

---

# **ANEXO 3: ESTUDIOS CITOGENÉTICOS EN PECES MEDIANTE HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE IN SITU**

Cesar Martins

Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Departamento de Morfologia.  
Botucatu, SP, Brazil.

Los peces presentan una gran diversidad de formas cariotípicas que incluyen variaciones en el número y fórmula cromosómica, presencia de cromosomas supernumerarios y cromosomas sexuales, y polimorfismos cromosómicos poblacionales. Por lo tanto, el estudio de los cromosomas constituye una poderosa herramienta que puede contribuir a obtener respuestas para muchas interrogantes relacionadas con la biogeografía, evolución, estructura cromosómica y organización del genoma de los peces.

Gran parte de la información relacionada con la localización de secuencias de ADN en los cromosomas de los peces, se refiere a secuencias repetitivas como ADNs ribosomales, ADNs satélites y elementos transponibles. Apenas algunos genes de copia única o con pocas copias han sido mapeados en los cromosomas de este grupo de vertebrados. En este orden de ideas, en este capítulo, se hace una revisión de la localización de secuencias de ADN en los cromosomas de los peces y se presentan algunos elementos obtenidos de análisis modernos que involucran la localización cromosómica de secuencias de ADN y genes con las que ha sido posible realizar nuevas interpretaciones de esta diversidad, en particular sobre el origen de los cromosomas sexuales y de los cromosomas supernumerarios así como también sobre la organización genómica de segmentos específicos como las regiones centroméricas, teloméricas y los sitios ribosomales.

## **ORGANIZACIÓN CROMOSÓMICA DE LAS REPETICIONES EN TÁNDEM**

### **ADNs Satélite**

Aún cuando en las últimas dos décadas se han llevado a cabo estudios citogenéticos en un gran número de especies ícticas, tales análisis estaban orientados principalmente al conocimiento de la estructura cariotípica básica, mientras que son

---

muy pocos los trabajos realizados en el campo de la organización de las secuencias de ADN en los cromosomas. Con relación a la organización cromosómica de las secuencias de ADN repetitivo, una de las fracciones del genoma de los peces más estudiadas es el ADN satélite. Las familias de ADN satélite son copias repetitivas de secuencias no codificadoras organizadas en tandem, agrupadas en una o varias regiones del genoma.

En el genoma eucariótico, los ADNs satélites consisten en múltiples copias de secuencias en tándem de unidades repetidas (comúnmente 100 - 300 pares de bases (pb). Estas secuencias pueden variar de 1.000 a más de 100.000 copias y están organizadas como grandes conglomerados, principalmente en las regiones centroméricas y teloméricas de los cromosomas y son el componente principal de las heterocromatinas. Las familias de ADN satélite pueden corresponder al 0-66% de algunos genomas de mamíferos y su composición y número de familias no relacionadas puede ser altamente variable (Beridze, 1986). Especies distintas, a menudo presentan divergencia entre las familias de ADN satélite como resultados de mecanismo de evolución concertada (Arnheim, 1983), originando secuencias de ADN satélite especie-específicas. Por otra parte, existen unas pocas excepciones en las que un grupo de especies, o incluso toda una familia u orden, comparten la misma familia de ADN satélite. El ejemplo más interesante lo constituye el ADN satélite alpha centromérico que está preservado en el orden de los primates, muy probablemente debido a su función centromérica (Schueler *et al.*, 2001). Se han detectado también secuencias tipo satélite en gallinas y en el pez zebra, que presentan una interesante coincidencia con las secuencias humanas alfa (Li y Kirby, 2003).

Los ADNs satélites son útiles para análisis genéticos moleculares tales como la identificación de cromosomas homólogos y anomalías cromosómicas por hibridación *in situ*. Se ha estudiado la organización molecular, localización cromosómica y posibles funciones de los ADNs satélites en diversos grupos animales (Brutlag, 1980; Singer, 1982; Arnason *et al.*, 1984; Hummel *et al.*, 1984; Clabby *et al.*, 1996). Estos estudios han indicado que las secuencias tipo satélite pueden jugar un papel importante a nivel cromosómico y nuclear (Singer, 1982; Haaf y Schmid, 1991; Larin *et al.*, 1994; Sart *et al.*, 1997).

Aún cuando la distribución cromosómica de la heterocromatina – en donde se supone están concentrados los ADNs satélites – ha sido estudiada ampliamente en peces utilizando métodos citológicos de tinción o bandeo cromosómico, los datos moleculares sobre ADNs satélites se restringen a unas pocas especies (Tabla 1).

---

Las primeras descripciones de familias de ADN satélite en peces fueron publicadas a finales de la década de los 80 (Datta *et al.*, 1988; Moyer *et al.*, 1988; Monaco *et al.*, 1989). Los datos sobre ADNs satélites en peces muestran que estas secuencias están localizadas principalmente en las regiones centroméricas de los cromosomas (Tabla 1) (Figura 1a).

Estudios realizados en esturiones indican que una familia de ADN satélite *HindIII* aislada del genoma de *Acipenser naccarii* está preservada en las regiones pericentroméricas de los cromosomas de seis especies del género *Acipenser* y una del género *Huso* (Lanfredi *et al.*, 2001). También han aislado familias de ADN satélite centromérico del genoma del góbido *Gobius cobitis* (Canapa *et al.*, 2002) y la tilapia del Nilo *Oreochromis niloticus* (Franck y Wright, 1993). Específicamente en la tilapia del Nilo, la familia satélite estaba presente en los centrómeros de todos los cromosomas del complemento (Oliveira y Wright, 1998) (Figura 1a). El ADN satélite de tilapia también estaba preservado en otras especies de tilapiine y haplochromine (Franck *et al.*, 1994), conduciendo a proponer la posibilidad de que esta secuencia satélite se originó en un ancestro en este grupo y desde entonces se ha mantenido en los centrómeros de todos los cromosomas debido a su funcionalidad. Una característica interesante de la mayoría de las repeticiones satélites centroméricas es la longitud de su unidad básica (155-180 pb) que corresponde a la gama de las longitudes de las unidades nucleosómicas (Henikoff *et al.*, 2001). Longitudes de repetición mayores pueden abarcar dos nucleosomas.

El estudio generalizado de los ADNs satélites centroméricos de vertebrados ha puesto en evidencia la presencia de unidades repetitivas ricas en Adenida, las cuales son típicas de satélites centroméricos (Viñas *et al.*, 2004). También se han identificado unidades repetitivas cortas ricas en Adenina en los ADNs satélites centroméricos de diversas especies de peces (Wright, 1989; Denovan y Wright, 1990; Garrido-Ramos *et al.*, 1994, 1995; Kato, 1999; Viñas *et al.*, 2004; Canapa *et al.*, 2002). Estas secuencias cortas son bastante similares y presentan una homología considerable respecto a otras unidades repetitivas centroméricas encontradas en humanos (Vissel *et al.*, 1992), ratón (Wong y Rattner, 1988) y reptiles (Cremisi *et al.*, 1988), sugiriendo que tales secuencias podrían también jugar algún papel importante en la estructura y función del centrómero de peces.

Se ha prestado especial atención a la identificación de los ADNs satélites relacionados con los cromosomas sexuales y supernumerarios de peces. Por ejemplo, se ha aislado y mapeado ADNs satélites en los cromosomas sexuales de *Leporinus elongatus* (Nakayama *et al.*, 1994), *Chiondraco hamatus* (Capriglione *et al.*, 1994), *Poecilia reticulata* (Nanda *et al.*, 1990), *Oncorhynchus tshawytscha* (Devlin *et al.*, 1991;

---

Stein *et al.*, 2001), entre otras. Existen cromosomas sexuales, morfológicamente diferenciados, en diversas especies de peces. Los peces suramericanos del género *Leporinus* (Anostomidae, Characiformes) representan un buen modelo para estudiar la diferenciación de los cromosomas sexuales. Se ha descrito un claro sistema cromosómico sexual ZZ/ZW para siete de las 40 especies estudiadas (*L. conirostris*, *L. trifasciatus*, *L. obtusidens*, *L. elongatus*, *L. macrocephalus*, *L. reinhardti* y *L. aff elongatus*) (Galetti *et al.*, 1995). En estas especies el cromosoma subtelocéntrico W, presente sólo en el complemento femenino, es grande y casi totalmente heterocromático. En contraste, el cromosoma Z, presente en ambos sexos, es heterocromático en el tercio distal del brazo largo.

Debido a que las características morfológicas de los cromosomas Z y W se encuentran compartidas por siete especies del género *Leporinus*, se ha sugerido un origen común de estos cromosomas (Galetti *et al.*, 1995) y la posibilidad de que la heterocromatinización inicial podría haber sido el primer paso en la diferenciación de estos cromosomas sexuales (Galetti y Foresti, 1986). Por otra parte, un nuevo sistema cromosómico ZW, diferenciado morfológicamente del sistema ZZ/ZW detectado previamente, fue descrito para *Leporinus* sp2 (Venere *et al.*, 2004)

Se aislaron dos familias de ADN satélite a partir de *Leporinus elongatus* (Nakayama *et al.*, 1994). Una de ellas fue localizada en ambos cromosomas Z y W, mientras que la segunda familia fue específica del cromosoma W, lo que permite la identificación sexual de los individuos de esas especies. Se detectaron en el análisis tres individuos atípicos, una hembra ZW reconocida como macho con la sonda específica de la secuencia W y dos machos ZW, presentando uno de ellos patrón satélite de machos. Estos tres individuos parecen haberse originado por el intercambio genético entre regiones de los cromosomas Z y W, originando los patrones atípicos observados. Esta información sobre los cromosomas sexuales de *Leporinus* ha permitido la construcción de un modelo sobre la diferenciación del cromosoma W que aporta importantes contribuciones al conocimiento de los mecanismos de determinación sexual en peces.

En los salmónidos, se han llevado a cabo extensos estudios con el fin de aislar las secuencias de ADN a ser usadas como marcadores para la identificación sexual, dado que el heteromorfismo de los cromosomas X e Y no es detectado fácilmente. A partir del genoma del salmón *Oncorhynchus tshawytscha*, se aisló una secuencia de ADN repetitiva específica de Y con 300 copias organizadas en aproximadamente seis conglomerados distintos (Devlin *et al.*, 1991, 1998; Stein *et al.*, 2001). Contrariamente a lo observado en diversos eucariotas, en los que las secuencias repetitivas largas se originaron por duplicación de unidades repetidas cortas, la repetición de 8 kb aislada del salmón no contiene vestigios de repeticiones cortas internas.

---

Otro aspecto interesante es la presencia de los cromosomas supernumerarios que ha sido descrita para diversas especies de peces. Un ADN satélite correlacionado con un cromosoma supernumerario fue aislado por primera vez en *Astyanax scabripinnis*, un pequeño pez que se ha convertido en una especie modelo no sólo debido a las variaciones cromosómicas numéricas y estructurales, sino también a la presencia de cromosomas supernumerarios. En esta especie, la familia de ADN repetitivo aislada, llamada As51, tenía repeticiones de 51 pb y estaba ubicada en las heterocromatinas no centroméricas, en las RONS y en lo cromosoma supernumerario. Sorprendentemente, la familia satélite As51 presentó un 58,8% de similitud con un segmento del retrotransposon RT2 del *Anopheles gambiae* y una similitud menor con el gen de la transposasa del transposon TN4430 de *Bacillus thuringiensis*, sugiriendo que esta secuencia puede haber surgido a partir de un elemento móvil. La presencia del satélite As51 en la RON sugiere que esta familia repetitiva puede estar esparcida en los espaciadores de los ADNr 45S, habiendo sido insertada en esta región por transposición, como ha sido descrito previamente para otros organismos. Aún cuando la hibridación cromosómica detectaba señales de fluorescencia en casi toda la extensión de lo cromosoma supernumerario, fue posible verificar que el ADN satélite As51 está organizado en pequeños conglomerados entremezclados con otros tipos de ADN. La distribución simétrica en ambos brazos del cromosoma supernumerario de *A. scabripinnis* y su comportamiento meiótico sugiere que este cromosoma es un isocromosoma (Mestriner *et al.*, 2000).

Análisis de la composición nucleotídica de los cromosomas supernumerarios de otras especies ha revelado que éstos están compuestos principalmente por ADN repetitivo. Tal información está relacionada con la naturaleza heterocromática de los cromosomas supernumerarios.

También se aisló ADNs satélites a partir de *Prochilodus lineatus* que presenta de cero a cinco pequeños cromosomas supernumerarios (Pauls y Bertollo, 1983). En esta especie se aislaron dos familias de ADN satélite, con unidades monoméricas de 441 y 900 pb (Jesus *et al.*, 2003). Ambas familias satélites estaban localizadas en la región pericentromérica de diversos cromosomas del complemento A y el satélite de 900 pb estaba también localizado en diversos supernumerarios. La hibridación cromosómica doble, empleando los satélites de 441 y 900 pb como sondas, mostró que ambas familias se co-localizan en la región pericentromérica de algunos cromosomas. En el satélite de 900 pb se detectaron diversas subrepeticiones, sugiriendo su origen a partir de unidades repetidas pequeñas. Tales resultados demuestran que los cromosomas supernumerarios de esta especie se originaron a partir de cromosomas A que portan la familia de ADN satélite de 900 pb (Jesus *et al.*, 2003).

---

Los estudios en ADN<sub>s</sub> satélites han probado ser útiles para aclarar miles de preguntas, incluyendo la estructura centromérica y el origen y evolución de los cromosomas sexuales y supernumerarios. Los ADN<sub>s</sub> satélites también pueden encontrar aplicaciones en el mapeo físico del genoma, contribuyendo al desarrollo de marcadores genéticos de importancia significativa para la biología básica y aplicada de los peces.

## **ADN<sub>s</sub> Minisatélites**

La definición de repetición minisatélite no está bien estandarizada. Los minisatélites incluyen todas las repeticiones en tándem que no son tan grandes como para ser incluidas en las repeticiones satélites, ni tan pequeñas como para ser consideradas secuencias microsátélites. La mayoría de los investigadores consideran a los minisatélites como disposiciones en tándem (5-50 repeticiones) de secuencias cortas de ADN moderadamente repetitivas (10-60 bases) que se encuentran dispersas en todo el genoma y aglomeradas cerca de los telómeros. La intensa dinámica evolutiva de los minisatélites genera disposiciones complejas de tales secuencias en el genoma que pueden ser empleadas como marcadores específicos para un individuo.

Los minisatélites fueron empleados por primera vez en aplicaciones forenses y en pruebas de paternidad en humanos (Jeffreys *et al.*, 1985) y más tarde fueron ampliamente aplicadas a las poblaciones y a la identificación de organismos, desde las bacterias hasta los mamíferos. Se han descrito minisatélites para muchas especies de peces (Goodier y Davidon, 1998), mientras que la localización cromosómica de los minisatélites ha sido descrita sólo para unas pocas especies (Tabla 1). En los cromosomas del salmón del Atlántico (*Salmo salar*) (Pérez *et al.*, 1999), se mapearon tres minisatélites con secuencias repetitivas de 42, 28 y 34 nucleótidos. Para los satélites de 42 y 34 nucleótidos se detectó hibridación con un único locus y se detectó un patrón multilocus para el microsátélite de 28 nucleótidos. Análisis del genoma del “pufferfish” (*Tetraodon nigroviridis*) permitió la identificación de dos clases principales de elementos repetidos en tándem: uno correspondiente a un satélite de 118 nucleótidos que mapeaba en la región centromérica de todos los cromosomas y el otro con un minisatélite de 10 nucleótidos que fue mapeado en toda la longitud del brazo corto de 10 cromosomas subtelocéntricos (Crollius *et al.*, 2000).

## **ADN<sub>s</sub> Microsatélites**

Los microsátélites consisten en repeticiones en tándem de secuencias de ADN cortas diseminadas en el genoma de eucariotas constituidas por una a cinco o seis

---

bases (Tautz y Renz, 1984). La disposición de los microsatélites usualmente son de menos de 100 bases de largo y han sido empleados para análisis de mapas de ligamiento. Un análisis de mapa de ligamiento del genoma del pez zebra *Danio rerio* empleando 200 marcadores microsatélites de los tipos CA y GA revelaron que las repeticiones (CA)<sub>n</sub> y (GT)<sub>n</sub> están más aglomeradas en las regiones centroméricas y teloméricas (Shimoda *et al.*, 1999). La aglomeración de microsatélites en los centrómeros y telómeros fue también detectada por mapeo cromosómico *in situ*. En tres especies del género *Prochilodus* (Prochilodontidae, Characiformes), las repeticiones (AATTT)<sub>n</sub> revelaron 13 alelos y el mapeo cromosómico mostró señales predominantemente en las regiones teloméricas de diversos cromosomas (Hatanaka *et al.*, 2002). Las repeticiones de microsatélites (GA)<sub>n</sub> estaban altamente aglomeradas en las regiones teloméricas de *Imparfinis schubarti* (Heptapteridae, Siluriformes), dispersas a lo largo de los brazos cromosómicos con señales acrecentadas en algunas regiones teloméricas en *Steindachneridion scripta* (Pimelodidae, Siluriformes), y cerca de los sitios RON en *Rineloricaria latirostris* (Loricariidae, Siluriformes) (Vanzela *et al.*, 2002). Mediante hibridación *in situ* se detectaron segmentos ricos en la secuencia repetida (GACA)<sub>n</sub> en la porción heterocromática de los cromosomas W y Y de *Poecilia reticulata* (Poeciliidae, Cyprinodontiformes) (Nanda *et al.*, 1990). Los microsatélites están localizados esencialmente en las regiones heterocromáticas (telómeros, centrómeros y cromosomas sexuales) del genoma de peces, en donde se cree está localizada una fracción significativa de los ADNs repetitivos.

## **SECUENCIAS REPETITIVAS EN TÁNDEM DE ADN RIBOSOMAL**

El estudio de los genes de ARN ribosómico han ganado importancia en una amplia gama de animales y plantas, especialmente en relación a la caracterización de especies o poblaciones, relaciones evolutivas y estructuración del genoma. En los eucariotas superiores, los genes de ARN ribosómico (ARNr) están organizados como dos familias multigénicas distintas constituídas por arreglos de repeticiones dispuestas en tándem compuestas por de cientos a miles de copias. Una clase está representada por el ADNr de 45S que consiste en una unidad transcripcional que codifica para los ARNrs 18S, 5.8S y 28S y un espaciador intergénico no transcrito (IGS). Múltiples copias de esta disposición corresponden a las regiones organizadoras nucleolares (RONs). La otra clase (ADNr 5S) consiste de una secuencia altamente conservada de 120 pb que codifican para el ARNr 5S que está separado de cada unidad transcripcional por un espaciador variable no transcrito (NTS) (revisado en Long y Dawid, 1980). Mientras los genes de ARNr están conservados incluso entre taxa no

---

relacionados, los espaciadores no transcritos presentan una extensa variación en longitud y secuencia, lo que confiere un acentuado dinamismo a los genes ARNr.

## Secuencias repetitivas de ADNr 45S

La distribución de los sitios cromosómicos del ADN 45S en los peces ha sido ampliamente estudiadas mediante impregnación con nitrato de plata. Los primeros estudios de RONS en peces fueron realizados por Galetti (1979), que localizó y analizó la diversidad de estas regiones cromosómicas en 8 especies de la familia Anostomidae, y por Foresti *et al.* (1981), que verificaron un acentuado polimorfismo de estas regiones en una especie del grupo de los Gymnotiformes. Numerosos trabajos posteriores mostraron diferentes aspectos relacionados con estos sitios cromosómicos en prácticamente todos los grandes grupos de peces. Uno de los aspectos más recurrentes en esos estudios es el hecho de que la técnica de coloración con nitrato de plata ha sido considerado un método indirecto de localización de las RONS debido a que la plata se asocia con las proteínas nucleolares involucradas en la actividad transcripcional de los genes ribosomales y no directamente al ADNr (Miller *et al.*, 1976) y, por lo tanto, gran parte de la variación detectada, tanto intraindividual, interindividual e interespecífica, puede estar asociada a la actividad de estos cistrones.

Más recientemente, el empleo de técnicas de coloración con fluorocromos GC específicos, como la mitramicina A (MM) y cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>), mostró una estrecha relación entre las RONS evidenciadas con nitrato de plata y las regiones coloreadas con estos fluorocromos en los cromosomas de los peces (Galetti y Rasch, 1993; Mestriner *et al.*, 1995; entre otros).

La mayoría de las veces, todos los sitios RONS de los cromosomas de peces, detectados con el nitrato de plata, se evidencian como marcas fuertemente brillantes con mitramicina o cromomicina. Sin embargo, esta correlación no es absoluta. Existen muchos casos en la CMA<sub>3</sub> evidencia sitios adicionales a los revelados con la plata. Por otro lado, también se han descritos caso en que se señalan sitios detectados con nitrato de plata que no son marcados con la CMA<sub>3</sub> (Mandrioli *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2001).

Con la finalidad de determinar claramente si los sitios CMA<sub>3</sub> positivos representan de hecho los sitios de ADNr 45S o heterocromatinas ricas en GC, se ha empleado la hibridación *in situ* con sondas de ADNr 45S en diversas especies de peces, como por ejemplo en *Leporinus friderici* (Galetti *et al.*, 1995), en el género *Eigenmannia*



---

(Almeida-Toledo *et al.*, 1996) y en especies del género *Schizodon* (Martins y Galetti, 1998).

Mandrioli *et al.* (2001), estudiando *Gobius niger* (Gobiidae), identificaron sitios positivos a la plata y a la hibridación con sondas de ADNr 45S, aunque se mostraron negativos a la coloración con el fluorocromo CMA<sub>3</sub>. Estudios conjugados de bandeado C, coloración con nitrato de plata, fluorocromos GC específicos e hibridación *in situ* con sondas de ADNr 45S en *A. scabripinnis*, ha suministrado importantes datos sobre la organización de las RONS en los peces. Sitios de DNAr 45S, no evidenciados mediante fluorocromos GC específicos, fueron también observados en esta especie (Souza *et al.* 2001). Al contrario de lo observado por Mandrioli *et al.* (2001), las RONS CMA<sub>3</sub> negativas de *A. scabripinnis* se mostraron negativas, también a la coloración con nitrato de plata, siendo reveladas sólo mediante hibridación *in situ*. Los conglomerados de ADNr 45S negativos a la plata, sugieren que estos segmentos de ADN no presentan actividad transcripcional perceptible por coloración con plata o pueden representar vestigios no funcionales de segmentos de ADN 45S.

## **REPETICIONES DE ADNr 5S Y ADNr 5S-VARIANTE**

### **Organización cromosómica del ADNr 5S**

La localización cromosómica de los genes 5S ha sido descrita para más de 60 especies de peces representantes de distintos grupos tales como Acipenseriformes, Anguilliformes, Cypriniformes, Characiformes, Salmoniformes, Perciformes, y Tetraodontiformes y demostrado ser de gran importancia en la comprensión de la estructura y organización de las secuencias repetidas en sus cromosomas (revisado por, Martins y Wasko, 2004).

En la mayoría de los eucariotas, los genes ARNr 5S son detectados en distintas áreas del genoma, organizados como uno o más conglomerados repetidos en tándem y el número de genes de ARNr 5S oscila de 100 a 300.000 copias, lo cual es generalmente mayor que el número de genes de ARNr 45S (Hadjilov, 1985). En muchos vertebrados, los genes ARNr 5S están localizados en un solo par cromosómico, mientras que el ADNr 45S está frecuentemente presente en múltiples cromosomas (Suzuki *et al.*, 1996; Makinem *et al.*, 1997). En especies de anfibios (Schmid *et al.* 1987; De Lucchini *et al.* 1993) y peces (Martins y Wasko, 2004; Mazzei *et al.*, 2004), los genes ARNr 5S pueden ser detectados en diversos cromosomas

---

(Figura 1c, 1d). En la mayoría de las especies de peces, los genes ARNr 5S tienen una posición intersticial en los cromosomas, lo que sugiere que tal localización podría implicar alguna ventaja relacionada con la organización de estos genes en el genoma. Adicionalmente, los loci de ADNr 45S and 5S pueden presentar una organización sinténica en el cromosoma (Pendás *et al.*, 1994; Mórán *et al.*, 1996; Mazzei *et al.*, 2004) o pueden detectarse en distintos pares cromosómicos (Martínez *et al.*, 1996; Martins y Galetti, 1999). Sin embargo, las localizaciones divergentes de los loci RONs y ADNr 5S parecen ser la situación más común encontrada en peces y por mucho el patrón de distribución más frecuente observado en vertebrados (De Lucchini *et al.* 1993, Suzuki *et al.* 1996). Se ha sugerido que una localización cromosómica distinta de los ADNr 5S y 45S podría representar alguna ventaja en comparación con la condición de ligamiento (Martins y Galetti, 1999). La localización sinténica de los conglomerados 5S y 45S podría facilitar las traslocaciones entre las disposiciones 45S y 5S, ocasionando interferencia disruptiva en la estructura y función de tales genes. Esto podría explicar por qué la mayoría de los vertebrados tienen los conglomerados de ADNr 45S y 5S en cromosomas distintos.

En el caraciforme *Leporinus*, se identificaron dos clases de ADNr 5S, una que consistía de unidades monoméricas repetidas de aproximadamente 200 pb y otra con monómeros de 920 pb (Martins y Galetti, 2001). Cada una de estas clases de ADNr de diferente tamaño estaba caracterizada por distintas secuencias NTS y estaba conglomerada en diferentes pares cromosómicos. Diversos estudios de las secuencias de ADNr 5S en especies de peces, han identificado tipos variantes de las repeticiones en tándem de ADNr 5S, caracterizados por marcadas diferencias en las NTSs. En perciformes (Martins *et al.*, 2002) y salmoniformes (Pendás *et al.*, 1994) se ha observado la presencia de dos tipos de repeticiones en tándem de este ADN ribosómico. En *O. niloticus*, se identificaron dos unidades de ADNr 5S distintas y están caracterizadas por distintos NTSs que varían en secuencia y longitud entre los loci. La primera clase tiene monómeros de 1.405 pb (denominado ADNr 5S tipo I) y el segundo tiene monómeros de 475 pb (denominado ADNr 5S tipo II). En el ADNr 5S tipo I también se detectó un pseudogen putativo de ARNr 5S y dos genes ARNr 5S putativos (uno de ellos invertidos) (Martins *et al.*, 2002). Ambas clases estaban aglomeradas en distintos cromosomas. Mientras el ADNr tipo I se detectó en una posición intersticial en el brazo largo de un par cromosómico subtelo-acrocéntrico (cromosoma 3), el ADNr 5S tipo II se ubicó intersticialmente en el brazo largo de pares cromosómicos subtelo-acrocéntrico diferentes (cromosomas 9 y 13). La investigación exhaustiva de los segmentos de NTS de los ADNr tipo I y tipo II, permitió detectar la presencia de sólo un tipo de NTS en el ADNr 5S tipo I y dos subtipos de NTS en el ADNr 5S tipo II (Alves - Costa *et al.*, en prensa).

---

Los subtipos detectados en las NTS del ADNr 5S tipo II están relacionados con la presencia de una expansión/delección microsatélite de "TG". Resulta interesante el hecho de que el ADNr 5S tipo I está localizado sólo en un locus cromosómico y el ADNr 5S está localizado en dos loci cromosómicos diferentes. Tales datos evidencian que la homogenización de las repeticiones del ADNr 5S puede ocurrir sólo dentro de un locus específico, mientras que diferentes loci en el mismo genoma pueden estar altamente diferenciados en la secuencia de nucleótidos y tamaño de las unidades repetidas.

La asignación de diferentes clases de ADNr 5S a distintos loci cromosómicos, refuerza la idea de que distintas clases de ADNr 5S, ocupan distintas posiciones cromosómicas y parecen estar evolucionando independientemente en los ambientes nucleares individuales.

## **Dinámica del ADNr 5S y ADNr 5S-variante en el genoma de *Hoplias malabaricus***

Un modelo interesante para demostrar el intenso dinamismo de las repeticiones del ADNr 5S en el genoma, es el pez *Hoplias malabaricus*. En el genoma de esta especie se aislaron y caracterizaron dos familias repetitivas en tándem, denominadas ADNr 5S-verdadero y ADNr 5S-variante (Martins *et al.*, en prensa) (Figura 2). Las repeticiones de ADNr 5S-verdadero contienen las regiones codificantes completas para el ARNr 5S y las repeticiones de ADNr 5S-variante contienen una región codificante truncada para el ARNr 5S. También se observó similitud entre los NTS de ambas clases. Se llevó a cabo una hibridación cromosómica utilizando como sondas a las secuencias de ADNr 5S-verdadero y ADNr 5S-variante. En condiciones de baja restricción, ambas sondas hibridaron en la región centromérica de 18 cromosomas y cerca de los centrómeros en el brazo corto de los pares cromosómicos 3 y 15. Bajo condiciones de alta restricción, la sonda de ADNr 5S-verdadero se hibridó al brazo corto de los pares cromosómicos 3 y 15 y la sonda de ADNr 5S-variante a la región centromérica de 18 cromosomas (Figura 2).

Las repeticiones de ADNr 5S-verdadero de *H. malabaricus* fueron casi idénticas, con un valor bajo para la distancia genética promedio (0,001) entre las repeticiones, sugiriendo que tales secuencias son gobernadas por fuerte presión selectiva. Por otra parte, el alto valor (0,045) para el promedio de la distancia genética entre las repeticiones del ADNr 5S-variante, sugiere que estas secuencias están libres de presión selectiva. Una evidencia del intenso dinamismo de las secuencias de ADNr 5S-variante, es la presencia de un microsatélite TAAA expandido (Figura 2). Para

---

explicar la diferencia entre la distancia genética de la secuencia de ADNr 5S-verdadero y ADNr 5S-variante, es posible hipotetizar que una transferencia de unidades de ADNr 5S-verdadero a la posición centromérica, cambió el estatus de la presión selectiva sobre los genes de ARNr 5S, liberándolos para multiplicarse y dispersarse en los centrómeros de diversos pares cromosómicos, como ha sido demostrado para otras secuencias satélite centroméricas.

La organización y evolución de los ADNs repetitivos en tándem, está gobernada por patrones particulares de evolución, tales como intercambio desigual, transposición, transposición mediada por ARN y conversión génica (Dover, 1986). Drouin y Moniz de Sá (1995) sugirieron la hipótesis de que la transposición mediada por ARN es el mecanismo responsable del ligamiento inusual de los genes de ARNr 5S a otras familias multigénicas repetidas en tándem. De acuerdo a los autores, la transposición mediada por ARN podría ser la responsable de la dispersión de copias únicas de las repeticiones de ADNr 5S, puesto que se esperaría que moléculas de ADN circular cerrado covalentemente (ADNccc), que contengan genes de ARN 5S, conllevaran algunas veces a la inserción de varias copias del gen de ARN 5S, entre otras secuencias del genoma. Tales moléculas de ADNccc han sido encontradas en muchas especies de eucariotas, incluyendo mamíferos, gallina, *Drosophila*, y plantas (revisado en Renault *et al.*, 1993). Se han encontrado diversos tipos de ADNccc en embriones de *D. melanogaster* y uno de ellos contiene un número variable de secuencias homólogas a los genes de ARNr 5S (Pont *et al.*, 1987). Por esto, en *H. malabaricus* las primeras copias del ADNr 5S-variante, pueden haberse transferido a una posición centromérica mediante ADNcccs. Alternativamente, la secuencia de ADNr 5S-variante podría haberse originado en la región centromérica de los cromosomas 3 ó 15 por duplicación, o inversión cromosómica, involucrando a algunas copias de ADNr 5S adyacentes presentes en estos cromosomas. Las primeras copias de ADNr 5S-variante podrían haberse asociado con otras secuencias repetitivas en la heterocromatina centromérica, que facilitó su dispersión a otros cromosomas debido a mecanismos evolutivos concertados.

Aún no puede dilucidarse si estas repeticiones pueden estar confiriendo alguna ventaja estructural o funcional a los cromosomas como componente del ADN centromérico de *H. malabaricus*. Los centrómeros han sido reconocidos como regiones del genoma evolutivamente dinámicas (Eichler y Sankoff, 2003) pero, aún cuando han sido bien estudiados desde animales hasta hongos, aún está por comprenderse asuntos importantes (Henikoff *et al.*, 2001). El centrómero es vital para la correcta repartición de los cromosomas durante la división celular, siendo esencia para un apropiado mantenimiento y segregación del material genético. Aún cuando este papel está conservado a lo largo de la evolución, las secuencias de ADN encontradas en las regiones cromosómicas son frecuentemente variables (Henikoff *et al.*, 2001).

---

Perturbaciones en la organización estructural y funcional de los centrómeros conllevan a problemas críticos tales como defectos del desarrollo y cáncer. Las regiones centroméricas son ricas en ADNs repetitivos, rasgo común en humanos (Willard y Wayne, 1987), ratón (Kipling *et al.*, 1991; Narayanswami *et al.*, 1992), maíz (Kaszás y Birchler, 1996), *Drosophila* (Murphy y Karpen, 1995), *Neurospora* (Centola y Carbón, 1994) y levadura (Clark, 1990). Un hallazgo interesante es que el motivo expandido TAAA en el ADNr 5S-variante, es similar a los motivos cortos ricos en A identificados en los ADNs satélites centroméricos de diferentes especies de peces, como se reportó previamente en este capítulo. Estas secuencias cortas son bastante similares, mostrando una homología considerable a otros motivos centroméricos hallados en humanos (Vissel *et al.*, 1992), ratón (Wong y Rattner, 1988) y reptiles (Cremisi *et al.*, 1988), sugiriendo que tales secuencias podrían jugar un papel importante en la estructura y función del centrómero de *H. malabaricus*.

Diversos estudios previos han encontrado evidencia de elementos con secuencias relacionadas al ADNr 45S, bien dispersas o aglomeradas en los genomas eucariotas. Estos elementos han sido caracterizados principalmente como repeticiones en tándem de unidades pequeñas de número variable de copias, no codificantes y han sido identificadas en diversas especies eucariotas, incluyendo levadura (Childs *et al.*, 1981), animales (Arnheim *et al.*, 1980; Kominami y Muramatsu, 1987; De Lucchini *et al.*, 1988; Lohe y Roberts, 1990), y plantas (Unfried *et al.*, 1991; Falquet *et al.*, 1997). Los resultados aquí presentados para el pez *H. malabaricus* muestran que también pueden originarse elementos similares a partir del ADNr 5S. Los ADNr 5S-variantes y pseudogenes parecen ser comunes en mamíferos (Emerson y Roeder, 1984; Doran *et al.*, 1987; Leah *et al.*, 1990). Por otra parte, la característica de interés en las repeticiones de ADNr 5S-variante del *H. malabaricus* es la gran abundancia de número de copias, la disposición en tándem y su posicionamiento centromérico.

Las secuencias de ADN repetitivo son sujeto de la acción de diversos mecanismos moleculares y se cree son los componentes de evolución más rápida de los genomas eucariotas. Los resultados discutidos para *H. malabaricus* representan también un buen ejemplo de la fluidez de secuencias repetitivas proporcionando novedades en la organización genómica de la región centromérica de los vertebrados. La familia satélite de ADNr 5S-variante, se ha dispersado en la región centromérica de diversos cromosomas y ha sido favorecido durante la evolución debido a un posible papel en la estructura y función del centrómero. Una vez más, parece claro que los estudios sobre las secuencias repetitivas pueden aportar un enfoque interesante para la comprensión de la estructuración y evolución del genoma.

---

# ORGANIZACIÓN CROMOSÓMICA DE LOS ELEMENTOS REPETITIVOS DISPERSOS

## Transposones

La mayoría de las secuencias repetidas del genoma se derivan de elementos transponibles. En los humanos, el 45% del genoma pertenece a este tipo de repeticiones (The Genome International Sequencing Consortium, 2001). En los vertebrados, es posible reconocer dos clases de transposones. La primera clase (i) incluye tres tipos que transponen a través de intermediarios de ARN: elementos dispersos largos (LINEs), elementos dispersos cortos (SINEs), y retrotransposones LTR; y la segunda clase (ii) incluye a aquellas secuencias que se transponen directamente como ADN: transposones de ADN. Los genomas de peces contienen todos los tipos de elementos transponibles conocidos (Volf *et al.*, 2003) y algunos de estos elementos fueron mapeados a los cromosomas (Tabla 2).

Los genomas pequeños y compactos de los “pufferfish” *Tetraodon nigroviridis* y *Takifugu rubripes* resultan interesantes para estudiar las secuencias repetitivas. El contenido total de transposones en el genoma de *T. nigroviridis* es sólo del 0,9%, una gran fracción de lo cual está constituido por elementos LINE (0,4%) (Crollius *et al.*, 2000). Los genomas de los dos peces globo poseen un contenido bajo de repeticiones (Aparicio *et al.*, 2002; Fischer *et al.*, 2004). Por otra parte, el *T. nigroviridis* contiene una alta diversidad de elementos transponibles que no se observan en genomas más grandes tales como el humano y de ratón (Aparicio *et al.*, 2002; Volf *et al.*, 2003). Los elementos transponibles están comartamentalizados en heterocromatinas y están distribuidos al azar en el genoma de este pez globo (DaSilva *et al.*, 2002; Bouneau *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2004) (Tabla 2). Adicionalmente, la distribución de repeticiones en el genoma del *T. nigroviridis* es diferente de la observada en humanos, en donde las secuencias repetidas constituyen una fracción importante del ADN y es más similar a la distribución observada en *Drosophila melanogaster* y *Arabidopsis thaliana* quienes tienen también genomas pequeños (Fischer *et al.*, 2004). En el *T. nigroviridis*, las secuencias repetitivas tales como minisatélites y elementos transponibles están claramente localizadas en las regiones cromosómicas ricas en AT (Fischer *et al.*, 2004). Tal compartimentalización del genoma del pez globo parece no ser la norma en peces y podría representar una característica de los genomas pequeños y compactos.

---

Aún cuando los estudios citogenéticos de los elementos transponibles de peces están sólo empezando, los resultados preliminares sugieren que estos elementos pueden contribuir grandemente al conocimiento de evolución del genoma de los peces. Por ejemplo, un elemento LINE denominado CiLINE2, aislado a partir del genoma del *O. niloticus* (Oliveira *et al.*, 1999) fue detectado por hibridación en el ADN genómico de todas las especies Tilapiini probadas de los géneros *Oreochromis*, *Tilapia*, y *Sarotherodon*. Es interesante resaltar que el ADN de las especies *Oreochromis* y *Sarotherodon* produjo un patrón diferente de las especies de *Tilapia*, sugiriendo que la sonda CiLINE2 pudiera ser utilizada para distinguir peces del género *Tilapia* de los de *Oreochromis* y *Sarotherodon*. La hibridación fluorescente *in situ* con el elemento CiLINE2 evidenció en *O. niloticus* señales muy pequeñas distribuidas más o menos al azar sobre las cromátidas de todos los cromosomas, pero sorprendentemente enriquecidas a lo largo de los dos tercios terminales del brazo largo del par cromosómico uno (Oliveira *et al.*, 1999) que corresponde a los cromosomas sexuales XY putativos.

La distribución de las secuencias SINE denominadas ROn-1 y ROn-2, en los cromosomas de la tilapia del Nilo, investigada por hibridación fluorescente *in situ* por Oliveira *et al.* (2003), mostró que ambas secuencias SINE están organizadas en pequeños conglomerados dispersos en todos los cromosomas. Adicionalmente, el elemento ROn-1 está distribuido casi exclusivamente en las regiones intersticiales de los cromosomas y las copias de ROn-2 están localizadas cerca de la región telomérica de diversos cromosomas. Existe un conglomerado grande de ROn-1 en la mitad del brazo largo del par cromosómico uno (Figura 1b). No se observó similitud en la distribución de los SINEs y LINEs entre los cromosomas de tilapia del Nilo y mamíferos.

Las sondas cromosómicas completas obtenidas mediante la microdissección y amplificación DOP-PCR a partir del cromosoma uno de *O. niloticus*, se hibridaron más intensamente en el brazo largo del cromosoma uno, sugiriendo la presencia de un gran número de elementos repetitivos en esta región cromosómica (Harvey *et al.*, 2002). La clonación y secuenciación del ADN microdisectado a partir de los cromosomas sexuales XY (par cromosómico uno) de la misma especie, mostró que estos cromosomas están enriquecidos en secuencias repetitivas, la mayoría de ellas elementos transponibles (Harvey *et al.*, 2003). Adicionalmente, la distribución de los elementos repetitivos en el cromosoma sexual de *O. niloticus* sugiere que existen diferencias significativas entre los cromosomas X e Y. Considerando que las principales diferencias detectadas entre los cromosomas X e Y residen en el brazo largo (Foresti *et al.*, 1993), el desarrollo de nuevos marcadores capaces de distinguir a los cromosomas X e Y, será de un valor considerable para propósitos de acuicultura.

---

Se estudió la dinámica en el genoma y localización cromosómica de dos retrotransposones de repetición terminal no-largos (*Rex1* y *Rex3*), en 13 especies de peces nototenidos del Antártico (Ozouf-Costaz *et al.*, 2004) (Tabla 2). Ambos elementos transposones *Rex1* y *Rex3* estaban dispersos en todas las partes de los cromosomas con acumulación en algunas regiones particulares, como en el cromosoma sexual de *Chionodraco hamatus*. También se identificó la presencia de otro elemento tipo transposon (*Tc1*) (Capriglione *et al.*, 2002), en el cromosoma Y de *C. hamatus*. Particularmente, el elemento tipo-*Tc1* se hibrida intersticialmente al brazo largo del cromosoma sexual Y, que se supone se ha originado por fusión en tándem o Robertsoniana (Morescalchi *et al.*, 1996). Esto sugiere que los elementos transposones podrían haber estado involucrados en la diferenciación del cromosoma sexual en los nototenidos.

La presencia de elementos derivados de transposones son también comunes en los cromosomas B de diversos organismos, tales como las plantas *Brachycone dichronosonidica* (Francks *et al.*, 1996) y *Rye* (Langdon *et al.*, 2000), y animales tales como el insecto *Nasonia vitripennis* (McAllister, 1995) y el pez *Astyanax scabripinnis* (Mestriner *et al.*, 2000). Se ha encontrado que un elemento tipo retrotransposon específico aislado de *Alburnus alburnus*, por “Amplified fragment length polymorphism” (AFLP), es abundante en cromosomas B y está ausente en los cromosomas A normales (Ziegler *et al.*, 2003).

Tomados en conjunto los resultados de los estudios sobre ADNs repetitivos parecen tener un valor considerable para aclarar diversos aspectos concernientes al origen y evolución de los cromosomas sexuales y supernumerarios en los organismos y a la evolución del genoma. La constante presencia de secuencias repetidas en los cromosomas sexuales y supernumerarios en las especies de peces, indica que los ADNs repetitivos han jugado un papel importante en la evolución de sus genomas.

## **Maapeo cromosómico de genes de copia simple**

La localización cromosómica de secuencias de copia simple ha sido poco realizada en peces, debido a la dificultad para generar la señal a partir de la hibridación de sondas representadas por una pequeña secuencia de ADN que no se encuentra repetida en el genoma. Recientemente, el empleo de sondas de bibliotecas genómicas construidas en Cromosomas Artificiales de Bacterias (BAC), ha permitido la localización por FISH, de genes de copia simple de peces. Por ejemplo, un fragmento del gen de la hormona de crecimiento (GH2-D) fue localizado en los cromosomas de los salmones *O. mykiss* y *O. kisutch* (Iturra *et al.*, 2001) y el gen de la



---

tirosina-kinasa neurotrófica fue localizado en los cromosomas del pez zebra, *Danio rerio* (Sola y Gornung, 2001). Aún se requiere mucho en relación a la detección de genes de copia única en peces lo cual es, sin duda, una de las grandes perspectivas de los estudios con FISH en estos animales. La localización cromosómica de estos genes será de gran importancia en el establecimiento de grupos de ligamiento, base para la construcción de mapas genéticos.

## **Otras tecnologías aplicadas para localizar secuencias de ADN en los cromosomas**

Aun cuando la hibridación *in situ* clásica ha sido utilizada como procedimiento básico en la localización de secuencias de ADN en los cromosomas de los peces, otras tecnologías se están mostrando muy prometedoras y ya comienzan a ser aplicadas. Una de estas metodologías, el Zoo-FISH, brinda la posibilidad de que la organización de secuencias de ADN aisladas de una especie sea investigada en otras especies. Hasta ahora, los trabajos que involucran Zoo-FISH se han relacionado principalmente con el mapeo de secuencias repetitivas (genes ribosomales y ADNs satélite) en los cromosomas.

Las diferencias entre genomas han sido estudiadas en especies de peces por hibridación genómica comparativa (CGH), metodología que posee amplia aplicación, permitiendo que regiones cromosómicas exclusivas de un genoma sean distinguidas en relación a otro genoma. La CGH está relacionada con las diferencias que existen en el ADN entre dos genomas, y no requiere conocimiento previo de la composición de las secuencias. Por ejemplo, la CGH se presenta como un método universal para identificar cromosomas sexuales diferenciados desde el punto de vista molecular. Traut y Winking (2001) estudiaron los estadios de evolución cromosómica del sexo en peces utilizando CGH, e identificaron segmentos cromosómicos particulares, que eran sexo-específicos. La CGH también ha sido aplicada en la identificación de híbridos entre especies de salmónidos (Fujiwara *et al.*, 1997) y se revela como herramienta fabulosa para la investigación de los sistemas de cromosomas supernumerarios que ocurren con frecuencia en los peces neotropicales.

La localización simultánea de diferentes secuencias de ADN o genes en los cromosomas se muestra extremadamente promisorio ya que brinda la posibilidad de una mayor precisión en el mapeo de los cromosomas. Mediante esta tecnología, Jesus *et al.* (2003) mapearon dos familias de ADNs satélite en los cromosomas de

---

*Prochilodus lineatus*, y Almeida-Toledo *et al.* (2002) realizaron el mapeo de dos genes ribosomales 5S y 45S en cromosomas de diferentes especies del género *Astyanax*.

Otra tecnología que ha sido aplicada con mucho éxito en peces es la PRINS (*Primed in situ labeling*) que consiste en la identificación de secuencias específicas de DNA en los cromosomas, utilizando el procedimiento de una PCR (*Polymerase Chain Reaction*) que se realiza en la lámina donde se encuentran fijados los cromosomas. El fundamento de la técnica está en la utilización de ADN cromosómico como molde de reacción en la PCR y de iniciadores (*primers*) específicos de las secuencias de interés que se pretende localizar. El procedimiento de PRINS ya ha sido aplicado en la identificación de los genes ribosomales 5S en el género *Leporinus* (Martins y Galetti, 1999) (Figura 1c, 1d) y de ADN satélite en *D. rerio* (Sola *et al.*, 1999). Particularmente, en *Leporinus*, el PRINS se ha mostrado muy eficiente, pues permitió la identificación de agrupamientos muy pequeños de ADNr 5S, de difícil visualización por hibridación *in situ* convencional. El PRINS se muestra bastante prometedor en la localización cromosómica de genes de copia única o de pocas copias, una vez que un gran número de ciclos de amplificación puede ser realizado, aumentando la señal producida y facilitando así su visualización.

La pintura de cromosomas (*Chromosome Painting*), ampliamente difundida en mamíferos por la disponibilidad de sondas producidas a partir de los cromosomas de algunas especies, representa una tecnología muy novedosa a ser aplicada también en peces, presentándose como herramienta para los estudios de homologías cromosómicas, ya que no es posible obtener bandas longitudinales estructurales en los cromosomas de peces.

Mediante técnicas de microdissección, un cromosoma o parte de él puede ser aislado y a partir de allí construir sondas utilizables para pintar cromosomas. Actualmente, se puede encontrar en la literatura sólo una referencia de microdissección cromosómica en peces. En busca de marcadores cromosómicos sexuales, Harvey *et al.* (2002) utilizaron microdissección cromosómica para investigar los probables cromosomas sexuales en la tilapia *O. niloticus*. En un análisis del complejo sinaptonémico realizados por Foresti *et al.* (1993), fue sugerido que la tilapia posee sistema XX/XY, representado por el par cromosómico más grande del complemento. Posteriormente, Harvey *et al.* (2002) obtuvieron sondas por microdissección de los probables cromosomas X e Y, y la hibridación de estas sondas en los cromosomas metafásicos mostró la existencia de diferencias en los cromosomas sexuales de la especie. Estos datos soportan la hipótesis de que el primer par cromosómico está relacionado con la determinación sexual y sugiere también que los cromosomas sexuales en esta especie se encuentran en un estadio inicial de diferenciación.

Con la culminación de la secuenciación del genoma de especies de peces - genoma del pez zebra (*Danio rerio*) y del pez globo (*Fugu rubripes*), por ejemplo – estarán disponibles para la comunidad científica, bibliotecas genómicas conteniendo secuencias de todo el genoma de estas especies que podrán ser utilizadas como sondas en el mapeo génico, pintura cromossômica y Zoo-FISH.

En general, poco se sabe sobre la organización genómica de los peces. La gran característica en que difiere el genoma de los peces en relación a otros vertebrados de sangre caliente es la compartimentalización genómica. La especies de sangre caliente presentan su genoma organizado en mosaicos isocóricos, es decir, segmentos de ADN caracterizados por una composición de bases similares (Bernardi, 1992). Genes constitutivos y estructurales, por ejemplo, se encuentran localizados en isocoras específicas. Mientras unas familias isocóricas son ricas en contenido de GC, otras son pobres en las presencia de estas bases. En los peces, así como en los anfibios, el grado de compartimentalización composicional es menor, y se cree que este hecho, *per se*, sería responsable de la ausencia de bandas longitudinales (tipo G) en sus cromosomas (Bernardi, 1992).

De esta forma, las técnicas presentadas en este tópico, aunque todavía poco aplicadas en peces, representan fuentes prometedoras de resultados que ayuden en el esclarecimiento de la organización estructural del genoma de este importante grupo de vertebrados.

Tabla 1: Repeticiones de ADN en tándem y su distribución cromosómica en peces

Familias y especies de peces	Tamaño(pb)	Distribución	Referencias
<b>Acipenseridae</b>			
<i>Acipenser naccarii</i>	180	centromérica	Garrido-Ramos <i>et al.</i> , 1997; Lanfredi <i>et al.</i> , 2001
<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	180	centromérica	Lanfredi <i>et al.</i> , 2001
<i>Acipenser baerii</i>	180	centromérica	Lanfredi <i>et al.</i> , 2001
<i>Acipenser transmontanus</i>	180	centromérica	Lanfredi <i>et al.</i> , 2001
<i>Acipenserruthenus</i>	180	centromérica	Lanfredi <i>et al.</i> , 2001
<i>Huso huso</i>	180	centromérica	Lanfredi <i>et al.</i> , 2001
<b>Adrianichthyidae</b>			
<i>Oryzias latipes</i>	600	ligado al sexo	Matsuda <i>et al.</i> , 1998
<b>Anostomidae</b>			
<i>Leporinus elongatus</i>	174, 729	cromosomas Z y W	Nakayama <i>et al.</i> , 1994

<b>Familias y especies de peces</b>	<b>Tamaño(pb)</b>	<b>Distribución</b>	<b>Referencias</b>
<i>Leporinus obtusidens</i>	483	pericentromérica	Koehler <i>et al.</i> , 1997
<b>Channichthyidae</b>			
<i>Chionodraco hamatus</i>	1,000	centromérica y telomérica	Capriglione <i>et al.</i> , 1994
<b>Characidae</b>			
<i>Astyanax scabripinnis</i>	51	heterocromatinas	Mestriner <i>et al.</i> , 2000
<b>Cichlidae</b>			
<i>Oreochromis niloticus</i>	237	centromérica	Franck <i>et al.</i> , 1992; Oliveira y Wright, 1998
<i>Oreochromis niloticus</i>	1,900	brazo corto del cromosoma N° 4	Frank and Wright, 1993; Oliveira and Wright, 1998
<b>Cyprinidae</b>			
<i>Carassius auratus langsdorfi</i>	137		Murakami y Fujitani, 1997
<i>Danio rerio</i>	180, 191	centromérica	Ekker <i>et al.</i> , 1992; He <i>et al.</i> , 1992; Sola y Gornung, 2001
<i>Danio rerio</i>	200	heterocromatinas ricas en AT	Phillips y Reed, 2000
<i>Danio rerio</i>	92	heterocromatinas ricas en GC	Phillips y Reed, 2000
<b>Erythrinidae</b>			
<i>Hoplias malabaricus</i>	333-366	centromérica	Haaf <i>et al.</i> , 1993
<i>Hoplias malabaricus</i>	356-360	centromérica	Martins <i>et al.</i> , submitted
<b>Gobiidae</b>			
<i>Gobius cobitis</i>	332	centromérica	Canapa <i>et al.</i> , 2002
<i>Gobius paganellus</i>	332	centromérica	Canapa <i>et al.</i> , 2002
<b>Heptapteridae</b>			
<i>Imparfinis schubarti</i>	2	telomérica	Vanzela <i>et al.</i> , 2002
<b>Loricariidae</b>			
<i>Rineloricaria latirostris</i>	2	cercana a la RON	Vanzela <i>et al.</i> , 2002
<b>Parodontidae</b>			
<i>Parodon hilarii</i>	200	heterocromatinas terminales, cromosoma W	Vicente <i>et al.</i> , 2003
<b>Pimelodidae</b>			
<i>Steindachneridion scripta</i>	2	telomérica, dispersa	Vanzela <i>et al.</i> , 2002
<b>Poeciliidae</b>			
<i>Poecilia reticulata</i>	4	cromosoma Y	Nanda <i>et al.</i> , 1990
<b>Prochilodontidae</b>			
<i>Prochilodus lineatus</i>	441	pericentromérica	Jesus <i>et al.</i> , 2003
<i>Prochilodus lineatus</i>	900	pericentromérica y supernumerarios	Jesus <i>et al.</i> , 2003
<i>Prochilodus lineatus</i>	5	telomérica	Hatanaka <i>et al.</i> , 2002
<i>Prochilodus marggravii</i>	5	telomérica	Hatanaka <i>et al.</i> , 2002
<b>Salmonidae</b>			
<i>Salvelinus alpinus</i>	72, 127, 200,	centromérica	Hartley y Davidson, 1994

Familias y especies de peces	Tamaño(pb)	Distribución	Referencias
	400		
<i>Salvelinus namaycush</i>	140	centromérica	Reed y Phillips, 1995
<i>Salvelinus namaycush</i>	120	centromérica	Reed y Phillips, 1995
<i>Salmo trutta</i>	359	RON	Abuín <i>et al.</i> , 1996
<i>Salmo salar</i>	380, 442, 923	RON, rDNA	Goodier and Davidson, 1994; Abuín <i>et al.</i> , 1996
<i>Salmo salar</i>	260	pericentromérica	
<i>Salmo salar</i>	42	intersticial	Pérez <i>et al.</i> , 1999
<i>Salmo salar</i>	28	telomérica, pericentromérica, centromérica	Pérez <i>et al.</i> , 1999
<i>Salmo salar</i>	34	intersticial	Pérez <i>et al.</i> , 1999
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	939	subtelomérica	Devlin <i>et al.</i> 1991, 1998
<b>Sparidae</b>			
<i>Sparus aurata</i>	186	centromérica	Garrido-Ramos <i>et al.</i> , 1994
<i>Pagrus pagrus</i>	186	subtelomérica	Garrido-Ramos <i>et al.</i> , 1998
<i>Pagrus aurica</i>	186	subtelomérica	Garrido-Ramos <i>et al.</i> , 1998
<i>Pagellus erythrinus</i>	186	subtelomérica y telomérica	Garrido-Ramos <i>et al.</i> , 1998
<b>Tetraodontidae</b>			
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	118	Pericentromérica	Crollius <i>et al.</i> , 2000
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	10	Heterocromatinas	Crollius <i>et al.</i> , 2000
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	100	Heterocromatinas	Fischer <i>et al.</i> , 2004
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	104	Heterocromatinas	Fischer <i>et al.</i> , 2004
<i>Fugu rubripes</i>	118	Centromérica	Brenner <i>et al.</i> , 1993; Elgar <i>et al.</i> , 1999
<b>Cyclostomata</b>			
<i>Eptatretus okinoseanus</i>	90	Intersticial	Kubota <i>et al.</i> , 1993
<i>Eptatretus burgeri</i>	57 y 64	Intersticial	Kubota <i>et al.</i> , 2001
<i>Petromyzon marinus</i>		centromérica y pericentromérica	Bóan <i>et al.</i> , 1996

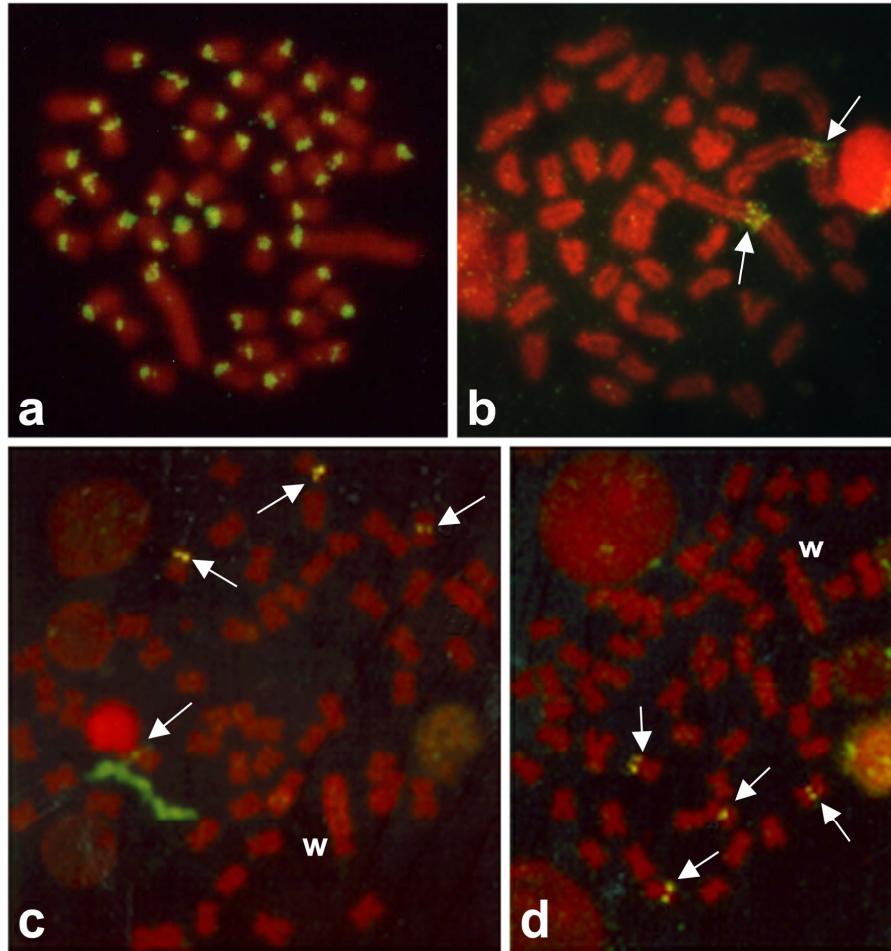
Tabla 2: Elementos repetitivos dispersos y su localización cromosómica en especies de peces

Órdenes y especies de peces	Tipo de elemento	Localización cromosómica	Referencias
<b>Aulopiformes</b>			
<i>Aulopus japonicus</i>		cromosoma W	Ota <i>et al.</i> , 2003
<b>Cypriniformes</b>			
<i>Alburnus alburnus</i>	<i>Gypse, Ty3</i>	cromosoma B	Ziegler <i>et al.</i> , 2003
<b>Cyprinodontiformes</b>			
<i>Xiphophorus maculatus</i>	<i>XIR LTR-like</i>	cromosoma Y	Nanda <i>et al.</i> , 2000
<b>Perciformes</b>			
<i>Artedidraco shackletoni</i>	<i>Rex1, Rex3</i>	disperso	Ozouf-Costaz <i>et al.</i> , 2004
<i>Bovichtus angustifrons</i>	<i>Rex1, Rex3</i>	disperso	
<i>Chionodraco hamatus</i>	<i>Tc1-like</i>	pericéntrica, telomérica, intersticial	Capriglione <i>et al.</i> , 2002
<i>Chionodraco hamatus</i>	<i>Rex1, Rex3</i>	disperso	Ozouf-Costaz <i>et al.</i> , 2004
<i>Dissostichus mawsoni</i>	<i>Rex1, Rex3</i>	disperso	Ozouf-Costaz <i>et al.</i> , 2004
<i>Gobius Niger</i>	<i>Mariner-like</i>	solapando las RONS	Mandrioli <i>et al.</i> , 2001
<i>Gymnodraco acuticeps</i>	<i>Rex1, Rex3</i>	disperso	Ozouf-Costaz <i>et al.</i> , 2004
<i>Gymnodraco victori</i>	<i>Rex1, Rex3</i>	disperso	Ozouf-Costaz <i>et al.</i> , 2004
<i>Neopagetopsis ionah</i>	<i>Rex1, Rex3</i>	disperso	Ozouf-Costaz <i>et al.</i> , 2004
<i>Notothenia coriiceps</i>	<i>Rex1, Rex3</i>	disperso	Ozouf-Costaz <i>et al.</i> , 2004
<i>Oreochromis niloticus</i>	<i>ciLINE2</i>	cromosoma 1 y disperso	Oliveira <i>et al.</i> , 1999
<i>Oreochromis niloticus</i>	<i>Ron1</i>	cromosoma 1 y disperso	Bryden <i>et al.</i> , 1998; Oliveira <i>et al.</i> , 2003
<i>Oreochromis niloticus</i>	<i>Ron2</i>	disperso	Oliveira <i>et al.</i> , 2003
<i>Oreochromis niloticus</i>	<i>On2318</i>	cromosoma 1 y disperso	Harvey <i>et al.</i> , 2003
<i>Oreochromis niloticus</i>	<i>On239, Tc1-like</i>	centromérica, telomérica y dispersa	Harvey <i>et al.</i> , 2003
<i>Patagonotothen tessellata</i>	<i>Rex1, Rex3</i>	dispersa	Ozouf-Costaz <i>et al.</i> , 2004
<i>Trematomus hansonii</i>	<i>Rex1, Rex3</i>	dispersa	Ozouf-Costaz <i>et al.</i> , 2004
<i>Trematomus newnesi</i>	<i>Rex1, Rex3</i>	dispersa	Ozouf-Costaz <i>et al.</i> , 2004
<i>Trematomus bernacchii</i>	<i>Rex1, Rex3</i>	dispersa	Ozouf-Costaz <i>et al.</i> , 2004
<i>Trematomus pennellii</i>	<i>Rex1, Rex3</i>	dispersa	Ozouf-Costaz <i>et al.</i> , 2004
<b>Tetraodontiformes</b>			
<i>Tetraodon fluviatilis</i>	<i>Mariner-like</i>	asociada a la heterocromatina de las RON	Mandrioli y Manicardi 2001
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	<i>Dm-Line</i>	heterocromatinas	Dasilva <i>et al.</i> , 2002
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	<i>Tc1-like</i>	heterocromatinas	Dasilva <i>et al.</i> , 2002
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	<i>Zebulon</i>	heterocromatinas	Bouneau <i>et al.</i> , 2003

---

<b>Órdenes y especies de peces</b>	<b>Tipo de elemento</b>	<b>Localización cromosómica</b>	<b>Referencias</b>
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	<i>Tol2</i>	heterocromatinas	Fischer <i>et al.</i> , 2004
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	<i>Buffy1</i>	cromosomas 4-5	Fischer <i>et al.</i> , 2004
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	<i>Rex3</i>	heterocromatinas	Fischer <i>et al.</i> , 2004
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	<i>Babar</i>	heterocromatinas	Fischer <i>et al.</i> , 2004

---



**Figura 1.-** Hibridación fluorescente *in situ* del ADN satélite SATA ADN (a) y del Ron1 SINE (b) en los cromosomas de tilapia del Nilo, *Oreochromis niloticus* y PRINS (Primed *in situ* labeling) de los genes 5S rARN de los cromosomas de *Leporinus elongatus*. El satélite SATA está distribuido en la región centromérica de todos los cromosomas, el elemento Ron 1 (flechas) está agrupado en posición intersticial en el primer par de cromosomas *O. niloticus* y los genes 5S rARN están organizados en dos pares de cromosomas (flechas) en *L. elongatus*. El cromosoma sexual W de *L. elongatus* está también señalado. (Cortesía de Irani Alves Ferreira).



```

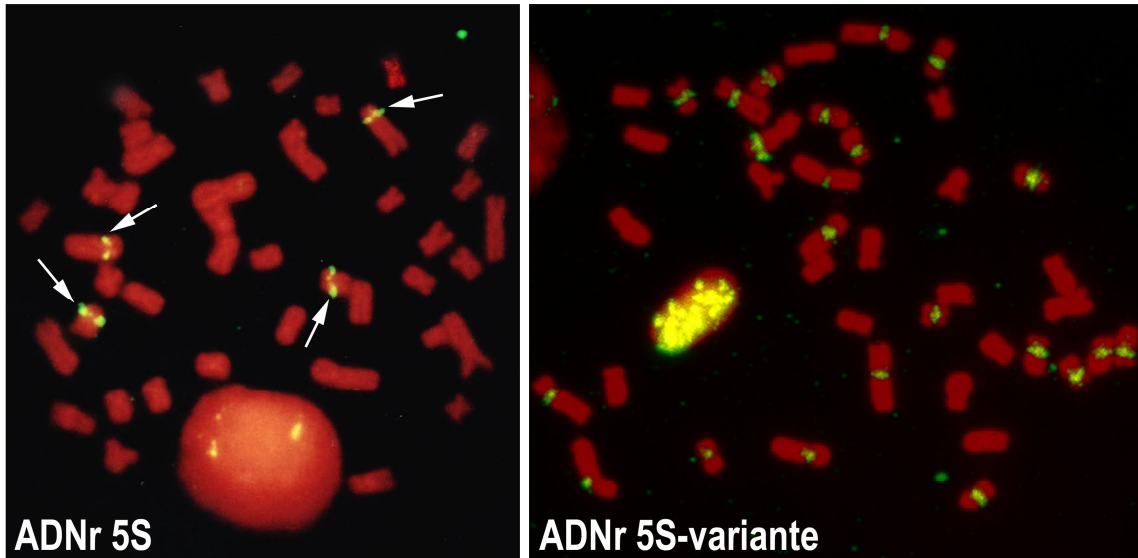
ADNr 5S      TTAGCTTAAG-CTCC-----TAAAGACA-GTAGCCACAGTCATTTAAACACAAGAGAAGAAAACCTT-AAAAA----- 68
ADNr 5S-var  TCCGCAAAAGGCTCCGATTTGTCGAAGATTTGTACCTACAGTTATTTGAACACAAGACAAAAGCAAACCTTTAAAAATAAACAAATAAACAATGAA 97

ADNr 5S      -----AAAAAA-CGA-----ACTGGAAAGCCAATCATTTTCATTGAGGTGGCAGGCAGTCTACCGTTT 127
ADNr 5S-var  TAAATAAAGAATAAACAAACAATAAAAAAACAATAAACGAAAAACACTGGAAAGCCAATCATGTTAATTTGAGTTGTGAGGCTTTTCA--GTTT 192

ADNr 5S      ACAGGCAGCTCTAAAACAAGTATTAGTCTTAGAAGAGTCTCTAGAATAAGTCTTCTACAGCCAGCAGTGATCGCTTACGGCCATACCAGCCTGNNTA 224
ADNr 5S-var  ACAAGCAGCTCTGTAACAAGAGTTACTCTTAGAACAGTCATTACAAATAGTCTGCTACAGCCAACAGTCATTGCTTATGGCCATACCCCTTAGAA 289

ADNr 5S      CGCCCGATCTCGTCCGATCTCGGAAGCGAAGCAGAGTGGGCCTAGTTAGTACTTGGGA-TGGGAGACTGCCTGGGAATACTAGGTGCTGTAAGCTT 319
ADNr 5S-var  ATGCCGATCTTGT-----GCG-----CTGAGTTAGTACTTGGAAATGGAAGACTGCCAGGGAATACTAGGTGCTGTAAGCTT 360

```



**Figura 2.-** Secuencia de nucleotidos del ADNr 5S y de las repeticiones del ADNr 5S-variante (ADNr 5S-var) en *Hoplias malabaricus*. La región codificadora del 5s ARN se indica en negritas y las repeticiones TAAA expandidas en negritas tipo itálicas. Se empleó hibridación fluorescente *in situ* para el mapeo cromosómico del ADNr 5S y el ADNr 5S-variante. El ADNr 5S está localizado en el par de cromosomas 1 (flechas) y el ADNr 5S-variante se encuentra localizado en la región centromérica de 18 cromosomas. La hibridación fluorescente *in situ* es cortesía de Irani Alves Ferreira.