

ARTICULOS ORIGINALES

## ESTUDIO CITOGENETICO DE 288 *AOTUS* COLOMBIANOS(1)

ALEJANDRO GIRALDO\*, MARTA LUCIA BUENO\*§, ELIZABETH SILVA\*‡, JAIRO RAMIREZ\*\*,  
JAIME UMAÑA\*\*, CARLOS ESPINAL\*\*

Presentamos los datos citogenéticos de 288 *Aotus* colombianos, de origen geográfico conocido, que han servido de pie de cría para el establecimiento de una colonia de experimentación en Malaria en el Instituto Nacional de Salud de Bogotá, Colombia.

Se incluyen en el trabajo 254 adultos procedentes de San Marcos, Sucre (bajo San Jorge, 7° 30' LN; 74° 06' LW) y las primeras 21 crías nacidas en cautiverio; 9 ejemplares de Río Negro, Antioquia (Magdalena Medio, 6° 09' LN; 75° 23' LW) y 4 ejemplares capturados en las estribaciones orientales de la Cordillera Oriental, alto del Río Cusiana, 5° 25' LN; 72° 43' LW).

El fenotipo de estos ejemplares corresponde al denominado "B" o "cuello gris". Los estudios citogenéticos mostraron la presencia de animales  $2n=54$ ,  $2n=53$  y  $2n=52$  que corresponden respectivamente a los cariotipos KII, KIII y KIV, o al denominado cariomorfo 2. Se encontró que la población del bajo San Jorge estaba en equilibrio para las frecuencias de los tres cariotipos de esta zona. No se encontraron diferencias citogenéticas en las poblaciones del bajo San Jorge y del Magdalena Medio.

Los cuatro ejemplares de las estribaciones orientales de la Cordillera Oriental mostraron un nuevo cariotipo para el género *Aotus*,  $2n=58$ , propuesto como cariotipo KX.

### INTRODUCCION

El grupo de los primates ha sido ampliamente utilizado en investigaciones Biomédicas. Inicialmente se emplearon los primates humanoides (Chimpancé, Gorila, Macacca) por su proximidad con la especie humana. Aunque más alejados evolutivamente, fue muy importante encontrar que los pequeños primates del

nuevo mundo (Plathyrrhini) poseían mayores ventajas en condiciones experimentales sobre los grandes simios, por su fácil manejo, la alta densidad de las poblaciones naturales y la consiguiente reducción de costos.

Estas ventajas originaron un aumento desmedido en las capturas y en la explotación comercial lo que

(1) Este trabajo está dedicado a la memoria de nuestro compañero y amigo, el Biólogo Jairo Ramírez Cerquera, quien pereció en la tragedia de Armero donde dirigía la Colonia de *Aotus* de nuestro Instituto.

\* Grupo de Genética - Instituto Nacional de Salud.

§ Departamento de Biología, Universidad Nacional.

‡ Colegio Mayor de Cundinamarca.

\*\*Unidad de Malaria - Instituto Nacional de Salud.

llevó a una franca disminución de las reservas naturales. Esta situación hizo que la OPS convocara en 1977 la "Primera Conferencia Interamericana sobre la Conservación y Utilización de Primates Americanos no Humanos en las Investigaciones Biomédicas" (1). En esta participaron eminentes científicos para discutir políticas sobre manejo y conservación de este importante grupo, así como problemas de taxonomía, ecología y distribución.

Para la investigación en malaria, una de las enfermedades más importantes de las regiones tropicales, el género *Aotus* ha sido propuesto como modelo experimental ideal (2-3), por las siguientes características:

- a) No son susceptibles naturalmente a la infección malárica.
- b) Presentan una buena respuesta a la infección en condiciones experimentales.
- c) Diferente susceptibilidad a la infección con varias cepas de *Plasmodium*, de acuerdo al origen y cariotipo (4-5).
- d) Fácil manejo y adaptación a condiciones de laboratorio, lo que ha permitido el establecimiento de colonias (6-7).
- e) Amplia distribución en Centro y Sur América.

En la medida que los estudios parasitológicos e inmunológicos se hicieron más complejos, se vió la imperiosa necesidad de que los primates poseyeran historias clínico-inmunológicas conocidas y estuvieran en óptimas condiciones sanitarias para la realización de los experimentos. Hasta hace poco, la mayoría de los ejemplares utilizados en las investigaciones realizadas en Norteamérica y Europa fueron conseguidos mediante la compra indiscriminada a traficantes, por lo que además de las malas condiciones de salud, era incierto su origen geográfico.

Por estas razones el Instituto Nacional de Salud mediante un acuerdo con el INDERENA, estableció una colonia experimental de *Aotus* con el fin de desarrollar programas de reproducción, fisiología, inmunología, parasitología y citogenética, entre otras, para poder en un futuro tener una producción suficiente de crías, que permitan el suministro de ejemplares en

óptimas condiciones a los laboratorios que soliciten el servicio e impedir la depredación de las poblaciones naturales.

En el género *Aotus* se han descrito 4 fenotipos y una variada cariología. Se han informado para el grupo 10 cariotipos diferentes designados por números romanos (8), cinco de ellos son variantes polimórficas por una fusión robertsoniana simple, estos son el KII, KIII, KIV y el KVIII, KIX, (8-9). Los cinco restantes muestran grandes diferencias numéricas y estructurales (8-10-11).

Desde el punto de vista taxonómico este había sido tradicionalmente considerado como un género monoespecífico (12-13). Sin embargo el aumento de información sobre el grupo ha controvertido esta opinión y Hershkovitz (10) considera que existen al menos 9 especies alopátricas, con un rango de distribución definido y caracterizados por su fenotipo (A,B,C y D) (8); su cariotipo (KI, 2n=54; KII, 2n=54; KIII, 2n=53; KIV, 2n=52; KV, 2n=46; KVI, 2n=50/49; KVII, 2n=52/51; KVIII, 2n=55; KIX, 2n=56) (8-9); variación en las proteínas séricas y susceptibilidad a la malaria.

Dadas las características cariológicas del grupo se consideró indispensable realizar el cariotipo a todos los ejemplares para efectuar los diferentes apareamientos, análisis de fertilidad, segregación de la translocación en la descendencia, correlación del cariotipo con la susceptibilidad a la malaria y otros parámetros biológicos.

Es importante resaltar que las observaciones del presente trabajo, tienen la particularidad de representar una muestra poblacional de localidades geográficas exactas lo que contribuye decididamente al mejor conocimiento de la distribución cariológica del género *Aotus* en estas regiones de Colombia.

## MATERIALES Y METODOS

Se estudiaron 288 ejemplares, 254 de San Marcos, Sucre (bajo San Jorge, 7° 30' LN; 74° 06' LW) y 21 crías; nueve ejemplares, provenientes de Río Negro, Antioquia, (Magdalena Medio, 6° 09' LN; 75° 23' LW) y un grupo familiar de 4 especímenes, una pareja y sus crías, oriundos de la parte alta del Río Cusiana,

TABLA Nº 1

TOTAL DE EJEMPLARES ESTUDIADOS  
SEGUN ORIGEN GEOGRAFICO

REGION	TOTAL
San Marcos, Sucre (Bajo San Jorge)	254
F1 San Marcos, Sucre	21
Alto del Río Cusiana, Boyacá	4
Río Negro, Antioquia (Magdalena Medio)	9
TOTAL ESTUDIADOS	288

TABLA Nº 2

DISTRIBUCION DE CARIOTIPOS POR LOCALIDAD Y SEXO  
EN 267 ADULTOS ESTUDIADOS

CARIOTIPO	2n	San Marcos bajo San Jorge	Río Negro Magdalena Med	Alto Cusiana Boyacá	TOTAL
K II	54, XX 54, XY	39 60	3 2		104
K III	53, XX 53, XY	64 57	1 3		125
K IV	52, XX 52, XY	18 16			34
K X	58, XX 58, XY			2 2	4
TOTAL		254	9	4	267

Boyacá (5° 25' LN; 72° 43' LW) y a 1.750 mts. s.n.m. (Tabla 1). Todos los ejemplares antes de ser introducidos en la colonia fueron sometidos a cuarentena, tatuados y estudiados citogenéticamente.

Los cariotipos se obtuvieron por medio de las técnicas tradicionales de cultivo de linfocitos a partir de sangre periférica heparinizada (14). Se emplearon para cada cultivo 4 ml de Medio Esencial Mínimo, con antibióticos al 2% de una solución de Penicilina + Estreptomina y Suero Fetal Bovino al 20%. En los primeros cultivos se emplearon 0.35 ml de Fitoheماغlutinina. Posteriormente se hicieron ensayos con un extracto crudo de lectina obtenida de *Vicia fava* (15). Este procedimiento dió mejores resultados por lo que se utilizó en la mayoría de los cultivos. Las preparaciones fueron procesadas mediante las técnicas de bandas G (16) y bandas R con pulso terminal de BrdU (17).

Se aplicó la prueba del chi-cuadrado según la metodología convencional. Asimismo, se desarrolló el teorema de Hardy-Weimberg utilizando el cariotipo KII como homocigoto dominante (p), el KIII como heterocigoto (pq) y el KIV como homocigoto recesivo (q).

## RESULTADOS

Todos los ejemplares del bajo San Jorge y del Magdalena Medio correspondieron al fenotipo B (8) o "cuello gris" (10) y a los cariotipos KII, KIII, KIV (8) o cariomorfo 2 (18). La distribución de los cariotipos por localidad y sexo en los adultos se presenta en la tabla 2 y la de las crías en la tabla 3.

El cariotipo KII se caracteriza por tener un número diploide  $2n=54$ . El KIII,  $2n=53$  posee 3 elementos

TABLA Nº 3

CARIOTIPOS DE F1 SAN MARCOS

CARIOTIPO	MACHOS	HEMBRAS	TOTAL
K II $2n = 54$	3	4	7
K III $2n = 53$	5	6	11
K IV $2n = 52$	2	1	3
TOTAL	10	11	21

impares, un cromosoma 1 formado por una fusión robertsoniana simple de los cromosomas 13 y 14 y dos elementos sin homólogos, un cromosoma 13 y uno 14. El cariotipo KIV,  $2n=52$  posee la doble fusión robertsoniana, es decir, el par 1. No existen por lo tanto cromosomas impares en este complemento, ni los pares 13 y 14 libres. El resto del complemento, es idéntico en tres cariotipos.

En la Fig. 1 se muestra el cariotipo KII,  $2n=54$  con bandas G, en la Fig. 2 y 3, el KIII,  $2n=53$  con bandas G y R respectivamente y en la Fig. 4 el KIV,  $2n=52$  con bandas G. La Fig. 5 muestra la fusión robertsoniana que caracteriza a estos cariotipos.

En los ejemplares provenientes del bajo San Jorge, por su número suficiente, se analizaron las proporciones de los diferentes cariotipos discriminados entre machos y hembras (Tabla 4). No se observaron diferencias por las capturas entre machos y hembras, con respecto a la distribución de los cariotipos según la prueba del chi-cuadrado, ( $p<0.05$ ). Se observó una mayor proporción del KIII, la menor presentó el KIV.

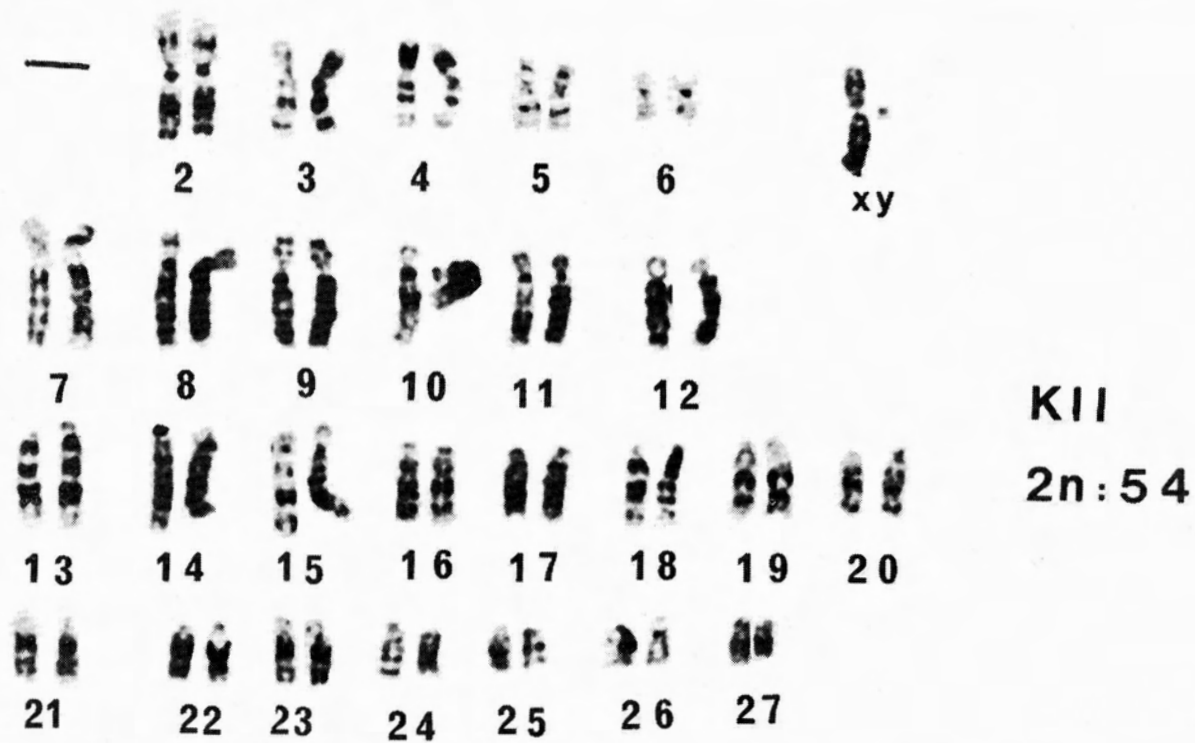


Fig. 1. Cariotipo KII en Bandas G; 2n=54 de *Aotus Lemurinus griseimembra*. Note la ausencia del cromosoma A1 y la presencia de los pares B13, B14.



Fig. 2. Cariotipo KIII en Bandas G, 2=53 *A. l. griseimembra*. Note la presencia de tres cromosomas no apareadas A1, B13, B14.

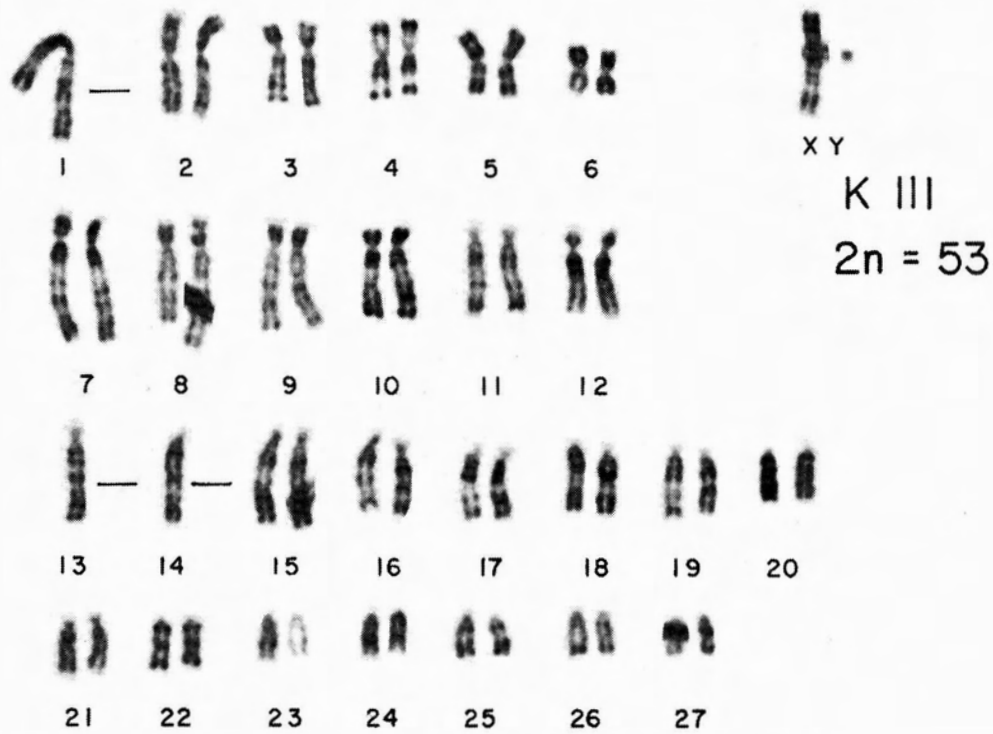


Fig. 3. Cariotipo en Bandas R KIII;  $2n=53$  *Aotus lemurinus griseimembra*.



Fig. 4. Cariotipo KIV de *A. I. griseimembra* en Bandas G  $2n=52$ . Note la presencia de un par de homólogos A1.

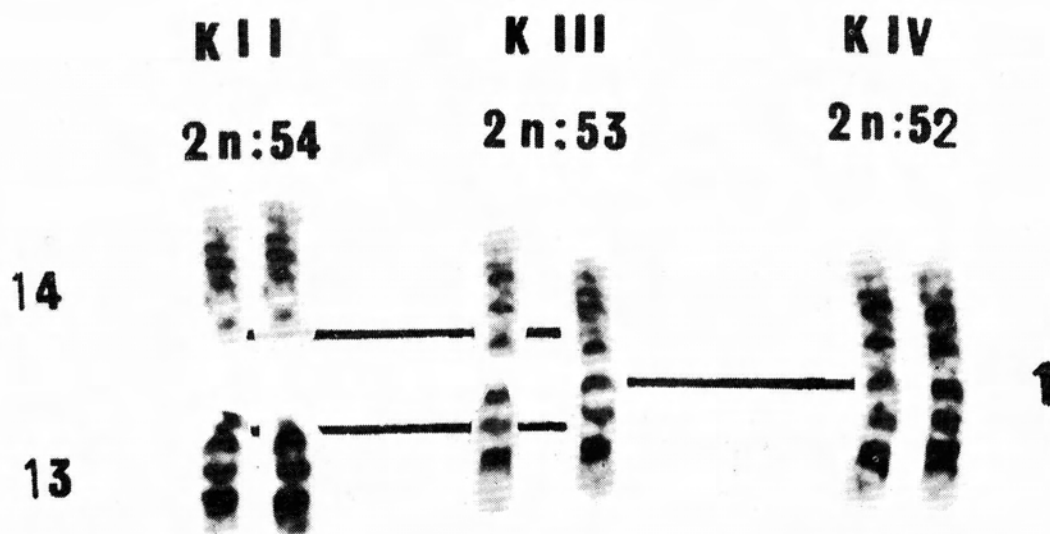


Fig. 5. Se muestra la fusión de los cromosomas B13, B14 en *A. l. griseimembra* para conformar el A1. El B13 es homólogo al Alq y el B14 al Alp.

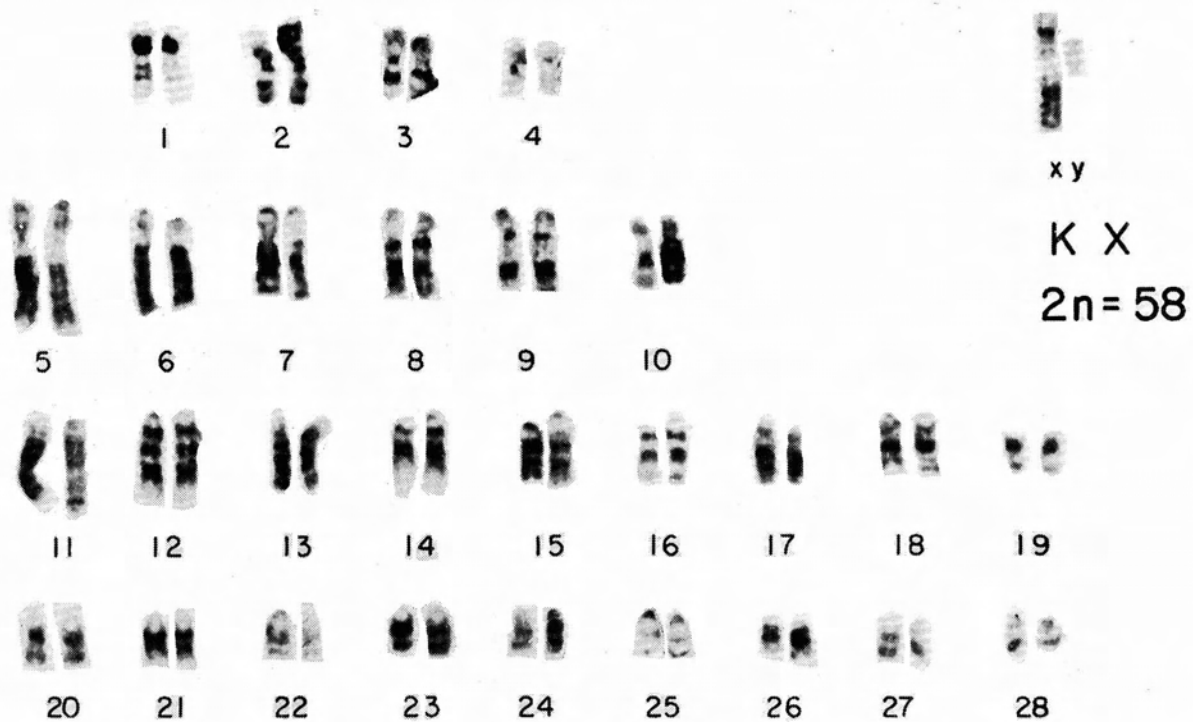


Fig. 6. Cariotipo KX 2n= en Bandas G. *Aotus sp.*

TABLA Nº 4  
DISTRIBUCION PORCENTUAL POR CARIOTIPOS Y SEXO  
DE LA POBLACION DEL BAJO SAN JORGE

CARIOTIPO SEXO	K II 2n = 54		K III 2n = 53		K IV 2n = 52		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
MACHOS	60	23.6	64	25.2	18	7.1	142	55.9
HEMBRAS	39	15.4	57	22.4	16	6.3	112	44.1
TOTAL	99	39.0	121	47.6	34	13.4	254	100.0

TABLA Nº 5  
EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG  
SAN MARCOS, SUCRE

	ESPERADO	OBSERVADO
K II Homocigoto (D)	99	97.63
K III Heterocigoto	121	119.68
K IV Homocigoto (R)	34	36.57

$$\chi^2_c = 0.215$$

$$\chi^2_f = 3.84$$

Sin embargo, las proporciones no se desvían de las esperadas para una población en equilibrio según el teorema de Hardy-Weimberg (Tabla 5).

Los especímenes del Río Cusiana presentaron evidentes diferencias en fenotipo y cariotipo con los ejemplares de las otras dos localidades, aunque en general corresponden al fenotipo "cuello gris" (10). El cariotipo de estos cuatro ejemplares fue de  $2n=58$ , el cual es hasta el momento el número diploide más alto reportado para el grupo (Fig. 6), para el que proponemos la denominación de cariotipo X (KX) (11), siguiendo la secuencia iniciada por Ma (8-9).

## DISCUSION

Las poblaciones de *Aotus* del Norte de Colombia, bajo San Jorge y Magdalena Medio, muestran el polimorfismo cromosómico constituido por la translocación robertsoniana simple de los cromosomas 13 y 14, la cual no se observa en el KII, es heterocigota en el KIII y homocigota en el KIV. El análisis detallado

de la translocación por la resolución de bandas obtenidas nos permite plantear la hipótesis de una fusión, telómero-telómero en este rearmado y rechazar la propuesta por Ma (8), que involucra una inversión-delección adicional. No existe ninguna diferencia entre estos cariotipos y los reportados anteriormente para esta población ni entre el patrón de bandas de los ejemplares del Magdalena Medio y los del bajo San Jorge (8-9-19).

El análisis estadístico de los cariotipos, discriminando machos y hembras, nos indica que los métodos de captura no influyeron en la apropiación de los sexos. Se analizó también el equilibrio de la población para demostrar si existía una presión selectiva que favoreciera un determinado cariotipo en uno de los sexos. No se encontró correlación positiva entre el sexo y un determinado cariotipo, por lo cual asumimos que el polimorfismo se encuentra representado indiscriminadamente tanto en machos como en hembras.

No se observaron barreras reproductivas evidentes en los primeros cruces efectuados puesto que se obtuvieron crías en seis tipos de apareamiento diferente: dos homólogos (KII x KII) (KIII x KIII) y cuatro heterólogos (KII x KIII) (KII x KIV) (KIII x KIV) (KIV x KIII) (macho x hembra). Un análisis de la segregación de la translocación y fertilidad en parejas homólogas y heterólogas se describirá ampliamente en otro trabajo, cuyos datos preliminares ya han sido divulgados (20).

Estos resultados sostienen el hecho de que las diferencias cariotípicas son un simple polimorfismo que no influye en la reproducción y no parece existir en la población una presión selectiva eficaz contra alguno de los cariotipos, ni fertilidad reducida en los cruces heterólogos. Todos los aspectos señalados permiten considerar a este grupo de *Aotus* (KII, KIII y KIV) como una especie, *Aotus lemurinus griseimembra*, según la clasificación propuesta por Hershkovitz (10).

Los cuatro ejemplares de la parte alta del Río Cusiana, estribaciones orientales de la Cordillera Oriental, constituían una familia (macho, hembra, un adolescente hembra y una cría macho), todos con un nuevo cariotipo para el género,  $2n=58$ , presentado y discutido en otra publicación (11). La comparación de estos cariotipos con los del norte de Colombia (KII, KIII, KIV), a pesar de la diferencia numérica, mues-

tran una correspondencia (u homología) exacta con cromosomas completos o brazos, quedando 4 pares de cromosomas sin correspondencia aparente (11). Esto sugiere además que esta población estaría aislada reproductivamente de las poblaciones del Norte de Colombia. Al considerar el fenotipo de estos especímenes, la baja susceptibilidad a la Malaria (5) y en particular las diferencias numéricas y morfológicas de los cromosomas (11) se deben clasificar estos ejemplares en una categoría sistemática diferente a *A. l. griseimembra*. Aún no está claro si su fenotipo ha sido descrito previamente, en cuyo caso el nombre de la especie sería el correspondiente al del holotipo (11-13).

Este género, que está sufriendo un proceso de diversificación cariológica muy activa, no presenta cambios morfológicos suficientes para la diferenciación específica por características externas, por lo que el cariotipo se ha convertido en una herramienta indispensable para caracterizar los grupos y proporciona valiosa información sobre su filogenia (21-22).

De acuerdo con las últimas tendencias sistemáticas propuestas para el género *Aotus* (10) se encuentran representadas en nuestra fauna al menos cuatro especies, una con dos subespecies:

<i>Aotus lemurinus lemurinus</i>	2n=55/56	(KVIII/IX)
<i>Aotus lemurinus griseimembra</i>	2n=52/53/54	(KII/III/IV)
<i>Aotus brumbacki</i>	2n=50	(K ?) (10)
<i>Aotus vociferans</i>	2n=46	(KV)
<i>Aotus S.P.</i>	2n=58	(KX)

Esto hace de nuestro país una región privilegiada dentro de la distribución de *Aotus*, puesto que en él se encuentran el mayor número de variantes cromosómicas del género y representan un material invaluable para el estudio de los mecanismos evolutivos ocurridos y de algunos aspectos esenciales en la fisiología, reproducción y ecología. Es indispensable la delimitación de las áreas de distribución y densidad poblacional en el medio natural con el fin de establecer políticas de protección, conservación y cría que garanticen la so-

breviencia de estos primates tan importantes en las investigaciones biomédicas.

#### SUMMARY

Cytogenetic data on 288 Colombian *Aotus* are presented. All of the animals, for which its exact geographical origin is well-known, are members of an experimental Malaria colony at the Instituto Nacional de Salud, Bogotá, Colombia.

The animals were captured in three different geographic locations. Most of them (254) came from San Marcos, Sucre, (down San Jorge Valley, 7° 30' NL; 74° 06' WL). The first 21 offspring obtained in captivity, were also included. Nine animals came from Río Negro, Antioquia (middle Magdalena valley, 6° 09' NL; 75° 23' WL). Four animals were captured in the west slope of the Andes West chain of Mountains, high Cusiana River, (5° 25' NL; 72° 43' WL).

The phenotype of these animals corresponded to the "B" or "grey neck" phenotype. Cytogenetic studies showed the presence of animals 2n=54, 2n=53 and 2n=52 which correspond to the karyotypes KII, KIII and KIV, or the so called kariomorpho 2. It was found that the population of down San Jorge valley was in equilibrium for the frequencies of the three karyotypes. No cytogenetic differences were found in the populations of the down San Jorge and middle Magdalena valleys.

The four animals from the west slope of the Andes West Chain of Mountains showed a new karyotype for the genus *Aotus*, 2n=58, proposed as karyotype KX.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración prestada por los doctores Jairo Ramírez, Carlos Espinal y Jaime Umaña, del Grupo de Malaria del Instituto Nacional de Salud, responsables del zoológico de *Aotus*. También agradecen de manera especial la colaboración técnica, en los inicios de la presente investigación, de la bióloga Cristina de Fraser.



## BIBLIOGRAFIA

1. Organización Panamericana de la Salud. Primera conferencia interamericana sobre la conservación y utilización de Primates Americanos no Humanos en las investigaciones biomédicas. OPS. 1977, Publicación científica No. 317, Washington, D.C.
2. Collins WE, Stanfill PS, Skinner JC, Harrison AJ, Smith CS. Studies on human malaria in *Aotus* monkeys. IV Development of *Plasmodium falciparum* in two subspecies of *Aotus trivirgatus*. J. Parasitol. 1974; 60 : 355.
3. Schmidt LH. Infections with *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* in the owl monkey model systems for basic biological and chemotherapeutic studies. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1973; 67 : 446.
4. Porter JA, Young MD. Suscetibility of Panamian Primates to *Plasmodium vivax*. Milit. Med. 1966; 131 : 952.
5. Espinal C, Moreno E, Umaña J, Ramírez J, Montilla M. Susceptibility of different population of colombian *Aotus* monkeys to the FCB-1 strain of *Plasmodium falciparum*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1984; 33 : 777.
6. Cicmanec JL, Campbell AK. Breeding the owl monkey (*Aotus trivirgatus*) in a laboratory environment. Lab. An. Sc. 1977; 27 : 512.
7. Umaña J, Ramírez J, Espinal C, Sabogal E. Primates no humanos para investigación biomédica: Establecimiento, adaptación y mantenimiento de *Aotus lemurinus griseimembra*. Boletín OPS. 1984; 97 : 44.
8. Ma NSF, Jones TC, Miller AC, Morgan LM, Adams Ea. Chromosome polymorphism and banding patterns in the owl monkey (*Aotus*). Lab. Anim.Sci. 1976; 26 : 1022.
9. Ma NSF, Kelly ST, Harper JS, Bedard MT, Jones TC. Banding patterns of the chromosomes of two new karyotypes of the owl monkey *Aotus*, captured in Panamá. J. Med. Primatol. 1978; 7 : 146.
10. Hershkovitz P. two new species of night Monkeys, Genus *Aotus* (Cebidae, Platyrrhini): A preliminary Report on *Aotus* taxonomy. Am. J. Primatol. 1983; 4 : 209.
11. Giraldo A, Bueno ML, Torres OM, Silva E. Bandig patterns of a new karyotype of a colombian owl monkey *Aotus* (2n=58). (enviado a publicación) J. Med. Primatol.
12. Cabrera A. Catálogo de los mamíferos de Sur América. Rev. M. Arg. Cien. Nat. Bern. Riv. 1958; IV : 133.
13. Hernández-Camacho J, Cooper RW. The non-human primates of Colombia pp 35-69 in Neotropical Primates Field Studies and Conservation. Eiteded RW Thorington, JRPG Heltne, Washington, D.C. National Academy of Science 1976.
14. Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford DA. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. Expl. Cell. Res. 1960; 20 : 613.
15. Arango M, Moreno MC. Propiedades mitogénicas y leucoaglutinantes en linfocitos humanos de la lectina del haba (*Vicia faba*). Tesis de grado, Facultad de Química, Universidad Nacional de Colombia, 1977.
16. Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. Lancet. 1971; 2 : 971.
17. Camargo H, Cervenka J. Pattern of chromosomal replication in synchronized lymphocytes. I. Evaluation and application of Methotrexate block. Hum. Genet. 1980; 54 : 47.
18. Reumer JWF, de Boer LEM. Standaridization of *Aotus* chromosome nomenclature, with descriptions of the 2n=49/50 karyotype and that of a new hybrid. J. Hum. Evol. 1980; 9 : 461.
19. Yunis E, Torres OM, Ramírez C. Genus *Aotus* Q and G band karyotypes and natural hybrids. Folia Primatol. 1977; 27 : 165.
20. Silva E, Bueno ML, Giraldo A, Ramírez J, Umaña J. Análisis reproductivo y segregación de cariotipos en parejas de *Aotus griseimembra* en cautiverio. Biomédica. 1985; Sup. 1 : 35.
21. Ma NSF. Chromosome evolution in the owl monkey *Aotus*. Am. J. Phy. Anthropol. 1981a, 54 : 293.
22. Ma NSF. Errate chromosome evolution in owl monkey *Aotus*. Am. J. Phy. Anthropol. 1981b, 54 : 236.