

CAPÍTULO 4

Citogenética Aplicada

*Graciela González, Alejandro D. Bolzán
y Eliana R. Steinberg*

La Citogenética como disciplina que estudia el comportamiento y la estructura de los cromosomas y su relación con la transmisión y recombinación de los genes, proporciona diferentes niveles de análisis, constituyendo una herramienta fundamental para estudios taxonómicos, evolutivos y de genómica estructural y funcional. En el presente capítulo, se ejemplifican tres aplicaciones de la citogenética en el ámbito vegetal y animal: la citogenética en el estudio evolutivo y aplicado del maíz y sus especies relacionadas, la aplicabilidad de la técnica de Hibridación *In Situ* Fluorescente (FISH) para la identificación de telómeros y secuencias teloméricas intersticiales (STI) y el estudio de las aberraciones cromosómicas que los involucran y la caracterización citogenética en el manejo de primates en cautiverio.

La citogenética en el estudio evolutivo y aplicado del maíz y sus especies relacionadas

Análisis del cariotipo

Los estudios citogenéticos clásicos en plantas permiten analizar las características del cariotipo (número, tamaño y simetría de los cromosomas, posición de los centrómeros, cantidad y distribución de la heterocromatina). Además, evalúan el tamaño del genoma y analizan el comportamiento meiótico de los cromosomas en razas, especies, híbridos y poliploides. Las características del cariotipo son generalmente constantes en un grupo de especies y aún de géneros, pero a menudo ocurren variaciones estructurales y/o numéricas entre especies relacionadas, incluso dentro de una misma especie. Estas variaciones han sido encontradas, entre otros, en el género *Zea* que incluye al maíz y sus especies silvestres relacionadas (teosintes), donde empleando tinciones convencionales se describieron los cariotipos de cada especie (Figura 4.1) y se detectaron cromosomas B en número variable. Los cromosomas B son accesorios al complemento cromosómico normal de la especie (complemento A), son heterocromáticos, no codificantes, sin funciones vitales para el organismo y con mecanismos de impulso meiótico que hacen que se hereden con mayor

frecuencia que la esperada por herencia mendeliana. Estos abren un nuevo campo de investigación en lo que se refiere a su manejo como portadores de genes útiles en programas de mejoramiento genético. En razas de maíz nativas del noroeste argentino y en razas de Bolivia, cultivadas a lo largo de un gradiente altitudinal, se observaron individuos portando de 0 a 8 cromosomas B (Fig. 4.1). La correlación positiva detectada entre número y frecuencia de cromosomas B y la altitud de cultivo permitió sugerir un significado adaptativo para estos cromosomas accesorios.

Contenido de ADN. Variación del tamaño del genoma

El contenido de ADN de una especie en general se expresa en picogramos (pg, 10^{-12} g) y actualmente se mide por citometría de flujo. Esta técnica se basa en hacer pasar una suspensión de núcleos teñidos con un fluorocromo (DAPI o Ioduro de Propidio) por delante de un rayo de luz láser. Se miden las intensidades de fluorescencia a diferentes longitudes de onda emitida por cada núcleo, siendo la cantidad de señales de fluorescencia proporcional a la cantidad de ADN. Estas señales de intensidad de fluorescencia son recogidas por detectores que las convierten en señales electrónicas que posteriormente son digitalizadas para permitir la medida del contenido de ADN del núcleo. Esta técnica presenta la ventaja de analizar un elevado número de núcleos en un corto período de tiempo.

El tamaño del genoma es muy variable entre grupos de plantas, de hecho en angiospermas oscila entre 0,05 pg en *Cardamine* y 127 pg en *Fritillaria*, y es independiente de la complejidad orgánica. El contenido de ADN puede variar por aumento o disminución del nivel de ploidía, aneuploidía, polimorfismo numérico para cromosomas B, reestructuraciones cromosómicas con pérdida o duplicación de material genético y pérdida o ganancia de secuencias repetitivas no codificantes, las que pueden estar conformando bloques o dispersas en el genoma.

En *Zea* existe variación intra e interespecífica en el contenido de ADN. En líneas y razas argentinas de maíz (*Zea mays* ssp. *mays*) oscila entre 4,9 pg y 6,9 pg, mientras que *Zea luxurians* posee 9,2 pg, el mayor contenido de ADN del género. Esta amplia variación se debe principalmente a las diferencias de bloques heterocromáticos, denominados *knobs*, formados por secuencias altamente repetidas en *tándem*, o sea una detrás de la otra. Otros componentes responsables de la variación del tamaño del genoma en *Zea* son la presencia en número variable de cromosomas B y la abundancia diferencial de secuencias repetitivas dispersas como los elementos transponibles.

En el análisis cariotípico de las distintas razas de maíz nativas del noroeste argentino (NOA) se observó una correlación negativa significativa entre el contenido de heterocromatina del complemento cromosómico A y la altitud de cultivo. Además, la disminución del contenido de ADN del complemento A se correlacionó con el aumento en la frecuencia poblacional de cromosomas B. Aunque se desconocen las causas de este *cline* divergente entre dos tipos de ADN no codificante, su observación repetida en distintos ambientes sugiere la exis-

tencia de fuerzas selectivas involucradas en el mantenimiento del *cline*. Por otra parte, el número y tamaño de los *knobs* se correlacionó negativamente con la altitud de cultivo. Si bien aún no se conocen las causas o mecanismos evolutivos que permitan explicar esta correlación, varios autores proponen que los *knobs* están sujetos a la acción de la selección tanto natural como artificial y, por lo tanto, adquieren valores adaptativos variables y se convierten en elementos muy importantes en la evolución de las poblaciones de *Zea*. Por lo tanto, la variabilidad en el tamaño del genoma observada en las distintas razas de maíz nativo poseería significado adaptativo en la evolución, diversificación y adaptación de las plantas a los distintos ambientes de cultivo.

Bandeo cromosómico con fluorocromos

Las técnicas de bandeo cromosómico, empleando los fluorocromos DAPI y CMA, revelan la cantidad y localización cromosómica de la heterocromatina y sus características citológicas. La molécula de DAPI (4'6'diamidino-2-phenylindole.2HCl) se intercala en el canal menor de la doble hebra de ADN compuesta por adenina-timina (AT), por lo tanto permite identificar las regiones cromosómicas de ADN altamente repetido rico en A-T que se observan como bandas de color azul brillante (bandas DAPI+). El CMA (Cromomicina A3) es un antibiótico fluorescente, no intercalante, que se une selectivamente a la doble hélice de ADN en las regiones ricas en guanina-citocina (G-C), por lo tanto revela a estas regiones cromosómicas como bandas brillantes de color amarillo-anaranjado (bandas CMA+). Ambos bandeos pueden emplearse de manera simultánea ya que brindan información complementaria. El mapeo de distintas bandas heterocromáticas sobre los cromosomas permite, en muchos casos, la identificación de cromosomas particulares. Un ejemplo notable de polimorfismo y politipismo para bandas heterocromáticas lo constituyen los taxones del género *Zea* (Figuras 4.1, 4.2A y 4.3B). Estos presentan variación en el tamaño, número y composición de *knobs*, los cuales se pueden encontrar en 34 posiciones diferentes en los cariotipos. El bandeo DAPI, que revela a los *knobs* como bandas DAPI+, permitió la discriminación cromosómica entre los taxones del género. Se observó que los *knobs* son subterminales en maíz, en *Zea mays* ssp. *mexicana* y en *Z. m.* ssp. *parviglumis*, terminales en *Z. luxurians* y en *Z. diploperennis*, y que no se encuentran en *Z. perennis*. Por otra parte, el bandeo CMA reveló que el número y la posición cromosómica de las regiones organizadoras del nucleolo (regiones ricas en AT, bandas CMA+) son conservados en *Zea*, carácter que por lo tanto carece de utilidad para la discriminación citogenética de las especies.

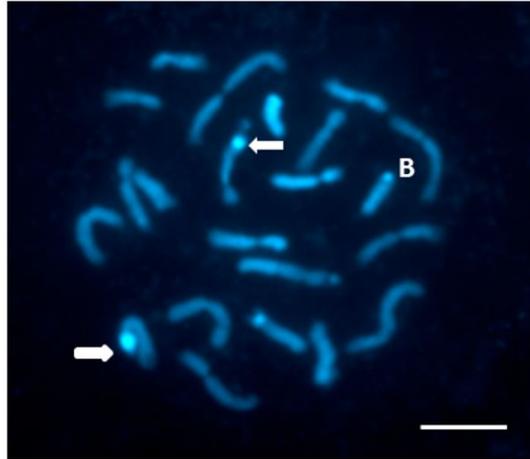


Figura 4.1. Bando DAPI sobre metafase mitótica de maíz de la raza Garrapata (raza nativa del noroeste argentino). Ref.: B: cromosoma B. Flechas blancas: bandas DAPI+ que denotan knobs. Barra: 10 μ m. Fuente: Graciela E. González.

Análisis del comportamiento meiótico

El estudio del comportamiento meiótico durante la microsporogénesis permite dilucidar el origen y modos de especiación en plantas, así como también evaluar la afinidad relativa entre genomas en poliploides e híbridos inter o intraespecíficos. Además de la utilidad en estudios taxonómicos y evolutivos, conocer el modo de apareamiento de los cromosomas durante la meiosis es fundamental en el mejoramiento genético, ya que en la producción de híbridos de interés agronómico se debe lograr un máximo de fertilidad, lo cual está directamente relacionado con el comportamiento de los cromosomas durante la formación de sus gametos.

La poliploidía es uno de los fenómenos más comunes en la evolución de las plantas, de hecho se estimó que el 70% de las angiospermas y la mayoría de las especies de plantas útiles económicamente son poliploides. El análisis del comportamiento meiótico en especies e híbridos artificiales de *Zea* reveló la naturaleza alotetraploide del maíz ($2n=20$) y de los teosintes, y que $X=5$ es el número básico del género. La presencia frecuente de dos grupos asincrónicos de 5 bivalentes cada uno, asociados a husos acromáticos distintos, y la eventual persistencia de dos nucléolos evidenciaron los dos genomas ancestrales de 10 cromosomas cada uno, revelando así la naturaleza poliploide del género *Zea*.

Citogenética molecular

La citogenética molecular combina las herramientas de la citogenética clásica con la información molecular de las secuencias y se aplica a estudios citotaxonómicos, filogenéticos, evolutivos, biotecnológicos y de mejoramiento genético. Para realizar las técnicas de hibridación *in situ* se pueden emplear gran variedad de sondas, que son secuencias de ADN marcadas con fluorocromos que se hibridan según su homología sobre núcleos interfásicos o sobre cromosomas.

somas mitóticos o meióticos. Según el tipo de sonda podemos distinguir al GISH (Hibridación *In Situ* Genómica) que emplea ADN genómico total para revelar homologías genómicas entre taxones, y al FISH (Hibridación *In Situ* Fluorescente) que mediante la localización cromosómica de secuencias específicas (secuencias repetitivas, genes, ADNr, transgenes, retrovirus) permite obtener mapeos físicos, funcionales y estructurales de los genomas.

Con el objetivo de caracterizar e identificar citogenéticamente a las razas de maíz nativas del norte de la Argentina se realizó una amplia serie de experimentos de FISH. Se hibridaron simultáneamente las secuencias repetitivas descriptas para los *knobs* (180-pb y TR-1) sobre las metafases mitóticas de los distintos maíces cultivados en el NOA y en el NEA. Se observó que las señales de hibridación colocalizan con las bandas DAPI+, es decir con los *knobs*, y que ambas secuencias se pueden encontrar combinadas o aisladas, revelando así la constitución de secuencia de cada *knob* (Figuras 4.2A y 4.2B). Dentro de cada raza se observaron patrones constantes de número, tamaño y composición de secuencias de los *knobs*, siendo estas características variables entre las razas. Estos patrones de hibridación permitieron graficar idiogramas DAPI-FISH para describir los cariotipos distintivos de cada raza (Figura 4.2C). Estos datos junto al conocimiento del contenido de ADN y la frecuencia de cromosomas B permitió la caracterización citogenética completa de cada raza estudiada. Esta interesante metodología puede emplearse también en la caracterización y el reconocimiento de líneas e híbridos comerciales de maíz.

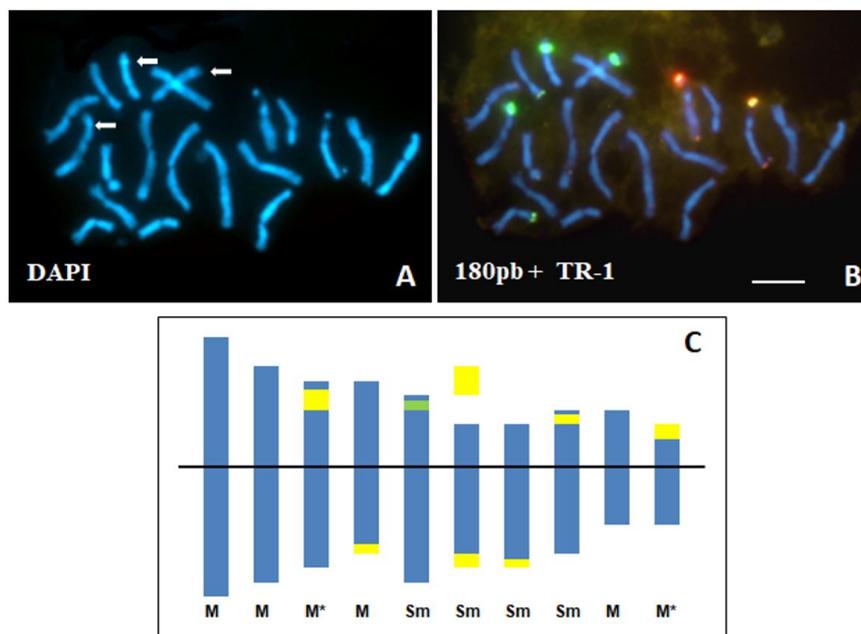


Figura 4.2. FISH sobre metafase mitótica de maíz raza Garrapata. **A.** DAPI, flechas blancas: knobs. **B.** FISH con las secuencias knob 180-pb (verde) y TR-1 (rojo), en amarillo los knobs hibridados con ambas secuencias. Barra: 10 µm. **C.** Idiograma DAPI-FISH de raza Garrapata; bloques amarillos: knobs compuestos sólo por 180-pb, bloques verdes: knobs formados por ambas secuencias, la línea horizontal representa la posición del centrómero, las letras indican la morfología cromosómica (M: metacéntrico, Sm: submetacéntrico) y el asterisco denota la heterocigosis para presencia de knob. Fuente: M. Florencia Fourastié y Graciela E. González.

En cuanto a los experimentos de FISH en teosintes, *Z. perennis* ($2n=40$), la especie con el menor contenido de ADN por genoma básico del género, no presentó bandas DAPI+ ni señales de hibridación con las secuencias de los *knobs*. Esto muestra que la disminución del tamaño del genoma en esta especie se debió principalmente a la pérdida de las secuencias repetitivas de los *knobs* durante su proceso de poliploidización secundaria. Por el contrario, *Z. luxurians* ($2n=20$) posee el mayor contenido de ADN por genoma básico del género, debido a que presenta el mayor número y tamaño de *knobs*.

Lo antes mencionado demuestra cómo la combinación de métodos citogenéticos clásicos y moleculares permitió la caracterización citogenética y aportó al conocimiento de la variabilidad fenotípica y genotípica de *Zea*. Otro ejemplo lo constituye la caracterización citogenética de especies argentinas de cactus pertenecientes al género *Opuntia*. Todos estos datos resultan de gran utilidad para programas de mejoramiento genético y de conservación de la biodiversidad.

Por su parte, el GISH revela las homologías específicas del ADN y la distribución física de las secuencias repetidas que comparten dos taxones, y permite el reconocimiento de especies parentales en híbridos y poliploides, lo que resulta fundamental en estudios evolutivos y taxonómicos. Mediante GISH se estudiaron las homologías y divergencias genómicas entre los taxones de *Zea* y se corroboró el origen poliploide del género. Estos experimentos mostraron la alta afinidad genómica que el maíz posee con *Z. mays* ssp. *mexicana* y con su propuesto progenitor silvestre *Z. m.* ssp. *parviglumis*, ya que se observaron fuertes señales de hibridación del ADN de estos teosintes a lo largo de todos los cromosomas del maíz (Figura 4.3). Por otra parte, cuando el ADN de *Z. m.* ssp. *huehuetenanguensis* se hibridó sobre los cromosomas de maíz se observó una menor homología entre ambos taxones. Al hibridar el ADN de *Z. luxurians* se observaron señales de hibridación homogéneas sobre todos los cromosomas de maíz, mostrando alta homología entre estas dos especies. Sin embargo, una menor afinidad genómica fue detectada entre el maíz y *Z. diploperennis*, especialmente en las regiones *knob*. El patrón de hibridación del ADN de *Z. perennis* sobre los cromosomas de maíz permitió postular que ambas especies poseen un genoma parental no compartido. Las zonas divergentes reveladas en estos experimentos, zonas de no hibridación, no se distribuyen sobre genomas parentales/ancestrales enteros (p.ej. sobre 10 cromosomas), esto demuestra que los genomas ancestrales habrían sufrido procesos de reestructuración y/o evolución coincidente incompleta.

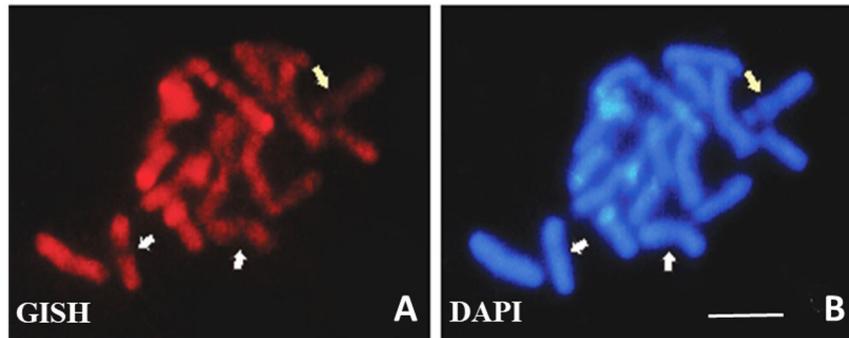


Figura 4.3. GISH sobre metafase mitótica de maíz. **A.** Patrón de hibridación con ADN genómico total de *Zea mays* ssp. *parviglumis* (rojo). **B.** Contratinción con DAPI. Las flechas muestran un brazo cromosómico y regiones centroméricas sin señales de hibridación, no homólogas. Barra: 10 μ m. Fuente: Graciela E. González.

Todos los resultados obtenidos mediante la aplicación de distintas metodologías citogenéticas permitieron entender la organización genómica y la diversificación de las especies de *Zea*, aportando nuevas claves para el estudio del origen del maíz domesticado.

Aplicación de la técnica de FISH para la identificación de aberraciones cromosómicas que involucran secuencias teloméricas

Tipos de sondas para FISH. Las sondas “PNA”

Como se mencionó en la sección anterior, la técnica de FISH, mediante la identificación de secuencias específicas de ADN *in situ* (en cromosomas en metafase o núcleos en interfase), con una sonda (secuencia complementaria de ácido nucleico) marcada con un colorante fluorescente, permite visualizar -mediante un microscopio de fluorescencia- la ubicación de esas secuencias. Las sondas disponibles comercialmente corresponden casi exclusivamente a sondas para cromosomas humanos (es muy poco frecuente encontrar sondas para otros mamíferos) pero afortunadamente, algunas de las sondas para humanos también pueden aplicarse con éxito en las células de otras especies de vertebrados. Asimismo, si bien la mayor parte de las sondas son de ADN, desde hace varios años contamos con sondas de tipo PNA (del inglés “Peptide Nucleic Acid”), que son similares a las sondas de ADN pero cuyo esqueleto azúcar-fosfato ha sido reemplazado por un esqueleto de poliamida, de carga neutra y flexible y altamente resistente a la degradación por DNAsas, RNAsas, proteinasas y peptidasas. Debido a su esqueleto neutro, las sondas de tipo PNA penetran en el cromosoma en lugar de pegarse a su superficie -como lo hace una sonda de ADN convencional, que tiene carga negativa- lo cual resulta en una eficiencia mucho mayor en la detección de secuencias que una sonda convencional. Actualmente, se pueden conseguir sondas de tipo PNA para detectar simultáneamente todos los centrómeros (pancen-

tromérica) y los telómeros (pantelomérica) presentes en los cromosomas de una célula humana. No obstante, debido a su similitud de secuencia, la sonda pancentromérica puede ser utilizada también en algunos primates no humanos, mientras que la sonda pantelomérica puede ser utilizada para detectar los telómeros de los cromosomas de cualquier especie de vertebrado, como veremos más adelante. En esta sección del presente capítulo, nos concentraremos en analizar la aplicabilidad de la técnica de FISH con sonda PNA pantelomérica para la identificación de telómeros y secuencias teloméricas intersticiales (STI) y su importancia para evaluar el daño cromosómico inducido por un mutágeno en los cromosomas de vertebrados. Para ello, primeramente definiremos qué son los telómeros y las secuencias teloméricas intersticiales.

Telómeros y secuencias teloméricas intersticiales (STI)

Telómero (del griego, *telo* = extremo, y *mero* = parte) es un término acuñado en 1938 por el genetista alemán Hermann Joseph Müller, para describir a los extremos de los cromosomas. Sin embargo, el concepto de “telómero” se utilizaba en esa época no sólo para referirse a los extremos físicos de los cromosomas, sino también a “un gen terminal con una función especial, la de sellar el extremo del cromosoma”. Por ello, los telómeros fueron definidos primeramente como las regiones terminales o extremos físicos de los cromosomas eucarióticos, que protegen a los mismos de la fusión con otros cromosomas (ya sea con un fragmento cromosómico o con uno o ambos extremos de otro cromosoma). Es decir, se aceptaba que el cromosoma tenía dos extremos y que los mismos debían tener necesariamente una función protectora. Hoy en día, a partir de diversos estudios de biología molecular, los telómeros son definidos como complejos nucleoproteicos ubicados en los extremos físicos de los cromosomas eucarióticos lineales que mantienen la estabilidad e integridad de los mismos, protegiéndolos de la degradación por nucleasas y de la recombinación y fusión con otros cromosomas.

Los telómeros están compuestos por ADN (de secuencia variable, según el organismo de que se trate), ARN (denominado TERRA, por su significado en inglés *Telomeric Repeat Containing RNA*, pues contiene repetidos de secuencia UUAGGG) y proteínas asociadas (el denominado complejo shelterina o telosoma, formado por seis proteínas, a las que se asocian además, varias proteínas relacionadas con la respuesta celular al daño y reparación del ADN). En todos los vertebrados, el ADN telomérico está formado por repeticiones del hexanucleótido TTAGGG, por lo cual la sonda pantelomérica que se utiliza en cromosomas humanos también puede ser utilizada para detectar los telómeros o secuencias teloméricas intersticiales en los cromosomas de cualquier otra especie de vertebrado e incluso de otras especies de animales no vertebrados o de especies vegetales que contengan la secuencia TTAGGG.

Dada la función del telómero, el mantenimiento de la misma es fundamental para la estabilidad genómica y la viabilidad celular. En efecto, las células que presentan telómeros

disfuncionales –ya sea debido a desprotección o erosión o acortamiento excesivo de los mismos– experimentan senescencia, muerte celular o inestabilidad genómica, fenómeno este último estrechamente ligado con el proceso de cáncer. Dado que los telómeros se acortan durante las sucesivas divisiones celulares (debido a que la enzima ADN polimerasa no es capaz de copiar el ADN de los extremos cromosómicos), existe una enzima denominada telomerasa que compensa el acortamiento, sintetizando repetidos teloméricos utilizando un ARN propio como templado o molde para dicha síntesis. Esta enzima se halla presente en líneas celulares inmortales, células de la línea germinal, células madre, linfocitos activados y la mayoría de las células tumorales y se encuentra inactiva en la mayoría de las células somáticas (de ahí el acortamiento progresivo de los telómeros en estas células).

Habitualmente, los repetidos teloméricos se localizan en los extremos o regiones terminales de los cromosomas, formando los verdaderos telómeros. Sin embargo, algunas especies de vertebrados presentan bloques de repetidos TTAGGG localizados en regiones no terminales de los cromosomas, constituyendo las denominadas “secuencias teloméricas intersticiales” (STI). Las STI pueden localizarse en la región pericentromérica o entre el centrómero y el telómero del cromosoma en cuestión (Figura. 4.4). Generalmente, se supone que la presencia de STI en los cromosomas es el resultado de fusiones cromosómicas en tándem (telómero-telómero) que han ocurrido durante la evolución de los organismos, aunque actualmente existen otras hipótesis acerca del origen evolutivo de estas secuencias. Si bien existen distintos tipos de STI (según su tamaño y organización), en la mayor parte de los vertebrados que presentan estas secuencias, las mismas aparecen como grandes bloques de posición centromérica o pericentromérica, pudiendo ocupar cientos de pares de bases de ADN. En general, se admite que las STI no representan verdaderos telómeros, es decir, telómeros funcionales. Sin embargo, debido a que los bloques de STI suelen colocalizar con sitios de ruptura, fragilidad y recombinación, se supone que estas secuencias juegan un rol importante en la formación de aberraciones cromosómicas inducidas, en la inestabilidad genómica y en la evolución cariotípica. En particular, las STI heterocromáticas -que forman los grandes bloques de STI en los cromosomas de vertebrados- están involucradas en fusiones, fisiones e inversiones cromosómicas, promoviendo la formación de nuevos telómeros y pueden experimentar diversos tipos de reordenamientos, incluyendo ruptura, amplificación, translocación o delección, lo cual puede conducir al desarrollo de nuevos cariotipos y nuevas especies, favoreciendo el proceso de evolución cariotipo.

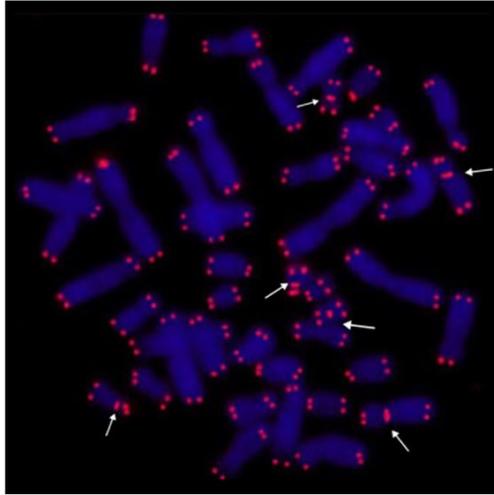


Figura 4.4. Fotografía de una célula en metafase de una línea celular derivada de piel de conejo doméstico, obtenida mediante microscopía de fluorescencia luego de aplicar la técnica de FISH con sonda pantelomérica de tipo PNA. Se observan en color rojo las señales teloméricas, tanto terminales (se observan las características 4 señales por cromosoma, 2 por cada extremo) como intersticiales (señaladas con flechas). Fuente: Alejandro Bolzán.

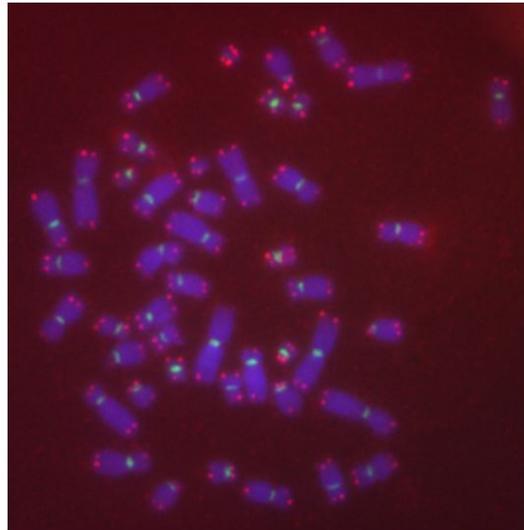


Figura 4.5. Fotografía de una célula en metafase de una línea celular derivada de linfocitos humanos, obtenida mediante microscopía de fluorescencia luego de aplicar la técnica de FISH con sondas pantelomérica (señal roja) y pancentromérica (señal verde) de tipo PNA. En este caso, no existen cromosomas con STI. Nótese que al utilizar los dos tipos de sondas, la identificación de cada cromosoma es mucho más precisa que en caso de utilizar solamente la sonda pantelomérica. Fuente: Alejandro Bolzán.

Detección de secuencias teloméricas en los cromosomas de vertebrados y su utilidad para evaluar el daño cromosómico inducido por un mutágeno

Si bien es posible estudiar a los telómeros utilizando la llamada “técnica de bandeo T”, ésta provee información limitada acerca de los reordenamientos cromosómicos que involucran a los telómeros, ya que no permite obtener información precisa a nivel molecular (es decir, sobre el ADN telomérico y en particular sobre la distribución de las secuencias teloméricas en los cromosomas). Hoy en día, a partir de los avances producidos en lo que se

denomina “citogenética molecular” (el estudio de los cromosomas y sus anomalías utilizando secuencias de ADN marcadas con un colorante fluorescente), el estudio citogenético de los telómeros y sus aberraciones se lleva a cabo por FISH. En este caso, se trata de una sonda con la secuencia de ADN complementaria a la de los telómeros que, si bien varía en los distintos grupos, en todos los vertebrados consiste en el hexanucleótido TTAGGG repetido n veces. De este modo, mediante el uso de una sonda telomérica marcada con un colorante fluorescente, es posible identificar la ubicación precisa en cada cromosoma, de las secuencias de ADN que forman parte del telómero (recordemos que el telómero es una estructura que contiene además proteínas y ARN). La sonda que se utiliza para estudiar a los telómeros, se denomina generalmente “pantelomérica” (del griego, *pan* = todo), pues permite identificar simultáneamente a todos los telómeros de los cromosomas de una célula. Obviamente, la misma sonda puede ser utilizada para detectar a las STI que puedan estar presentes en la metafase en cuestión, dado que la secuencia de bases, tanto para el caso de los verdaderos telómeros como de las STI, es la misma. Es importante señalar que las sondas comerciales que habitualmente son identificadas como teloméricas o telómero-específicas, son en realidad sondas que hibridan con regiones subteloméricas de cromosomas específicos, pero no con el ADN telomérico. Las sondas PNA son de elección para estudiar a los telómeros y las STI, no solamente por su eficiencia de hibridación, sino también porque su emisión es directamente proporcional al número de repetidos teloméricos presentes, lo cual permite determinar la longitud telomérica o el tamaño de las regiones ricas en STI de los cromosomas bajo estudio. Esta variante de la técnica de FISH se denomina Q-FISH (por *Quantitative FISH*) o FISH cuantitativo.

Los estudios de las aberraciones que involucran a los telómeros y STI se llevan a cabo en la etapa de metafase, es decir, cuando los cromosomas se hallan en su máximo grado de condensación y son por ello fácilmente visibles e identificables. Una vez aplicada la técnica de FISH con sonda pantelomérica, cada cromosoma presenta normalmente cuatro señales fluorescentes (Figuras 4.4 y 4.5), correspondientes cada una al telómero -más precisamente al bloque o agrupamiento de secuencias repetidas de ADN telomérico- de cada cromátida y brazo cromosómico.

Cuando un agente mutagénico (físico, químico o biológico) produce daño cromosómico, los telómeros y las STI -si las hubiera- pueden verse afectados, lo cual queda expresado en diferentes tipos de aberraciones cromosómicas. En el caso particular de los telómeros, se denomina “inestabilidad telomérica” a la inestabilidad cromosómica producida ya sea por la pérdida de extremos cromosómicos (uno o ambos) o por la disfunción (mal funcionamiento) de los telómeros. En efecto, la inestabilidad telomérica puede surgir cuando un cromosoma, debido a una ruptura en uno o ambos extremos, pierde uno o ambos telómeros (es decir, se vuelve un “cromosoma incompleto”) (Figura 4.6A) y, por lo tanto, los extremos del cromosoma “cortado” o roto quedan expuestos a la acción de enzimas que pueden degradarlos o tienden a fusionarse con los extremos de otro cromosoma. En este caso, hablamos de inestabilidad telomérica por pérdida de telómeros o extremos cromosómicos.

Alternativamente, puede suceder que uno o ambos telómeros del cromosoma en cuestión se acorten en exceso (más allá del acortamiento natural de los telómeros que ocurre habitualmente en las células somáticas a lo largo del tiempo), lo cual predispone a los cromosomas a fusionarse o asociarse entre sí. Esto puede afectar a cualquiera de los cuatro telómeros de un cromosoma en metafase, dando lugar a cromosomas con fragmentación (duplicación) o pérdida de señales teloméricas (cada señal de FISH representa un bloque o conjunto específico de secuencias teloméricas) (Figuras 4.6F y 4.6G). También puede darse el caso de que se altere o pierda alguna de las proteínas teloméricas o el ARN telomérico. En estos casos hablamos de inestabilidad telomérica por disfunción del telómero, pues el mismo, si bien presente, ha perdido su función protectora, ya sea por acortamiento excesivo (proceso llamado “erosión telomérica”) o por pérdida o alteración de sus proteínas o del ARN asociado al ADN telomérico. Este fenómeno puede ser estudiado a nivel citogenético mediante FISH y resulta visible a través de aberraciones cromosómicas tales como fusiones teloméricas, asociaciones teloméricas o la pérdida o duplicación de señal telomérica (Figs. 4.6B, F y G).

Dependiendo entonces del efecto que un determinado mutágeno pueda tener sobre los cromosomas, aparecen distintos tipos de aberraciones estructurales a nivel telomérico (Tabla 4.1 y Figura 4.6). Asimismo, la disminución de la longitud telomérica puede estar asociada al aumento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas numéricas. Entre las aberraciones estructurales que involucran a los telómeros se destacan los cromosomas incompletos (es decir, que han perdido uno o ambos extremos) (Figura 4.6A), los fragmentos acéntricos (sin centrómero) en sus distintas variantes (terminal, intersticial o compuesto) (Figuras 4.6C, D y E), las asociaciones o fusiones teloméricas y la amplificación o translocación de secuencias teloméricas (Figuras 4.6B, H e I). De este modo, mediante el estudio citogenético de los telómeros, es posible determinar si las células bajo estudio presentan sus telómeros funcionalmente estables o inestables (ya sea por pérdida o disfunción). Asimismo, es posible determinar si las células presentan STI, lo cual aporta información adicional sobre los posibles reordenamientos cromosómicos presentes en la célula y sus mecanismos de formación (mayormente fusiones o fisiones cromosómicas). Obviamente, la determinación de las aberraciones que involucran a los telómeros es más precisa si se utiliza además una sonda pancentromérica, pues esto permite identificar con precisión si estamos en presencia de un cromosoma (ya sea con uno o más centrómeros) o de un fragmento cromosómico (acéntrico, es decir, sin centrómero). En cuanto a las aberraciones cromosómicas que involucran a las STI, podemos encontrar translocación (Figura 4.6I), amplificación (Figura 4.6H), pérdida o fragmentación de los bloques ricos en dichas secuencias.

Tabla 4.1: Listado de los distintos tipos de aberraciones cromosómicas que involucran a los telómeros y secuencias teloméricas intersticiales (STI)

1) Aberraciones que involucran directamente a los extremos cromosómicos y, como consecuencia de ello, a las secuencias teloméricas terminales. Involucran la pérdida de uno o más telómeros, como consecuencia de rupturas cromosómicas a nivel de los extremos cromosómicos.

-Cromosomas incompletos (cromosomas que pierden uno o ambos extremos).

-Fragmentos acéntricos terminales (es decir, que derivan de rupturas en los extremos del cromosoma). Estos fragmentos pueden unirse y formar un fragmento combinado o compuesto. Asimismo, existen fragmentos acéntricos derivados de dos rupturas a nivel de la región intersticial de los cromosomas, por lo cual carecen de telómeros y son denominados intersticiales.

-Cromosomas dicéntricos o multicéntricos (con más de dos centrómeros) que han perdido uno o ambos extremos.

2) Aberraciones cromosómicas que involucran directamente a las secuencias teloméricas terminales o propiamente dichas e implican disfunción telomérica. No hay involucrado un evento de ruptura cromosómica.

-Pérdida o multiplicación (generalmente por duplicado o triplicado) de uno o más telómeros (entendiendo como tal al grupo de secuencias de ADN telomérico del cromosoma, el cual se identifica citogenéticamente mediante FISH como una señal fluorescente) del cromosoma.

-Asociación telomérica (señales de FISH muy juntas, pero no unidas; se observan entonces cuatro señales de FISH en el sitio de la asociación).

-Fusión telomérica (con o sin señales de FISH en el sitio de fusión o unión de los cromosomas).

-Intercambios de cromátidas hermanas a nivel telomérico (lo que indica un evento de recombinación a nivel telomérico).

-Translocación de secuencias teloméricas terminales.

-Amplificación de secuencias teloméricas terminales.

3) Aberraciones cromosómicas que involucran a las secuencias teloméricas intersticiales (STI).

-Translocación o cambio de posición de STI.

-Amplificación o incremento en el número o en el tamaño del bloque de STI.

-Pérdida de STI.

-Fragmento intersticial (derivado de rupturas a nivel de la región centromérica o pericentromérica de un cromosoma que contiene uno o más bloques de STI).

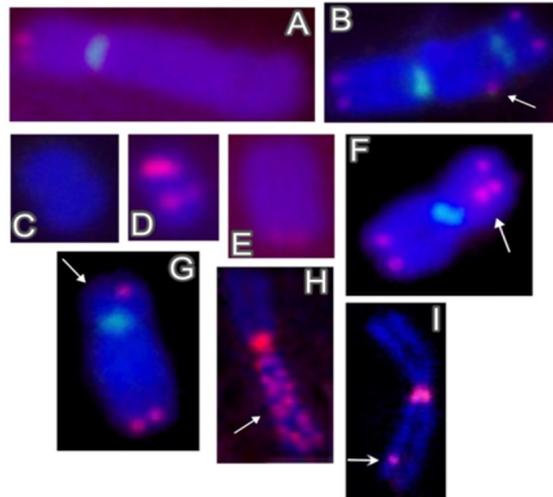


Figura 4.6. Ejemplos de aberraciones cromosómicas que involucran a los telómeros y STI: A-G, cromosomas humanos; H e I, cromosomas de hámster chino, con STI pericentroméricas. **A.** Cromosoma incompleto; **B.** Fusión telomérica (cromosoma dicéntrico) con una sola señal intersticial; **C.** Fragmento acéntrico terminal; **D.** Fragmento acéntrico compuesto; **E.** Fragmento acéntrico terminal; **F.** Duplicación de señal telomérica; **G.** Pérdida de señal telomérica; **H.** Amplificación de secuencias teloméricas intersticiales; **I.** Translocación de secuencias teloméricas intersticiales. Fotografías obtenidas mediante microscopía de fluorescencia luego de aplicar la técnica de FISH con sondas pantelomérica (señal roja) y/o pancentromérica (señal verde) de tipo PNA. Las flechas blancas señalan el sitio o región del cromosoma donde se produjo la aberración. Fuente: Alejandro Bolzán.

Aplicabilidad de la técnica de FISH con sonda pantelomérica: conclusiones

Como vemos, entonces, la aplicación de la técnica de FISH con sonda pantelomérica en extendidos cromosómicos permite no sólo detectar a los telómeros y las STI, sino también determinar si una célula presenta o no inestabilidad telomérica y si la misma es debida a ruptura del cromosoma o a disfunción del telómero. Asimismo, si la sonda es de tipo PNA, se puede determinar la longitud telomérica o el tamaño de las regiones ricas en STI, según corresponda.

En conclusión, el estudio citogenético de los telómeros mediante la técnica de FISH permite determinar con mayor precisión que las técnicas citogenéticas convencionales el daño inducido a nivel cromosómico por un mutágeno dado (mediante la identificación de las aberraciones cromosómicas listadas en la Tabla 4.1) y si un agente mutagénico induce inestabilidad telomérica, ya sea por pérdida de extremos cromosómicos o por disfunción telomérica.

Por otra parte, las STI juegan un rol importante en la inestabilidad genómica y la evolución cromosómica, especialmente en los vertebrados, dada su relación con reordenamientos cromosómicos y sitios frágiles. Así, por ejemplo, en nuestro país se han llevado a cabo estudios sobre distribución de secuencias teloméricas y evolución cromosómica en roedores, armadillos, monos del nuevo mundo y tortugas. A lo anterior, cabe agregar el estudio realizado en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires sobre distribución de secuencias teloméricas en los cromosomas de escorpiones. Dichos estudios han permitido establecer nuevas conclusiones respecto de la evolución cariotípica de las especies estudia-

das. De este modo, la técnica de FISH con sonda pantelomérica puede también utilizarse para estudiar la evolución cariotípica de diversas especies.

Caracterización citogenética en primates en cautiverio

Aspectos generales

Otra aplicación de la Citogenética es su rol fundamental en la conservación de la biodiversidad. La Biología de la Conservación es una actividad multidisciplinaria, que aplica los principios básicos de la Ecología, Sistemática, Biogeografía y Genética junto con los de otras disciplinas no biológicas, como la Economía, Sociología, Antropología y la Filosofía, con el objetivo de mantener la diversidad biológica en el planeta. Estudia las especies, comunidades y ecosistemas directa o indirectamente perturbados por la actividad humana. Permite comprender los procesos que mantienen la diversidad biológica y ayuda a definir las formas de preservarla.

La conservación de las especies es una tarea desafiante debido a las constantes amenazas a la biodiversidad, tales como el deterioro de sus hábitats naturales por la acción antrópica o la caza para el tráfico de fauna. A pesar de que la “Conservación *in-situ*” (entendida como el proceso de proteger una especie en su hábitat natural) es la forma más efectiva, para ciertas especies amenazadas los programas de reproducción en cautiverio pueden ser un componente importante en el marco de un plan más abarcativo para su conservación. El mantenimiento de especies en cautiverio en zoológicos, acuarios y jardines botánicos se conoce como “Conservación *ex-situ*”. El rol de los zoológicos, centros de cría y acuarios ha cambiado en los últimos años de colecciones de plantas y animales a instituciones modernas que contribuyen activamente a la conservación, investigación científica y educación pública.

Un requisito básico para proyectar programas de manejo de fauna es contar con información taxonómica de los ejemplares, tanto si se trata de animales en cautiverio o en estado silvestre. Con los ejemplares correctamente identificados taxonómicamente, es posible armar grupos en los distintos ambientes o recintos que sean representativos de las poblaciones naturales y su diversidad. Así se contará con miembros que se podrán reproducir entre sí y a su vez, la colonia podrá sostenerse en el tiempo. Asimismo, si el objetivo es el manejo para la conservación de una dada especie, la importancia de la caracterización taxonómica radica en evitar la ocurrencia de individuos híbridos dentro de la comunidad reproductiva o de exhibición.

Por reunir especímenes de intercambio interinstitucional o proveniente de decomisos, en los zoológicos y centros de cría la procedencia geográfica de los mismos es, en general, desconocida y generalmente se recurre a caracteres fenotípicos de tipo morfométrico para la diagnosis sistemática de los ejemplares. Tradicionalmente, la identificación de ejempla-

res nuevos en ambientes de cautiverio se ha realizado a partir de características del fenotipo externo como el patrón de coloración (de plumas, placas, pelaje, escamas), tamaño corporal o fórmula dentaria, entre otras. Sin embargo, la gran variedad de fenotipos y edades, así como el estado de salud en que los especímenes llegan a la institución, en muchas oportunidades puede generar confusiones en la diagnosis.

En estos centros, cobra otro valor la caracterización genética de los ejemplares en cautiverio, ya que favorece el éxito de los cruzamientos dirigidos al seleccionar ejemplares, tanto para ampliar las colonias de cautiverio como para su correcto mantenimiento, evitando la depresión por endogamia/exogamia posible ante el desconocimiento de los parentales, potencialmente polimórficos, como es tan frecuente en especies naturales. El análisis genético permite corroborar la identificación taxonómica, complementando la información con la descripción fenotípica suministrada por el Médico Veterinario. En este contexto, el cariotipo constituye una variable a considerar para el adecuado manejo de especies en planes de conservación contribuyendo a corroborar el estatus taxonómico de los ejemplares.

Los primates constituyen una importante proporción de los ejemplares en cautiverio, ya sea en zoológicos para su exhibición, como en centros de investigación biomédica. Son un grupo de mamíferos notablemente heterogéneo tanto por su diversidad fenotípica como por su distribución geográfica y hábitos. Las formas actuales del Orden Primates que comprenden dos subórdenes, Strepsirrhini, (que incluye a los lemúridos, quirogaleidos, lorísidos, aye-ayes, índridos y gálagos), y los Haplorrhini, que agrupa a los Tarsiformes, a los Primates del Nuevo Mundo (Platyrrhini) y a los Primates del Viejo Mundo (Catarrhini), incluyendo en este último grupo a los Hominoidea. Esta heterogeneidad encuentra su correlato a nivel cariológico. En primates no humanos se ha observado una amplia diversidad cromosómica, con números diploides ($2n$) que van desde $2n=16$ en el mono tití negro *Callicebus lugens* hasta $2n=80$ en el tarsero de Horsfield, *Tarsius bancanus*. La inmensa variedad de cariotipos ya descritos provee importante evidencia acerca del posible papel que desempeñarían los rearrreglos cromosómicos en los cambios evolutivos experimentados por los primates hasta llegar a las formas actuales hoy en análisis.

A continuación, brindaremos algunos ejemplos de cómo la Citogenética colabora en el manejo de estos primates en zoológicos y centros de cría.

El caso del género *Saimiri*

Un género de Primates Neotropicales frecuentemente encontrado en zoológicos son los monos ardilla, *Saimiri sp.* Si bien esta especie no llega en su distribución a nuestro país, es la frecuentemente encontrada en zoológicos argentinos debido a su relativa abundancia en hábitats naturales, su facilidad de manejo y al creciente tráfico de esta especie con fines comerciales.

Dentro del género se distinguen dos tipos morfológicos basados en diferencias en el parche circumocular (Figura 4.7A): el tipo Gótico (Grupo *Saimiri sciureus*) y el tipo Romano (Grupo

Saimiri boliviensis). Ambos patrones faciales mostraron diferencias no sólo morfológicas, sino también comportamentales. Esta distinción es dificultosa para el ojo inexperto, sobre todo en el caso de los animales que llegan a los zoológicos en muy mal estado de salud, y puede ser ambigua en híbridos y animales producto de retrocruza.

Todas las especies de este género poseen un número diploide de 44 cromosomas, difiriendo sus cariotipos por distintas inversiones pericéntricas que causan variaciones en la relación cromosomas unbraquiados (acrocéntricos) / bibraquiados (metacéntricos y submetacéntricos).

Se divide el cariotipo de *Saimiri sp.* en tres grupos de autosomas y el par sexual XY

- Cromosomas metacéntricos (pares A1 a A5)
- Cromosomas submetacéntricos (pares B1 a B11)
- Cromosomas acrocéntricos (pares C1 a C7)

Esta forma de ordenar el cariotipo permite diferenciar a simple vista los cariotipos de las distintas especies. De acuerdo con este ordenamiento, los pares cromosómicos involucrados en las inversiones serían los pares B5/C1 y B10/C2. El par B5 se originaría por una inversión pericéntrica en el par C1 (Figura 4.7B). El par B10 se originaría de la misma manera por una inversión pericéntrica en el par C2.

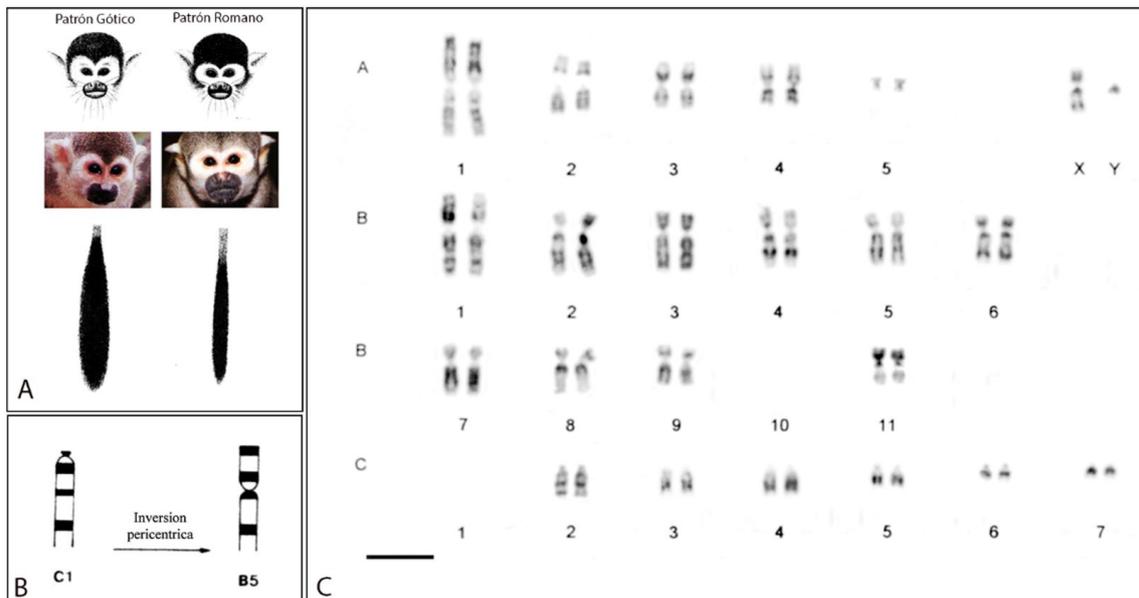


Figura 4.7. A. Patrones del arco facial en los tipos Gótico y Romano y diferencias en el extremo de la cola. Modificado de Hershkovitz (1984), con fotografías color de Rowe (1996). B. Inversión pericéntrica involucrada en el cambio cromosómico C1 a B5 (Modificada de García et al. (1979); C. Metafase con bandas G de *Saimiri boliviensis boliviensis* $2n = 44$, XY. Esta especie posee 6 pares cromosómicos acrocéntricos y 15 pares cromosómicos metacéntricos/submetacéntricos y su cariotipo posee los pares cromosómicos B5 y C2 pero carece de los pares B10 y C1 (nótese los espacios en blanco en el cariotipo) que sí están en otras especies, tales como *S. sciureus sciureus*. Barra = 10 μm. Fuente: Eliana R. Steinberg.

De esta forma para los *Saimiri sp.* que presentan el patrón facial gótico se han registrado, por ejemplo, en *S. s. sciureus* 7 pares cromosómicos unibraquiados y 14 bibraquiados y para el patrón facial romano se han registrado para *S. b. boliviensis* 6 pares unibraquiados y 15 pares bibraquiados. En el ejemplo de la figura 4.7C, *S. b. boliviensis* posee 6 pares cromosómicos acrocéntricos y 15 pares cromosómicos metacéntricos/submetacéntricos y su cariotipo posee los pares cromosómicos B5 y C2 pero carece de los pares B10 y C1 (nótese los espacios en blanco en el cariotipo armado) que sí están en otras especies, tales como *S. sciureus sciureus*.

Estas inversiones pericéntricas, al ser la causa de las diferencias en el cariotipo de las distintas especies, permiten reconocer la posible existencia de híbridos, tanto en la naturaleza como en cautiverio. El manejo genético de los ejemplares es de vital importancia para el éxito a largo plazo de los programas de conservación *ex-situ* de esta especie. El establecimiento de colonias mixtas lleva consigo el riesgo de disminución del éxito reproductivo de los ejemplares híbridos, así como el riesgo de depresión por endogamia si no se selecciona adecuadamente a los parentales. Por otro lado, se ha reportado la aparición de híbridos naturales entre *S. s. macrodon* y *S. b. peruviansis* en Pucallpa, Perú, los cuales poseen 11 cromosomas acrocéntricos. En este marco, cobra otro valor la caracterización cariotípica de todas las especies del género, que luego de este análisis, pone en evidencia la necesidad de considerar todos los polimorfismos para así identificar correctamente la procedencia y origen de híbridos tanto de vida silvestre como de cautiverio.

Sistemas cromosómicos de determinación sexual y estudios meióticos

En el orden Primates, el sistema de determinación sexual más frecuentemente observado es el XX/XY. Sin embargo, como modificaciones a este sistema ancestral, encontramos translocaciones Y-autosoma que generan lo que se denomina sistemas cromosómicos de determinación sexual múltiple o sistemas sexuales múltiples (Figura 4.8A).

Estos sistemas sexuales múltiples se han verificado en diversos géneros de Primates Neotropicales. Los monos aulladores, género *Alouatta sp.*, constituyen un interesante ejemplo dado que se han descrito sistemas sexuales múltiples en los machos de tipo: 1) $X_1X_2X_3Y_1Y_2$ (observándose en Meiosis I una cadena de 5 elementos o pentavalente) en *A. guariba clamitans* (Figura 4.8B), 2) $X_1X_2Y_1Y_2$ (observándose en Meiosis I una cadena de 4 elementos o cuadrivalente) en las especies *A. seniculus*, *A. caraya* and *A. pigra* ; 3) X_1X_2Y (que forma una cadena de 3 elementos o trivalente en Meiosis I) en *A. belzebul* y *A. palliata* (Figura. 4.8C).

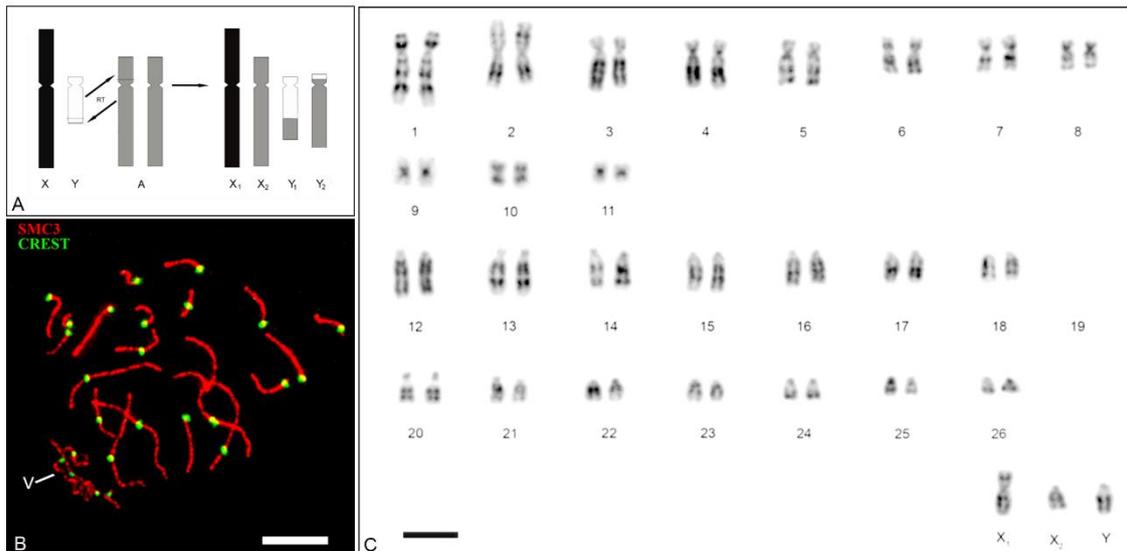


Figura 4.8. **A.** Posible origen para un sistema de determinación sexual múltiple $X_1X_2Y_1Y_2$ a partir de una translocación recíproca Y-autosoma (RT). El X ancestral se muestra de color negro, el cromosoma Y ancestral blanco y el par autosómico involucrado se muestra de color gris oscuro. A partir de un sistema de tipo XY, roturas simultáneas en A_{prox} y en la región distal de Yq , seguido de una translocación recíproca entre ellos, habría dado lugar a los cromosomas Y_1 e Y_2 . El cromosoma homólogo del par A que no estuvo involucrado en la translocación constituiría el cromosoma X_2 y el X ancestral se denominaría ahora X_1 ; **B.** Inmunodetección en un espermatocito en Paquitene de *Alouatta guariba clamitans* mostrando la presencia de 5 centrómeros en el multivalente sexual. Los ejes del complejo sinaptonémico están marcados en rojo (SMC3) y los centrómeros en verde (CREST). La línea indica en pentavalente sexual (V) donde se observan 5 señales centroméricas. Barra = 10 μm ; **C.** Metafase con bandas G de un macho de *A. palliata* $2n = 53$, X_1X_2Y . Se observa el sistema sexual de tipo trivalente X_1X_2Y , formado por una translocación entre el par cromosómico 19 y el cromosoma Y. Barra = 10 μm . Fuente: Eliana R. Steinberg.

Dada esta diversidad, el patrón de determinación sexual constituiría un carácter con valor sistemático en los Primates y en particular en los Primates Neotropicales. Con el fin de caracterizar estos sistemas, los estudios mitóticos han sido ampliamente utilizados en décadas pasadas. Sin embargo, los datos meióticos son los que permiten confirmar la cariología e identificar inequívocamente el sistema de determinación sexual. Fue así como los estudios mitóticos realizados en el mono aullador negro y dorado, *A. caraya*, utilizando técnicas de bandas cromosómicas (bandas G) indicaron que esta especie tenía un $2n=52$ y un sistema cromosómico sexual del tipo XX/XY, mientras que posteriores estudios meióticos (análisis de espermatocitos en Metafase I, observación de quiasmas, tinciones de complejo sinaptonémico bajo microscopía óptica y electrónica para estudio de sinapsis y recombinación) mostraron que esta especie poseía un cariotipo con $2n=52$ y un sistema sexual de tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y_1Y_2$, identificándose así el correcto sistema sexual de esta especie.

En este contexto, la caracterización meiótica en Primates Neotropicales es de gran utilidad en planes de conservación o de reproducción en cautiverio, dado que permite diagnosticar la normalidad o la alteración en los cromosomas sexuales y el patrón de determinación sexual de cada individuo (XX/XY o sistema sexual múltiple). Asimismo, permite analizar posibles irregularidades en el proceso meiótico que pueden interferir en la fertilidad de los individuos. Estos aspectos son de sumo interés en el manejo y armado de los grupos, en particular ante la posible presencia de híbridos. En el caso de *Alouatta* se ha descrito en vida silvestre tropas compuestas por individuos de *A. caraya* y *A. guariba clamitans*, observándose individuos con patrón

de coloración de pelaje intermedio entre ambas especies, hibridación que recientemente fuera confirmada mediante estudios genéticos. Estos estudios genéticos confirmaron la hibridación entre el mono aullador negro y dorado (*A. caraya*), que posee un número diploide $2n=52$ en ambos sexos y un sistema sexual en machos de tipo cuadrivalente $X_1X_2Y_1Y_2$, y el mono aullador marrón (*A. guariba clamitans*), que posee un sistema sexual múltiple de tipo pentavalente $X_1X_2X_3Y_1Y_2$ en los machos y distintos números diploides en cada sexo ($2n=46$ en las hembras, y $2n=45$ en los machos). La posible ocurrencia de hibridación entre dos especies cariológicamente tan diferentes, no sólo a nivel del complemento autosómico sino también a nivel de su sistema sexual, enfatiza la importancia de los estudios citogenéticos para la mejor comprensión de la sistemática y taxonomía de los Platyrrhini, al igual que en su manejo tanto en cautiverio como en vida silvestre y, en un marco más amplio aún, su conservación como parte del patrimonio de la biodiversidad de la región.

Referencias

- Bolzán, A. D. (2012). Chromosomal aberrations involving telomeres and interstitial telomeric sequences. *Mutagenesis*, 27, 1-15.
- Bolzán, A. D. (2017). Interstitial telomeric sequences in vertebrate chromosomes: Origin, function, instability and evolution. *Mutation Research*, 773, 51-65.
- Conde, D. A., Flesness, N., Colchero, F., Jones, O. R., Scheuerlein, A. (2011). An emerging role of zoos to conserve biodiversity. *Science*, 331(6023), 1390-1391.
- Fourastié, M. F., Gottlieb, A., Poggio, L., González, G. E. (2017). Are cytological parameters of maize landraces (*Zea mays* ssp. *mays*) adapted along an altitudinal cline?. *Journal of Plant Research*, 131(2), 285-296.
- Gomes, N. M., Shay, J. W., Wright, W. E. (2010). Telomere biology in Metazoa. *FEBS Letters*, 584, 3741-3751.
- González, G. E., Fourastié, M. F., Poggio, L. (2013) Número y composición de secuencias de los knobs (DAPI-FISH) y su utilidad en la caracterización de accesiones de maíz y teocintle. *Revista de Fitotecnia Mexicana*, 36, 127-135.
- González, G. E., Poggio, L. (2015) Genomic affinities revealed by GISH suggest intergenomic restructuring between parental genomes of the paleopolyploid genus *Zea*. *Genome*, 58, 433-439.
- Groves, C. P. (2001) *Primate Taxonomy* (pp. 350). Washington y Londres: Smithsonian Institution Press.
- Meyne, J., Baker, R. J., Hobart, H. H., Hsu, T. C., Ryder, O. A., Ward, O. G., Wiley, J. E., Wurster-Hill, D. H., Yates, T. L., Moyzis, R. K. (1990) Distribution of nontelomeric sites of (TTAGGG) $_n$ telomeric sequences in vertebrate chromosomes. *Chromosoma*, 99, 3-10.
- Mourthe, I., Trindade, R. A., Aguiar, L. M., Trigo, T. C., Bicca-Marques, J. C., Bonatto, S. L. (2018) Hybridization between Neotropical primates with contrasting sexual dichromatism. *International Journal of Primatology*, 40, 99-113.

- Mudry, M. D., Nieves, M., Steinberg, E. R. (2015) Cytogenetics of howler monkeys. En *Howler Monkeys: Adaptive Radiation, Systematics, and Morphology* (pp. 85-105) En Ed. M. Kowalewski, P. Garber, L. Cortés Ortiz, B. Urbani, D. Youlatos. Alemania. Berlín: Springer Verlag.
- Poggio, L., González, G. E., Confalonieri, V., Comas, C., Naranjo, C. A. (2005) The genome organization and diversification of maize and its allied species revisited: evidences from classical and FISH-GISH cytogenetics analysis. *Cytogenetics and Genome Research*, 109, 259-267.
- Potter, S. A. B., Deakin, J. E. (2018) Cytogenetics: an important inclusion in the conservation genetics toolbox. *Pacific Conservation Biology*, 24(3), 280-288.
- Realini, M. F., Poggio, L., Cámara-Hernández, J. A., González, G. E. (2018). Exploring karyotype diversity of Argentinian Guarani maize landraces: relationships among South American maize. *PLoS ONE*, 13(6), e0198398.
- Shay, J. W., Wright, W. E. (2019) Telomeres and telomerase: three decades of progress. *Nature Reviews Genetics*, 20, 299-309.
- Steinberg, E. R., Nieves, M., Fantini, L., Mudry, M. D. (2014) Primates karyological diagnosis and management programs applications. *Journal of Medical Primatology*, 43, 455-467.
- Vanderberg, J. L., Williams-Blangero, S., Moore, C. M., Cheng, M., Abee, C. R. (1990) Genetic relationships among three squirrel monkey types: Implications for taxonomy, biomedical research and captive breeding. *American Journal of Primatology*, 22, 101-111.