tecnología muy compleja, que requiere una enorme base de conocimiento sobre la biología de una especie y sobre

técnicas como la sincronización de celos, la recuperación de ovocitos, la producción y transferencia de embriones, entre otras. Recabar toda esta información de una manera científicamente válida es difícil en una especie no amenazada, y en una en peligro de extinción, con un escaso número de individuos, lo es mucho más. Destinar recursos humanos, espaciales y económicos a esta investigación tan extensa cuando hay otras especies desapareciendo que se beneficiarían de inmediato de tecnologías más simples, es sumamente controversial (Pickard y Holt, 2004). Además, hay preocupación sobre la viabilidad de los clones en la libertad. De todas formas se piensa que en un futuro más lejano, puede ser una biotecnología con un impacto importante a la hora de salvar material genético, pero la prioridad por el momento es conservar células viables que contengan este material para su uso futuro (Ryder, 2002).

- Al ritmo actual de desaparición de las especies, puede ocurrir que las mismas desaparezcan antes de que se dilucide completamente la importancia de conservarlas. Y la extinción es para siempre. Esto en sí mismo constituye un fundamento para conservar material genético de las especies.

4.3.4 Los bancos de recursos genéticos en la actualidad

En el mundo existen muchas colecciones de material genético de especies amenazadas, con mayor o menor impacto en la conservación (Holt y col., 2003). Cada cual es manejada por organizaciones individuales, y por tanto, suelen estar desconectadas entre sí, y muchas veces no tiene los fondos suficientes para mantenerse de una manera ideal. Los bancos de recursos genéticos, dada su complejidad, requieren un alto nivel de curaduría, y esto los distingue de las muchas colecciones que se han acumulado alrededor del mundo (Pickard y Holt, 2004).

Algunos ejemplos de proyectos de conservación de material genético de especies amenazadas alrededor del mundo son los siguientes:

- Una de las primeras colecciones, y una de las más grandes del mundo es el Frozen Zoo, de la sociedad zoológica de San Diego, en los Estados Unidos. Este es un ejemplo de un banco para numerosas especies que cuenta con gametos además de cultivos celulares. Este banco está enmarcado en muchos proyectos de reproducción y de estudios genéticos, e incluso brinda muestras a investigadores que las soliciten, así como también asesora y comparte sus protocolos de trabajo. El Frozen Zoo cuenta con muestras de caballos de Przewalski que se han usado para diversas investigaciones. [http://www.sandiegozooglobal.org/what we do banking genetic resources/frozen zoo/](http://www.sandiegozooglobal.org/what%20we%20do%20banking%20genetic%20resources/frozen%20zoo/)
- En Europa, en Inglaterra se lleva a cabo un proyecto llamado Frozen Ark. Su base se encuentra en la Universidad de Nottingham, pero es un proyecto que

nuclea diversas instituciones como museos, acuarios y parques zoológicos, e incluso otras instituciones dedicadas a la creación de bancos de genes en otros países. El objetivo de este proyecto es conservar material genético de las especies animales, y los medios para realizarlo son la coordinación de la toma y almacenamiento de muestras de material genético con valor futuro. Además, cuenta con una base de datos de las muestras colectadas y almacenadas, que puede ser consultada por las diversas instituciones allegadas al proyecto. Brinda protocolos de toma, almacenamiento e identificación de muestras para cualquier institución interesada.

<http://www.frozenark.org/>

- En Alemania, el “Cryo-Brehm”, Banco de Células Alfred Brehm, es un banco especializado en archivar cultivos celulares de especies en peligro. Los cultivos son generados específicamente a partir de animales fallecidos o eutanasiados. Es un consorcio de varias instituciones, con participación de los zoológicos de Hamburg y Rostock, entre otras.

http://www.emb.fraunhofer.de/en/Uebersichtsindex/cellbank_cryo-brehm.html

- En Australia, está el AGSRA: Animal Gene Storage Resource Centre of Australia, que es un consorcio entre la Universidad de Monash en Melbourne y el Zoológico de Sydney. Sus objetivos son, además de almacenar materiales de especies locales, generar conocimiento sobre la biología de las especies, y protocolos de colecta, congelación y almacenamiento de las muestras; para luego asistir en la reproducción de las especies en peligro. Sus muestras están bien identificadas, y la información sobre ellas es accesible.

<http://australianfrozenzoo.srvilasa.com/goals.htm>

- En Sudáfrica, hay un emprendimiento similar, llamado el WBRC: Wildlife Breeding Resource Centre, que se concentra en salvar gametos y tejidos especialmente de animales muertos por cazadores o similar. Este grupo utilizó laboratorios móviles para la recuperación y el procesamiento inicial de las muestras (Holt y col., 2003). Otros programas de bancos en acción se dedican a una sola especie. Por ejemplo, el Smithsonian’s National Zoological Park support of the Black Footed Ferret Recovery Programme, creado como medio de apoyo al programa de conservación del hurón de patas negras en los Estados Unidos (Holt y col., 2003).

- En el marco de un programa de conservación de la gacela de Mohor, se desarrolló un banco de genes de la especie, en un trabajo conjunto entre el instituto de Zoología de Londres y la Estación experimental de la zonas áridas, en Almería, España. Este programa es un ejemplo real de cómo funcionan los bancos integrados a la conservación (Roldán y col., 2006).

http://www.eeza.csic.es/eeza/La_EEZA.aspx

- El European Centre for animal cell culture (ECAAC) en Inglaterra, es un centro que se dedica al almacenamiento de cultivos celulares y otros materiales criopreservados, y además es una institución comercial, que se dedica a la venta de materiales como líneas celulares. Las facilidades de este banco se utilizaron por ejemplo en el marco de la preservación de los tigres siberianos, para almacenar muestras de esta especie. Hay otros países que cuentan con facilidades similares. La ventaja de un centro organizado de este tipo es que se asegura la seguridad y un correcto mantenimiento de las muestras, lo que no ocurre en un centro no especializado (Holt y col., 2003).
<http://www.hpacultures.org.uk/>
- Los esfuerzos se han centrado en unas pocas especies que tienen interés, pero hay grupos taxonómicos que quedan relegados, aunque estén amenazados. Es el caso de los anfibios, un grupo taxonómico que cuenta con más de 500 especies que requerirán de conservación *ex situ*. Por eso, en 2007 se creó la Amphibian Ark que implementa los componentes *ex situ* del Plan de Acción para los Anfibios de la IUCN, y reconoce que la criopreservación de muestras es esencial para apoyar la investigación y la conservación (Lermen y col., 2009).
<http://www.amphibianark.org/>

4.4 LOS CULTIVOS CELULARES Y SU APLICACIÓN EN LA CONSERVACIÓN DE LAS ESPECIES

Como se mencionó anteriormente, hay diversas formas de conservar el material genético. Los cultivos celulares son uno de los métodos, y serán brevemente descriptos a continuación por ser el procedimiento utilizado en este trabajo.

4.4.1 Generalidades sobre cultivos celulares

Un cultivo celular consiste en la multiplicación de células *in vitro*. Los cultivos se denominan primarios cuando derivan directamente de un fragmento de tejido viable obtenido a partir de un ejemplar animal o vegetal. Estos cultivos primarios pueden generarse directamente a partir de un fragmento de tejido cultivado, llamado explanto, creciendo las células desde los bordes del fragmento; o mediante células aisladas obtenidas de trozos de tejido disgregados mecánica y/o enzimáticamente. Los cultivos primarios son en general heterogéneos, puesto que los tejidos que los originan no están compuestos de un solo tipo de células. Cuando se inicia un cultivo, hay una selección entre las células del tejido, y sólo sobreviven y proliferan las que se adaptan a las condiciones de cultivo. Luego, las proporciones de cada tipo celular irán cambiando de acuerdo a su sensibilidad a las condiciones (Freshney, 2005).

Las células pueden cultivarse en suspensión, o adheridas a un sustrato, como una placa o un frasco. Diferentes tipos celulares requieren diferentes condiciones de cultivo. En los cultivos en placa o similar, las células se van reproduciendo formando una monocapa. Cuando todo el espacio está ocupado, y las células quedan unas al lado de las otras, se dice que la monocapa ha confluido. Cuando se alcanza la confluencia, el cultivo aún conservará algo de diversidad de tipos celulares, y su morfología será lo más parecida posible al tejido originario. El crecimiento cesará para los tipos celulares sensibles al contacto célula-célula, y otros tipos de células que no sean sensibles a esto tenderán a seguir proliferando. Si se desea que las células se sigan multiplicando, deben realizarse subcultivos o pasajes, fragmentando el cultivo primario y pasando células a nuevos medios de cultivos. A medida que se realizan sucesivos pasajes, la morfología celular va cambiando, y se va produciendo una selección a favor de los tipos celulares más adaptados al cultivo, y con mayor capacidad proliferativa. Hacia el tercer pasaje, suele predominar un tipo celular. Es común que en medios de cultivo que contienen suero, este tipo celular sea una célula mesenquimal derivada de los fibroblastos. (Freshney, 2005).

In vivo, las células sólo se dividen un número determinado de veces, y luego mueren, fenómeno llamado senescencia. Lo mismo ocurre *in vitro*, y por tanto, los cultivos celulares no soportarán un número infinito de pasajes. Pero hay células capaces de modificarse genéticamente, y expresar determinados genes que les permitirán dividirse indefinidamente. Este fenómeno se llama transformación *in vitro*, y puede darse naturalmente o ser inducido de manera artificial. Esto permite dar lugar a líneas celulares continuas. Las líneas celulares pueden ser aneuploides, y por lo tanto, diferentes al tipo celular que las originó (Freshney, 2005).

Los cultivos primarios son variables, las proporciones celulares van cambiando, pero son genéticamente similares al tejido que los originó. Es por ello que son útiles para

ciertos estudios, como por ejemplo de citogenética, pero no para otros casos en que se requiere estabilidad. Las líneas celulares, por el contrario, son más homogéneas pero a veces genéticamente diferentes del tejido originario, incluso con alteraciones cromosómicas. Pero crecen de manera más estable y uniforme, son más fáciles de cultivar y mantener, por lo que presentan ventajas para algunas investigaciones que, por ejemplo, requieren resultados repetibles. Hay muchos criterios para elegir la línea celular adecuada para una investigación, pero su descripción escapa los objetivos de esta revisión (Freshney, 2005).

Un aspecto clave en el desarrollo de líneas celulares, es su validación (Hay y col., 2000). Existe la contaminación cruzada entre tipos celulares, y ha habido casos de líneas celulares de una determinada especie animal, que al ser analizadas resultaron ser de otra. Hay también que verificar la ausencia de contaminación microbiana ya sea bacteriana y fúngica, como de virus y micoplasmas. Hay muchos métodos de validación y autenticación de las líneas celulares. Para verificar genéticamente una línea celular se utiliza, por ejemplo, la realización de un cariotipo.

4.4.2 Aplicaciones en conservación de especies en peligro

Los cultivos celulares tienen muchísimas aplicaciones prácticas. En la investigación médica se utilizan ampliamente en el estudio del cáncer, también en inmunología, farmacología y genética (Freshney, 2005).

En el marco de la conservación de las especies en peligro, la conservación de células tiene un gran impacto. Es importante conservar cultivos primarios tanto como desarrollar líneas celulares. Demasiados pasajes y tratamientos con tripsina pueden afectar adversamente las características de las células, por lo que las células utilizadas para la conservación de las especies deberían someterse a un mínimo de pasajes en el laboratorio (Lin-feng Li y col., 2009).

Las aplicaciones de estos cultivos se relacionan con estudios de genética, evolución, ecología, y más recientemente de clonación por transferencia nuclear (Ryder, 2002; Holt y col., 2004; Pickard y Holt, 2004). Muchos factores relacionados con la célula donante de núcleo influyen en el éxito en la clonación (Tian y col., 2003). Es importante contar con fuentes de células para investigar éstos y otros aspectos.

Hay reportes de generación de líneas celulares de varias especies en peligro (Zeng y col., 2009; Guan y col., 2011), incluso de varias especies nativas de Mongolia, como la oveja de Mongolia (Liu y col., 2011) y el caballo mongol, una raza de *Equus caballus* típica de dicho país (Lin-feng Li y col., 2009).

En Virología, son indispensables para el estudio de los virus, muchos de los cuales tienen un comportamiento previsible cuando son multiplicados en los mismos. Tanto los cultivos primarios como las líneas celulares son muy útiles para estudios sobre mecanismos de replicación viral, para el desarrollo de técnicas de diagnóstico, para la producción de inmunógenos y para la evaluación de drogas antivirales. Además, las líneas celulares pueden servir para desarrollar modelos *in vitro* para el estudio de enfermedades virales en especies exóticas.

5 HIPÓTESIS

Es posible obtener muestras de tejidos viables de un ejemplar de caballo de Przewalskii luego de varias horas de muerto, y generar cultivos celulares a partir de ellas.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General:

Conservar material genético del caballo de Przewalski (*Equus ferus przewalskii*) del Zoológico de Villa Dolores a partir de muestras tomadas del ejemplar muerto.

6.2 Objetivos Específicos:

- Desarrollar cultivos celulares primarios, a partir de biopsias de tejidos extraídas del ejemplar muerto.
- Propagar células a partir de los cultivos generados y congelarlas en nitrógeno líquido, y a -80 °C.
- Analizar la viabilidad de los tejidos y células luego de congeladas y transcurrido un año desde el cultivo del mismo.
- Analizar la susceptibilidad de los cultivos de caballo de Przewalski (*Equus ferus przewalskii*) a la infección con agentes virales de interés veterinario que afectan a los miembros de la familia *Equidae Herpesvirus equino* 1 (EHV-1), 2 (EHV-2), 3 (EHV-3) y 4 (EHV-4).
- Recuperar espermatozoides de los epidídimos obtenidos del animal post mortem.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 MUESTRAS DE TEJIDOS

Los tejidos fueron obtenidos del ejemplar macho de caballo de Przewaslki del Zoológico de Villa Dolores (Montevideo - Uruguay), aproximadamente 15 horas después de la muerte del animal. Siguiendo un protocolo del CRES (*Center for Reproduction of Endangered Species*, del Zoológico de San Diego, USA) se colectaron muestras de alrededor de 1 cm³ de piel, músculos esquelético y cardíaco, y cartílago auricular. Luego de obtenidas, las muestras fueron sumergidas en solución salina bufferada (PBS) con antibióticos (100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina), transportadas al laboratorio y mantenidas a 4° C durante 5 horas hasta su procesamiento. El animal presentaba el escroto agrandado, por lo que durante la necropsia se procedió a la exploración del mismo, y se encontró un único testículo de aspecto patológico, que fue extraído junto con el correspondiente epidídimo para estudios anatomopatológicos y reproductivos.

7.2 PROCESAMIENTO

Las muestras se procesaron de dos maneras. Una parte fue procesada y criopreservada directamente como fragmentos de tejido, y otra parte fue procesada para la generación de cultivos celulares. Los tejidos criopreservados directamente constituirían una reserva en caso de que no se lograra generar cultivos celulares a partir de los fragmentos. Por otra parte las muestras de tejido conservan la organización estructural histológica propia de cada tipo tisular.

7.2.1 Criopreservación de tejidos

Para conservación inmediata en nitrógeno líquido y a - 80 °C, algunos fragmentos de tejido fueron seccionados en pequeños trozos de 2-4 mm³. Estos trozos fueron lavados tres veces por inmersión en PBS con antibióticos, y luego conjuntos de 5 a 10 trozos fueron colocados en criotubos (Eurotubo Deltalab[®]) con 1 ml de solución para criopreservación preparada con 70% (v/v) de Medio Mínimo Esencial con sales Eagle (E-MEM, Sigma-Aldrich, USA) 20% (v/v) de suero fetal bovino (SFB, Probiomont[®], Montevideo, Uruguay), y 10% (v/v) de dimetil sulfóxido, (DMSO, Sigma Co., USA). Los tubos fueron almacenados a -80° C por 24 horas, y luego parte de los tubos fueron transferidos a nitrógeno líquido (-196°C) para su preservación a largo plazo.

7.2.2 Desarrollo de cultivos celulares a partir de tejido fresco

La otra parte de las muestras obtenidas de animal también fueron seccionadas en trozos pequeños, y cultivadas directamente como explantos, en placas de 24 pocillos (Nunc[®]) con E-MEM + 20% de SFB, e incubadas bajo atmósfera húmeda, con 5% de CO₂, a 37° C. El medio fue renovado cada semana y se cultivaron durante cuatro

semanas o hasta la aparición de una monocapa de células fibroblásticas alrededor del explanto.

Las células fueron propagadas en botellas de 25 cm² (Grenier, Cellstar®). Una vez evidenciado el crecimiento de una monocapa de células, estas últimas fueron removidas utilizando tripsina (0, 25% w/v) + EDTA (0, 2% w/v) (Sigma-Aldrich, USA), y congeladas a razón de 5 a 10 millones de células por mililitro, en medio E-MEM suplementado con 20% (v/v) de SFB y 10% (v/v) de DMSO. Los viales fueron envueltos en algodón y almacenados a – 80° C por 24 horas, y luego una parte fueron transferidos a nitrógeno líquido (-196°C) para su preservación a largo plazo.

7.3 ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD DEL MATERIAL CONGELADO

7.3.1 Trozos de tejidos

Pasados doce meses de su congelación en nitrógeno y a – 80 °C, muestras de cada tipo de tejido congelado fueron descongeladas rápidamente, en aproximadamente 3 minutos a 37° C a baño María. Luego fueron lavadas dos veces por inmersión en E-MEM, y cultivados directamente como explantos en placas de 24 pocillos (Nunc®), en medio E-MEM + 20% SFB, bajo atmósfera húmeda con 5% de CO₂, a 37° C. Las placas fueron monitorizadas diariamente para verificar el crecimiento de una monocapa de células alrededor del explanto. Fueron mantenidas 4 semanas bajo las mismas condiciones de cultivo, renovando el medio cada semana. Durante las primeras dos semanas se utilizó el medio E-MEM + 20% SFB como medio de crecimiento, y luego se utilizó E-MEM + 5% SFB como medio de mantenimiento. La presencia de contaminación bacteriana o fúngica se evaluó microscópicamente. En adición, cada cuatro días, muestras del sobrenadante de los cultivos fueron sembrados en caldo nutritivo, caldo tioglicolato y medio de Saboureaud para evidenciar la posible presencia de contaminantes.

7.3.2 Cultivos celulares congelados

Doce meses después de su congelación en nitrógeno y a – 80 °C, 1 vial de cada cultivo celular fue descongelado y sembrado en placas descartables. El crecimiento de las células, y la ausencia de contaminación fueron monitorizados cada día de acuerdo al método descrito anteriormente.

7.4 INFECCIÓN VIRAL DE LOS CULTIVOS CELULARES

Se procedió a la infección de las monocapas celulares con *Herpesvirus equino* 1 (EHV-1), 2 (EHV-2), 3 (EHV-3) y 4 (EHV-4). Las cepas virales utilizadas fueron gentilmente cedidas por la Cátedra de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinaria – Universidad Nacional de la Plata (República Argentina).

Se sembraron a razón de 1-2 x 10⁶ células por ml, en placas de 24 pocillos y se incubaron durante 24hs a 37 °C. Una vez comprobada la uniformidad de la monocapa

formada (entre las 24-48 hs de desarrollo), se descartó el medio de cultivo y se infectaron con 100 µl de cada uno de los tipos virales, por duplicado, sin diluir y en dos diluciones (10^{-1} y 10^{-2}). Se colocaron las placas durante 1 hora a 37 °C en atmósfera controlada de CO₂ para favorecer la adsorción viral y pasado este tiempo, se descartó el inóculo, se lavaron las monocapas con E-MEM libre de SFB, se completaron los pocillos con E-MEM con 5% de SFB y se incubó en idénticas condiciones. Se dejaron pocillos en los que se reemplazó el inóculo por E-MEM para ser utilizados como controles negativos de infección. Diariamente se controló la aparición de efecto citopático (ECP) característico de cada uno de los tipos virales. Cuando el ECP fue del 100% los sobrenadantes de los cultivos celulares fueron centrifugados, descartados los paquetes celulares y los diferentes sobrenadantes así clarificados fueron conservados como semilla para proseguir con el estudio.

Se realizaron nuevos cultivos utilizando cubreobjetos en placas de 6 pocillos, de manera que las células crecieran también sobre los mismos. Una vez logrado el desarrollo de la monocapa en el menor tiempo posible se procedió a reinfectar estos cultivos de acuerdo a la metodología descripta. Cuando se visualizaron focos de ECP los cubreobjetos fueron levantados y parte de ellos fueron fijados en Carnoy para su posterior tinción con la clásica técnica de tinción con Hematoxilina-Eosina (HE) y observación del ECP. Otra parte de las láminas fueron lavadas con PBS y fijadas en acetona fría (-20°C) durante 30 minutos para su uso en la técnica de inmunocitoquímica (ICQ).

La técnica de ICQ se realizó siguiendo los protocolos descritos en la literatura (Barbeito y col., 2005) y utilizando sueros de referencia contra cada uno de los virus en estudio. Como segundo anticuerpo se utilizó un suero antiequino conjugado con peroxidasa (Sigma Aldrich) en la dilución indicada por el fabricante y la reacción se reveló con diaminobencidina.

7.5 RECUPERACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE LA COLA DEL EPIDÍDIMO Y ESTUDIO ANATOMOPATOLOGICO DEL TESTÍCULO

Luego de extraído, el testículo fue lavado con suero fisiológico, medido y pesado. Siguiendo el protocolo de Jason E. Bruemmer de la Universidad de Colorado, CO, USA (2006), se intentó la recuperación de espermatozoides de la cola del epidídimo. El epidídimo fue disecado separando la cola y parte del conducto deferente. La recuperación de espermatozoides fue a través de un lavado retrógrado con solución salina fisiológica. El testículo fue enviado al Departamento de Patología de la Facultad de Veterinaria (Universidad de la República), para su análisis anatomopatológico.

8. RESULTADOS

La extracción de muestras de tejidos fue exitosa. El hecho que el animal hubiera estado muerto quince horas al momento de la extracción no impidió que las muestras fueran procesadas favorablemente y que las células proliferaran luego de ser cultivadas *in vitro*.

8.1 TEJIDOS CULTIVADOS DIRECTAMENTE COMO EXPLANTOS

Se desarrollaron cultivos celulares primarios a partir de fragmentos de piel, cartílago auricular y músculo esquelético. Luego de dos semanas de cultivo, se evidenció la formación de una monocapa de células, que fue subsecuentemente propagada (Fig. 4). Todos los tipos celulares, una vez subcultivados, alcanzaron el 100% de confluencia en aproximadamente el mismo tiempo, que fue de alrededor de 5 días a 37 °C (Fig. 5). Luego de cinco pasajes, fue posible congelar células mediante métodos estándar, preservarlas en nitrógeno líquido, descongelarlas y continuar con el desarrollo de los cultivos.

No fue posible obtener cultivos a partir de los fragmentos de músculo cardíaco. Si bien en una primera instancia se evidenció crecimiento celular alrededor del explanto, alrededor del quinto día las células comenzaron a desprenderse deteniéndose su proliferación.

8.2 FRAGMENTOS CONGELADOS

La generación de cultivos celulares a partir de los fragmentos descongelados también fue exitosa, utilizándose metodologías similares a las usadas para otras especies. Luego de ser descongelados y cultivados, los tejidos produjeron cultivos celulares homogéneos. Aproximadamente a las dos semanas de cultivo, se evidenció migración de células alrededor del explanto, confirmando que las piezas de tejido congeladas eran viables y capaces de proliferar luego de descongeladas. No hubo evidencia de contaminación fúngica o bacteriana en cuatro semanas de incubación a 37 °C.

No hubo diferencias aparentes en el crecimiento celular entre los tejidos frescos y descongelados.

8.3 INFECCIÓN DE LOS CULTIVOS CON HERPESVIRUS EQUINOS

Los cuatro tipos virales (EHV-1, 2, 3 y 4) fueron capaces de infectar los cultivos celulares evaluados (Figs. 6 a 9). EHV-1 y 3 produjeron ECP específico (aumento de tamaño y refringencia celular, lisis y desprendimiento) desde las 18 hs posinfección (pi) hasta la lisis total a las 36 hs pi. EHV-2 produjo lisis total a las 72 hs pi y EHV-4 demoró hasta los 5 días pi.

Una vez adaptada las células en el primer pasaje con estos virus, en el segundo pasaje se observaron focos de ECP para todos los tipos virales entre las 24 y 48 hs pi.

La tinción con HE en las células infectadas con EHV-1 reveló la presencia de sincitios y cuerpos de inclusión intranucleares.

La técnica de ICQ realizada demostró la expresión de antígenos virales específicos (Figs. 10,11 y 12).

8.4 RECUPERACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE LA COLA DEL EPIDÍDIMO Y ESTUDIO ANATOMO PATOLÓGICO DEL TESTÍCULO

El testículo extraído tenía consistencia dura y medía 26 cm de largo, 11.5 cm de ancho y 16 cm de altura. Existía una desproporción evidente entre el tamaño aumentado del testículo y el del epidídimo. Su peso fue de 2763 gramos. El análisis histopatológico realizado en la Cátedra de Patología de la Facultad de Veterinaria determinó la presencia de un seminoma típico abarcando la mayoría del parénquima testicular. No se logró recuperar espermatozoides viables de la cola del epidídimo, obteniéndose una baja concentración de espermatozoides con una alta proporción de anomalías morfológicas.

9. DISCUSIÓN

La importancia de almacenar muestras viables de los individuos de las especies amenazadas ha sido enfatizada por varios autores (Wildt et al 1997; Ryder 2002; Holt y col., 2003; Pickard y Holt, 2004; Roldán y col., 2006; Lermen y col., 2009) y ya fue mencionada en este trabajo. La existencia de muestras hace posible que se lleven a cabo trabajos de investigación que enmarcan los planes de conservación que eventualmente salvarán a las especies de la extinción. Hay numerosos trabajos que reportan la creación de líneas celulares y bancos genéticos de especies salvajes y domésticos (Zeng y col., 2011).

El caballo de Przewalski es una especie clave para la biología de la conservación, pues ha sido de las primeras especies rescatadas de situaciones de peligro realmente crítico, y los planes de conservación utilizados han servido de antecedente y modelo para la conservación de otras especies. Las muestras guardadas originalmente en museos y zoológicos, y más recientemente en bancos de recursos genéticos han permitido investigar extensamente sobre esta especie (Goto y col., 2011). En algunos de los bancos de recursos genéticos del mundo se almacenan muestras de caballos de Przewalskii. El *Frozen Zoo* de San Diego cuenta con un gran número de muestras de cientos de individuos, y muchas de las investigaciones genéticas en esta especie han sido realizadas por profesionales vinculados a la Sociedad Zoológica de San Diego, gracias a la existencia de estas muestras.

Estudios han demostrado mediante técnicas genéticas de mapeo de ADN, o mediante identificación de grupos sanguíneos, que los ancestros de los individuos descritos en el Studbook del caballo de Przewalskii no siempre eran los correctos, pues en el momento en que fueron realizados no se contaba con herramientas que certificaran la paternidad de un individuo (Bowling y Ryder, 1988; Goto y col., 2011). Es por eso que es importante contar con muestras del mayor número de individuos posible, a fin de poder garantizar estudios como éstos, u otros cuya importancia aun no podemos evaluar.

Mediante este trabajo, se logró preservar el material genético de un individuo de una especie valiosa que existía en Uruguay. Si bien este individuo en particular años atrás no era de interés en el programa de reproducción de la especie (Comunicación personal, Evzen Kus 2012), no se sabe con certeza si en el futuro podrá tener alguna utilidad. Si no se hubiera guardado material de este individuo, habría desaparecido para siempre para los propósitos de la ciencia.

En Uruguay, no hay antecedentes de intentos de conservación de tejido viables de esta especie. Existen antecedentes de generación de bancos de células de otra especie silvestre, el venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*), en la división citogenética de la Facultad de ciencias (González y Barbanti Duarte, 2003).

En la Facultad de Veterinaria no habían, al momento de realizado este trabajo, antecedentes de intentos de conservar tejidos diploides viables de especies amenazadas. Luego de realizado el presente trabajo y ajustado los protocolos de extracción y conservación de células y tejidos, se han generado y conservado tejidos y células viables de venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*) (Puentes y Ungerfeld,

2010a) y de ganado bovino criollo (*Bos taurus*) (Puentes y col., 2010b); además se han realizado cultivos celulares de especies domésticas como perros y gatos con fines de investigación en Virología. Estos trabajos, por lo tanto, permiten estar debidamente entrenado al momento en que se necesite generar un cultivo a partir de una muestra importante y única, como por ejemplo una muestra colectada de manera oportunista de un animal muerto que sea de interés científico; o por otro lado, de un animal que requiere ser anestesiado para la extracción de muestras.

El principal objetivo de este trabajo fue conservar el material genético de este individuo en particular, lo que no quita que en un futuro se pueda establecer una línea celular inmortal de esta especie, que pueda ser utilizada, por ejemplo, como sustrato para la propagación de virus de interés veterinario. La creación de una línea celular requiere, entre otras cosas, la validación de la misma mediante varias técnicas (Hay y col., 2000; Fresney, 2005), algunas de las cuales no se realizaron en nuestro trabajo. Por ejemplo, se debería realizar en un futuro un cariotipo de las células generadas, para verificar que las mismas derivaron de los fragmentos del caballo de Przewalski. Si se verificó la ausencia de contaminación bacteriana y fúngica.

Los cadáveres son una fuente importante y reconocida de tejidos para cultivar y generar líneas celulares. Han habido reportes de desarrollo de cultivos a partir de animales muertos (Zeng y col., 2009), incluso de clonación a partir de células obtenidas de donantes muertos (Loi y col., 2001), lo que deja de manifiesto la importancia que puede tener este banco de células del caballo de Przewalski en un futuro. En medicina humana, es muy utilizada la toma de muestras de piel post mortem para bancos de tejidos, y se usan para trasplantes e injertos, por ejemplo para personas quemadas. Por tanto, está también estudiado en profundidad el efecto que el tiempo post mortem tiene sobre la viabilidad de las muestras obtenidas. Una de las principales diferencias es que los cadáveres humanos donantes suelen ser refrigerados post mortem. Varios autores recomiendan realizar la recuperación de la piel dentro de las primeras 15 (Kagan y col., 2005) o 18 horas (Vasiliev y col., 2002), pues la viabilidad baja mucho hacia las 18 horas si el cadáver no ha sido refrigerado. Otros recomiendan las primeras 12 horas, y algunos autores 24 (Kagan y col., 2005) y hasta 48 horas si el cadáver fue refrigerado (Vasiliev y col., 2002). Sin embargo, no hay un rango exacto, ya que la viabilidad depende muchos factores, cómo la temperatura ambiente, y diferencias individuales entre los propios cadáveres (Vasiliev y col., 2002).

En la práctica de la medicina veterinaria los desafíos pueden ser otros. Suele ocurrir que los individuos se encuentren muertos, sin conocimiento exacto del momento del deceso. La institución Frozen Ark, en su protocolo de muestreo a partir de cadáveres no da un número máximo de horas post mortem dentro de las cuales convenga sacar las muestras, sino que indica sacarlas “lo antes posible”.

Silvestre y col. (2003), estudiaron la capacidad de generar cultivos fibroblásticos a partir de muestras de conejo y cerdo conservadas a varios intervalos post mortem y a varias temperaturas. Estos autores demostraron que el aumento de la temperatura de almacenamiento afecta negativamente la viabilidad de las muestras, y que la refrigeración conserva las células vivas por más tiempo. A temperaturas ambiente de alrededor de 22 °C, las muestras se mantienen capaces de generar cultivos celulares con una eficiencia de casi el 100% hasta aproximadamente 24 horas post mortem, y mantienen una alta eficiencia por 72 horas. En la práctica el lapso de 72 horas

probablemente no se cumpla, puesto que ese trabajo fue realizado con orejas aisladas del resto del cadáver, y el cadáver completo probablemente experimente una descomposición más rápida. Estos mismos autores concluyen que, dados estos resultados, es conveniente intentar la recuperación de células viables y su cultivo de la mayoría de los especímenes encontrados muertos.

En este trabajo, las muestras se tomaron lo antes que se pudo ante un evento inesperado como fue la necesidad de eutanasiar al animal. El hecho que las muestras fueran tomadas aproximadamente 15 horas luego de la muerte del ejemplar, y el que el cadáver haya permanecido a temperatura ambiente, no afectaron negativamente la viabilidad de las células, obteniéndose cultivos celulares a partir de la mayoría de los fragmentos de tejidos. No se obtuvieron cultivos a partir del músculo cardíaco. Se presume que este tipo celular hubiera requerido un medio de cultivo más rico.

Tovar y col. (2008) encontraron diferencias en la morfología y el tipo celular del cultivo obtenido a partir de biopsias de animales silvestres de acuerdo al método utilizado para despegarlas. El tratamiento con colagenasa generaba células de tipo fibroblástico, mientras que el tratamiento con tripsina daba lugar a células de tipo epitelial. En nuestro trabajo, sin embargo, en que usamos únicamente tratamiento con tripsina, las células son de tipo fibroblástico, a juzgar por su forma y morfología.

No hubo diferencias aparentes en el crecimiento celular entre los tejidos frescos y descongelados. Esto indica que pueden congelarse las muestras de tejido y mantenerse viables y aptas para cultivo hasta que se requiera usarlas (Fowler, 1984; Leek, 2006).

Cuando las células fueron evaluadas como sustrato para la multiplicación viral, se seleccionaron cuatro tipos virales que suelen ser endémicos y repercuten en la producción y en la salud equina. El EHV-1 es el principal causante del aborto equino y del síndrome neonatal que deriva en la muerte del potrillo en las primeras 24 horas de vida. Se encuentra asociado además junto con el EHV-4 a la rinoneumonitis equina que disminuye el rendimiento del caballo deportivo cuando el animal está clínicamente enfermo. El EHV-2, es un gammaherpesvirus y si bien los signos clínicos que produce no son patognomónicos, este virus se encuentra asociado a la infección con *Rhodococcus equi* postulándose que puede ser la causa predisponente para la infección bacteriana. El EHV-3 es el causante del exantema coital equino, una infección altamente transmisible por contacto sexual. Todos estos virus tienen capacidad de afectar a los caballos de Przewalskii (Borchers y col., 1999). Previamente a su reintroducción en la naturaleza, se practica de rutina la vacunación contra Herpes virus 1 y 4 en los animales; y dentro del estudio serológico que se realiza se encuentra el análisis de la exposición a EHV- 1, 4 y 3 (Walzer y col., 2000). Los cuatro virus fueron fácilmente multiplicables en las células desarrolladas indicando claramente que pueden ser utilizadas para el estudio de estos agentes virales.

Dada su condición patológica, el testículo recuperado de este animal era de tamaño superior al descrito para los ejemplares de su especie (Collins y col., 2006). El hecho de no poder recuperar espermatozoides viables de la cola del epidídimo era esperable, debido al seminoma testicular y a los años de inactividad sexual del individuo. El intento de recuperación fue realizado de todas formas con fines prácticos y docentes.

En conclusión se generó un banco de células del caballo de Przewalski que existía en nuestro país, que serán mantenidas en la Facultad de Veterinaria en nitrógeno líquido y podrán ser utilizadas para fines que aporten conocimiento sobre la especie o para fines de investigación en otras áreas. Sería interesante que en un futuro los cultivos generados en este trabajo integraran las bases de datos de instituciones como el Frozen Ark o el Frozen Zoo.

Además se ajustaron los protocolos para el muestreo y procesamiento de tejidos extraídos de animales muertos, lo que podrán ser utilizados y aplicados para otras especies de interés científico en el Uruguay. Por último, cabe destacar que los resultados de este trabajo ya fueron publicados parcialmente en *Bioscience Journal* en el año 2011 (Puentes y col., 2011).

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ackers, J. (2006) Biopreservation of cells and engineered tissues. *Adv Biochem Engin/Biotechnol*; 103:157–187.
2. Ahrens, E.; Stranzinger G. (2005) Comparative chromosomal studies of *E. Caballus* (ECA) and *E. przewalski* (EPR) in a female F1 hybrid. *J Anim Breed Genet* ; 122 (1):97-102.
3. Barbeito, C.G.; Massone, A.R.; Quiroga, M.A. (2005) Introducción a las técnicas de inmunohistoquímica. Aplicaciones en patología veterinaria. Manual del Decimoséptimo Curso Internacional de Posgrado en Técnicas de Inmunohistoquímica, Lectinhistoqiímica y Microscopía Electrónica. Editado por el Instituto de Patología Dr. Bernardo Epstein y el Servicio Central de Microscopía Electrónica Dr. S. I. Itagaki. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata, Argentina. 235 p.
4. Benford, G. (1992) Saving the "library of life". *Proc Nat Acad of Sci (California)* 89:11098-11101.
5. Benirschke, K. (1984) The Frozen Zoo concept. *Zoo Biol*; 3:325-328.
6. Benirschke, K.; Malouf, N.; Low, R. J.; Heck, H. (1965) Chromosome complement: differences between *E. caballus* and *E. przewalskii* Poliakoff. *Science*; 148 (3668):382-383.
7. Borchers, K.; Frölich K.; Ludwig, H. (1999) Detection of equine herpesvirus types 2 and 5 (EHV-2 and EHV-5) in Przewalski's wild horses. *Arch Virol* 144 (4): 771-780.
8. Bouman, Jan (1986) Particulars about the Przewalski horse. Foundation for the Preservation and Protection of the Przewalski horse. Disponible en: <http://www.treemail.nl/takh/>. Fecha de consulta 15/11/2010.
9. Bowling, A.; Ryder, O. (1987) Genetic studies of blood markers in Przewalski's horses. *J Hered*; 78(2):75-80.
10. Bowling, A; Zimmermann, W.; Ryder, O.; Penado, C.; Pet,o S.; Chemnick, L.; Yasinetskaya, N.; Zharkikh, T.; (2003) Genetic variation in Przewalskii's horses, with special focus on the last wild caught mare, 231 Orlitza III. *Cytogenet. Genome Res*; 101:226-234.

11. Boyd, L.; Houpt, K.A. (1994) Przewalski's Horse: The history and biology of an endangered species. Disponible en: http://library.sandiegozoo.org/factsheets/przewalski_horse/equus.htm
Fecha de consulta: 25 /1/2012.
12. Boyd, L.; King, S. (2011). *Equus ferus ssp. przewalskii*. En: IUCN Red List of Threatened Species. Disponible en: <http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/41763/0>
Fecha de consulta: 10 /1/ 2012.
13. Bruemmer, J. (2006) Collection and freezing of epididymal stallion sperm. Vet Clin North Amer –Equine Practice; 22 (3): 677-682.
14. Fowler, K. (1984) Storage of skin biopsies at -70°C for future fibroblast culture. J Clin Pathol; 37 (10): 1191-1193.
15. Frankel, O.H.; Soulé, M.E. (1992) Conservation and evolution. Cambridge, Cambridge University Press, 327 p.
16. Freshney, R. I. (2005) Culture of animal cells: a manual of basic technique. 5ª. ed. New York, Wiley-Liss. 642 p.
17. Gill, V. 2011. Chernobyl's Przewalski's horses are poached for meat .BBC Nature online. Disponible en: <http://www.bbc.co.uk/nature/14277058>. Fecha de consulta 12/1/ 2012.
18. Glenister, P. H.; Whittingham, D. G.; Wood, M. J. (1990) Genome cryopreservation: a valuable contribution to mammalian genetic research. Genet Res Cambridge; 56: 253-258.
19. González, S.; Duarte, J.M.B. (2003) Emergency Pampas deer capture in Uruguay. IUCN Deer Specialist Group Newsletter ; 18: 16-17.
20. Goto, H.; Ryder, O.A.; Fisher, A.R.; Schultz, B.; Pond, S.K.; Nekrutenko, A.; Makova, K.D. (2011) A massively parallel sequencing approach uncovers ancient origins and high genetic variability of endangered Przewalski's horses. Genome Biol. Evol. 3:1096–1106.
21. Guan, W.J.; Liu, C.Q.; Li, C.Y.; Liu, D.; Zhang, W.X.; Ma, Y.H. (2010) Establishment and cryopreservation of a fibroblast cell line derived from Bengal tiger (*Panthera tigris tigris*). Cryo Lett; 31(2):130-8.
22. Hleap, J.S.; Cárdenas, H.; García-Vallejo, F. (2009) Preservación no criogénica de tejido y extracción de ADN: una aplicación para peces cartilaginosos . Pan-Amer J Aquat Sci; 4(4): 545-555.

23. Hay, R.J.; Cleland, M.M.; Durkin, S., Reid, Y.A. (2000). Cell line preservation and authentication. En: Masters, J. R. W. *Animal Cell Culture. A Practical Approach* 3^a ed. Oxford. Oxford University Press. p 69-105.
24. Hoesli, T.; Nikowitz, T.; Walzer, C.; Kaczensky, P. (2009) Monitoring of agonistic behaviour and foal mortality in free-ranging Przewalski's horse harems in the Mongolian Gobi. *Equus Praha* 2009, pp 113-138. Disponible en http://www.savethewildhorse.org/files/Downloads/PDF/Medien/Hoesli%20et%20a%20l.Equus_113-138.pdf. Fecha de consulta: 17/12/2011.
25. Holt, W. V.; Abaigar, T.; Watson, P. F.; Wildt, D. E. (2003) Genetic resource banks for species conservation. En: W. V.; Abaigar, T.; Watson, P. F.; Wildt, D. E. *Reproductive Science and Integrated Conservation*. Oxford. Cambridge University Press. p 267 -281.
26. IUCN: International Union for the Conservation of Nature (2012) Biodiversity. Disponible en: <http://www.iucn.org/what/tpas/biodiversity/about/>. Fecha de consulta: 10/1/ 2012
27. Kagan, R. J.; Robb E. C.; Plessinger, R.T. (2005) Human Skin Banking. *Clin Lab Med*; 25:587–605.
28. Kus, E. (2009) Introduction. *Equus Praha* 2009; pp11-13. Disponible en: http://www.savethewildhorse.org/files/Downloads/PDF/Medien/Hoesli%20et%20a%20l.Equus_113-138.pdf. Fecha de consulta: 17/12/2011.
29. Lau, A.N.; Peng, L.; Goto, H.; Chemnick, L.; Ryder, O.A.; D. Makova, K.D. (2009). Horse domestication and conservation genetics of Przewalski's horse inferred from sex chromosomal and autosomal sequences. *Mol Biol Evol*; 26:199–208.
30. Leek, R. (2006) Frozen biopsy collection and storage: frozen biopsy samples. *Meth Mol Med*; 120:25-8.
31. Lermen, D.; Blömeke, B.; Browne, R.; Clarke, A.; Dyce, P.W.; Ixemer, T.F.; Fuhr, G.R.; Holt, V.W.; Ewgenow, K.J.; Lloyd, R.; Lötters, S.; Paulus, M.; McGregor Reid, G.; Rapoport, D.; Rawson, D.; Ringleb, J., Ryder, O.A.; Spörl, G.; Schmitt, T.; Veith, M.; Müller, P. Cryobanking of viable biomaterials: implementation of new strategies for conservation purposes. *Mol Ecol*; 18:1030–1033.
32. Lincoln, C.; Gabridge, M. (1998) Cell culture contamination: sources, consequences, prevention, and elimination. *Meth Cell Biol*; 57: 49–65.
33. Lin-feng Li ; Wei-jun Guan ; Yue Hua ; Xiu-juan Bai ; Yue-hui Ma (2009) Establishment and characterization of a fibroblast cell line from the Mongolian horse. *In Vitro Cell Dev Biol –Animal*; 45:311–316.

34. Liu, C.Q.; Guo, Y.; Guan, W.J.; Ma, Y.H.(2011) Establishment and characterization of a fibroblast cell line derived from Mongolian sheep. *Anim Sci J.*; 82(2):215-22.
35. Medina-Robles, V. ;Velasco-Santamaría, Y.M.; Cruz-Casallas, P. E. (2006). Los bancos de recursos genéticos y su papel en la conservación de la biodiversidad. *Orinoquia*; 10:71-77.
36. Min Kyu Kim; Goo Jang, Hyun Ju Oh, Fibrianto Yuda, Hye Jin Kim, Woo Suk Hwang, Mohammad Shamim Hossein, Joung Joo Kim, Nam Shik Shin, Sung Keun Kang, Byeong Chun Lee. (2007) Endangered Wolves Cloned from Adult Somatic Cells. *Clon Stem Cell*; 9 (1): 130-137.
37. Monfort, S.L., Arthur, N.P. and Wildt, D.E. (1991) Monitoring ovarian function and pregnancy by evaluating excretion of urinary oestrogen conjugates in semi-free-ranging Przewalski's horses (*Equus przewalskii*). *J Reprod. Fert*; 91:155-164.
38. Myka, J.L.; Lear, T.L.; Houck, M.L.; Ryder, O.A.; Bailey, E. (2003). FISH analysis comparing genome organization in the domestic horse (*Equus caballus*) to that of the Mongolian wild horse (*E. przewalskii*). *Cytog Gen Res*; 102: 222 225.
39. Oakenfull, E.A.; Ryder, O.A. (1998). Mitochondrial control region and 12S rRNA variation in Przewalski's horse (*Equus przewalskii*). *Anim Genet.* 29:456–459.
40. Pickard, A.R.; Holt, W.V. (2004). Cryopreservation as a Supporting Measure in Species Conservation; "Not the Frozen Zoo!" En: Fuller, B.J.; Lane, N.; Benson, E.E. *Life in the Frozen State*. New York. CRC Press. p.393-414.
41. Puentes, R; Ungerfeld, R. (2010) Conservación de células de Venado de Campo (*Ozotoceros bezoarticus*) en distintas condiciones a partir de biopsias de piel. IV Latin American Seminar on Cell Culture Technology (IV SLATCC). Montevideo – Uruguay. (Poster).
42. Puentes, R; Fila, D; Roses, G; Aragunde, R; Hernandez, A; Cazales, N; Macedo, F; Mernies, B; Postiglioni, A. (2010). Desarrollo de cultivos de fibroblasto en el Bovino Criollo en Uruguay. III Congreso Uruguayo de Producción Animal. Montevideo – Uruguay. (Poster).
43. Puentes, R.; Furtado, A.; Estradé, M.; Aragunde, R.; Cazales, N.; Estevez, J.; Costa, G.; Cirilo, F.; Galosi, C. (2011) Tissue preservation and cell culture of Przewalskii's Horse (*Equus ferus przewalskii*): an endangered species. *Biosci J* ; 27 (5):826-829.

44. Roldan, E.R.S.; Gomendio, M.; Garde, J.J.; Espeso, G.; Ledda, S.; Berlinguer, F.; del Olmo, A.; Soler, A.J.; Arregui, L.; Crespo, C.; González, R. (2006) Inbreeding and Reproduction in Endangered Ungulates: Preservation of Genetic Variation through the Organization of Genetic Resource Banks. *Reprod Dom Anim*; 41(2):82–92 .
45. Ryder, O.A. (2002). Cloning advances and challenges for conservation. *Trends Biotechnol*; 20 (6):231-232.
46. Silvestre, M.A.; Saeed, A.M.; Cervera R.P.; Escribá, M.J.; García-Ximénez, F. (2003) Rabbit and pig ear skin sample cryobanking: effects of storage time and temperature of the whole ear extirpated immediately after death. *Theriogenology* 59 (5–6):1469–1477.
47. Simione Jr., F. P. (1992) Key issues relating to the genetic stability and preservation of cells and cell banks. *J Parent Sci Tech*; 46 (6)226–232.
48. Soulé, M. (1991) Conservation: tactics for a constant crisis. *Science*; 253(5021):744-750.
49. X Cindy Tian, Chikara Kubota, Enright, B.; Xiangzhong Yang. (2003) Cloning animals by somatic cell nuclear transfer – biological factors .*Reprod Biol Endocrinol*; 1:98 Disponible en: <http://www.rbej.com/content/1/1/98> . Fecha de consulta 6/2/ 2012.
50. Tovar, H.; Navarrete, F.; Rodríguez, L.; Skewes, O.; Castro, F. (2008) Cold storage of biopsies from wild endangered native Chilean species in field conditions and subsequent isolation of primary culture cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol*; 44(8-9):309–320.
51. Van Dierendonck, M.; Wallies De Vries, M. (1996) Ungulate reintroductions: Experiences with the Takhi or Przewalski horse (*Equus ferus przewalskii*) in Mongolia. *Conserv Biol*; 10: 728–740.
52. Vasiliev, A.V.; Kiseliov, I.V.; Ivanov, A.A.; Fedorov, D.N.; Smirnov, S.V.; Terskikh, V.V. (2002) preservation of human skin: viability criteria . *Ann Burns Fire Disas*; 15 (3): 145-150.
53. Walzer, C; Baumgartner, R; Robert, N.; Suchebaatar, Z.; Bajalagmaa, N. (2000) Medical considerations in the reintroduction of the Przewalski horse (*Equus przewalskii*) to the Dzungarian Gobi, Mongolia. European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians (EAZWV) Third scientific meeting. Paris. Disponible en: <http://www.jwildlifedis.org/content/42/3/518.full.pdf>. Fecha de consulta: 16/11/2011

En el ejemplar entregado en Biblioteca falta la p. 45.

FIGURAS



Figura 1: *Equus ferus przewalskii*, macho adulto. Nótese la ausencia de cerquillo, las crines erguidas y el cuello ancho.



Figura 2: *Equus ferus przewalskii*, macho adulto. Nótese el color tostado, las crines y miembros más oscuros, y el hocico claro.



Figura 3: Warszawa 18, o "Tabún" en el Zoo de Villa Dolores en 2003. Fotografías 1, 2 y 3 cedidas gentilmente por el Dr. Javier Mirazo.



Figura 4: Explanto de piel, al día 12 de cultivo; con evidencia de crecimiento celular a su alrededor (Aumento 100X).

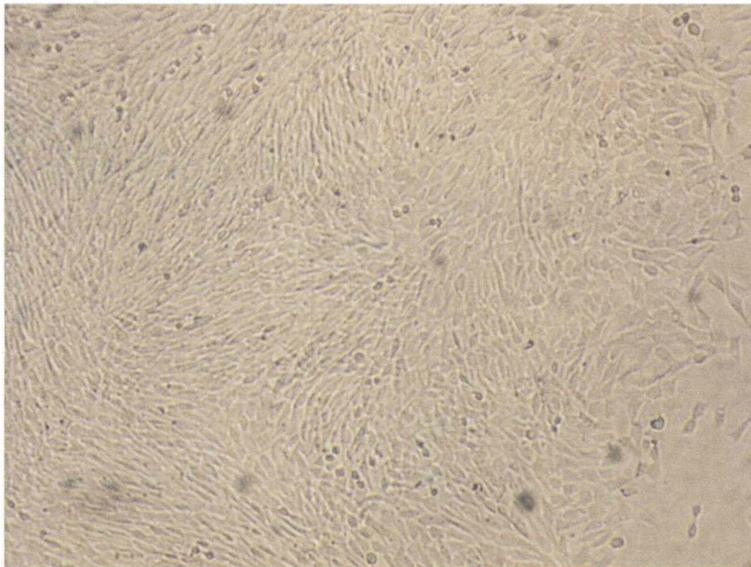


Figura 5: Monocapa de células fibroblásticas obtenida a partir de explanto de cartilago auricular, al quinto día de cultivo del primer pasaje. (Aumento 100X).

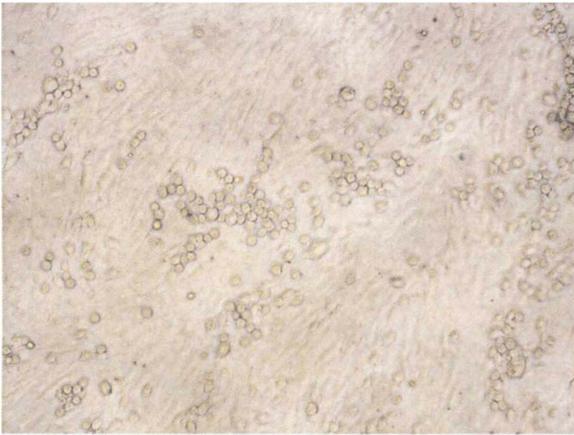


Fig.6

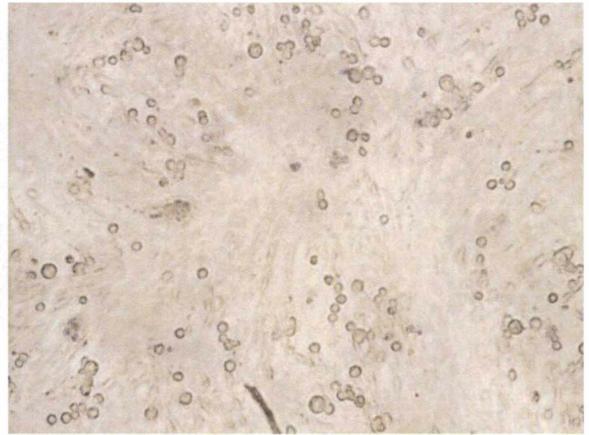


Fig.7

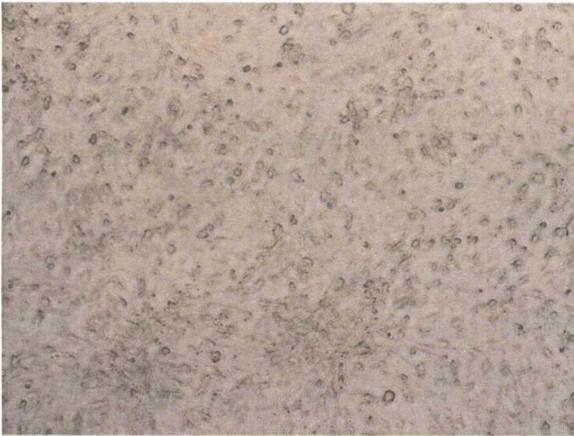


Fig.8

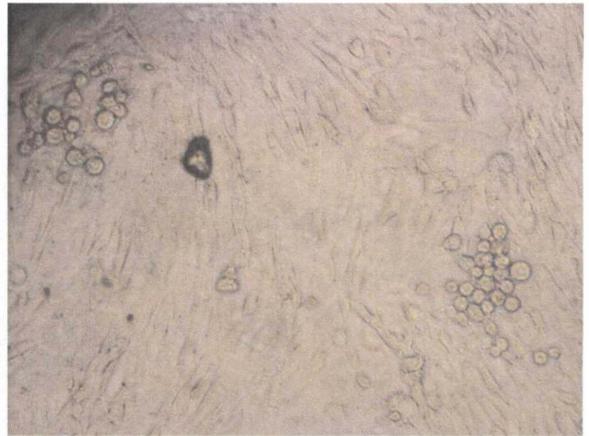


Fig.9

Figuras 6 a 9: Monocapas de células fibroblásticas de Caballo de Przewaskii infectadas con EHV1 (Fig.6), EHV2 (Fig 7.), EHV3 (Fig.8) y EHV4 96 horas post infección (Fig.9). Obsérvese el efecto citopático característico (aumento de refringencia y tamaño de la célula infectada, lisis y desprendimiento). (Figuras 6 a 8: aumento 100X. Figura 9: aumento 400X).

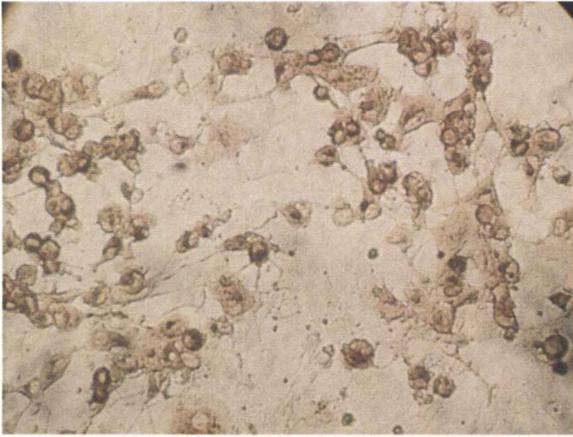


Fig.10



Fig.11

Figuras 10 y 11: Inmunocitoquímica: Células de Caballo de Przewalskii infectadas con EHV-1. Fig.10: aumento 100X. Figura 11: Obsérvese el sincitio celular a la izquierda de la fotografía, Aumento 400X.



Figura 12: Inmunocitoquímica. Monocapa de células de caballo de Przewalskii sin infectar (Control negativo de infección) (MO 100x).

Las fotografías 7 a 12 fueron gentilmente cedidas por la Dra. Cecilia Galossi.