Universidad Austral de Chile
Facultad de Ciencias
Escuela de Licenciatura en Ciencias Biológicas

Profesor Patrocinante:
Dr. Milton Gallardo N.
Instituto de Ecología y Evolución
Universidad Austral de Chile

Profesor Co-patrocinante:
Dr. Jaime Figueroa V.
Instituto de Bioquímica
Universidad Austral de Chile

Caracterización de secuencias génicas de *Tympanoctomys barrerae,* primera especie Tetraploide descrita en Mamíferos

Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar al grado de Licenciado en Ciencias Biológicas

Luis Alejandro Jiménez Montecinos
Valdivia Chile 2003

Agradecimientos

Deseo expresar mi reconocimiento a las personas e instituciones que hicieron posible la realización de la presente tesis:

- A mi profesor patrocinante Dr. Milton Gallardo N, por su constante apoyo y por enseñarme a hacer ciencia.

- A mi profesor co-patrocinante Dr. Jaime Figueroa por su generosidad y ayuda, y por permitirme trabajar en el Laboratorio de Biología Molecular de Peces del Instituto de Bioquímica de la Universidad Austral de Chile.

- A mi profesora informante Dra. Gudrun Kausel, por la *Deutsche Schule*, su paciencia e incondicional apoyo.

- Al Dr. Germán Reinhardt, por su constante colaboración en mi tesis y al permitirme trabajar en el Laboratorio de Virología del Instituto de Microbiología de la Universidad Austral de Chile.

- A mis compañeros y amigos de laboratorio: Marco Paredes, Rodrigo Montefusco, Rene Vidal, Andrea Hidalgo y en forma especial al Sr. Fredy Mondaca por compartir sus conocimientos y experiencias de laboratorio.

- A la entidad gubernamental CONICYT, por financiar mi tesis por intermedio del proyecto: Análisis del origen y aspectos morfofuncionales del genoma de la primera especie tetraploide descrita en mamíferos (*T. barrerae*, Rodentia, Octodontidae), otorgado al Dr. Milton Gallardo.

- A mis padres y abuelos por su constante cariño, preocupación y ayuda financiera.

- A la Fundación Cristo Joven por acogerme en el hogar universitario Obispo Romero durante mis años de estudio y en forma muy especial a mis amigos de Beauchef por la siempre y oportuna cerveza.

- A los profesores Mg. Cs. Pedro Ojeda y Dr. Carlos Ramírez por iniciarme en el camino de la ciencia.

- A mi amiga y polola Elsy, por su constante cariño y amor.

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS..... i
INDICE GENERAL..... ii
INDICE DE FIGURAS..... iii
RESUMEN..... v
SUMMARY..... vi
1. INTRODUCION…….. 1
2. MATERIALES Y METODOS..... 5
2.1 Obtención de muestras y animales de experimentación..... 5
2.2 Diseño de partidores..... 5
2.3 Obtención de ADN..... 6
2.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)..... 6
2.5 Clonación de los productos de amplificación..... 7
2.6 Preparación de sondas y ensayos de Southern Blot..... 9
2.7 PCR *in situ* y preparación de los controles..... 11
2.8 Análisis estadístico de los datos..... 13
3. RESULTADOS..... 14
3.1 PCR *in situ*…….. 18
3.2 Análisis estadístico de los datos..... 21
3.3 Análisis del ADN genómico por ensayos de Southern blot..... 24
4. DISCUSIÓN..... 29
5. CONCLUSIONES..... 36
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 37
ANEXO I..... 47
ANEXO II..... 51
ANEXO III..... 52
ANEXO IV..... 53
ANEXO V..... 54
ANEXO VI..... 55

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: receptor de andrógeno AR, marcador cromosoma X..... 16

Figura 2: Factor de crecimiento nervioso Egr1, marcador autosómico..... 17

Figura 3: Controles negativos de PCR *in situ* en *T. barrerae* sin partidor (A) y sin *Taq* DNA polimerasa (B)..... 18

Figura 4: PCR *in situ* del gen autosómico *Egr*1 en núcleos interfásicos de machos *T. barrerae* (A) y *M. musculus* (B)..... 19

Figura 5: PCR *in situ* del gen autosómico *Egr*1 en núcleos interfásicos de hembras *T. barrerae* (A) y *M. musculus* (B)..... 19

Figura 6: PCR *in situ* del gen AR en núcleos interfásicos de machos *T. barrerae (A)* y *M. musculus* (B)..... 20

Figura 7: PCR *in situ* del gen AR en núcleos interfásicos de hembras *T. barrerae* (A) y *M. musculus* (B)..... 20

Figura 8: Distribución de señales del gen *Egr*1 en núcleos de machos *M. musculus* y *T. barrerae*, respectivamente..... 21

Figura 9: Distribución de señales del gen AR en núcleos de hembras *M. musculus* y *T. barrerae,* respectivamente..... 22

Figura 10: Distribución de señales del gen AR en núcleos de machos *M. musculus* y *T. barrerae,* respectivamente..... 23

Figura 11: Southern blot de ADN genómico digerido con *Eco*RI e hibridado con *Ty-AR*$_{145}$..... 25

Figura 12: Southern blot de ADN genómico digerido con *Hind*III e hibridado con *Ty-AR*$_{145.}$ 26

Figura 13: Southern blot de ADN genómico digerido con *Bam*HI e hibridado con *Ty-AR*$_{145.}$..... 27

Figura 14: Southern blot de ADN genómico digerido con *Pst*1 e hibridado con *Ty-AR*$_{145}$..... 28

RESUMEN

Tympanoctomys barrerae es un octodóntido endémico del ecosistema central oeste de Argentina que tiene el número de cromosomas más alto entre los mamíferos (4n=102), y un tamaño del genoma (16,8 pg ADN) que duplica al de todos sus congéneres. Basándose en su extraordinaria similitud alozímica con *Octomys mimax* (2n=56), se postuló tetraploidización como alternativa citogenética para explicar su extraodinaria divergencia cromosómica, la morfología metacéntrica de su cariotipo y la peculiar distribución de su heterocromatina.

Para poner a prueba la condición tetraploide de *T. barrerae* se investigaron genes de copia única, altamente conservados. Se diseñaron partidores a partir de un alineamiento múltiple de secuencias consenso. Los genes escogidos fueron el gen *Egr*1 como marcador autosómico y el gen *AR*, como marcador del cromosoma X. Se realizó la técnica de PCR *in situ* utilizando núcleos interfásicos de médula ósea. Adicionalmente se realizaron análisis de Southern blot para corroborar los ensayos de PCR *in situ*. El ADN de *T. barrerae* se digirió con distintas enzimas de restricción y se utilizó una sonda *Ty-AR*$_{145}$, 100% homóloga que no es reconocida por las enzimas utilizadas.

Los resultados de PCR *in situ* mostraron cuatro señales del gen *Egr*1 en *T. barrerae* y dos en el control *M. musculus,* sugiriendo fuertemente una condición tetrasómica consistente con la hipótesis de tetraploidía. Adicionalmente utilizando el gen *AR*, se observaron cuatro señales en las hembras y tres en los machos, mientras que el control *M. musculus*, mostró dos señales en las hembras y sólo una en los machos. De esta manera los resultados sugieren en *T. barrerae* una condición XXXX en hembras y XXXY en machos.

Finalmente, los análisis de Southern blot utilizando la sonda *Ty-AR*$_{145}$, mostraron claramente dos bandas de hibridación en el genoma de *T. barrerae*. Esto indica la existencia de dos loci en los individuos estudiados, lo que corrobora la condición tetraploide de esta singular especie.

SUMMARY

Tympanoctomys barrerae is an endemic octodontid from the salt flats of central west Argentina. This species has the largest diploid chromosome number among mammals, and a double genome size (16.8 pg DNA) compared to its allied cofamily members. Due to the species´ allozymic similarity with *O. mimax*, (2n = 56) tetraploidy was proposed as the mechanism that could explain the extraordinary chromosomal divergence, C- banding pattern, and the metacentricity of *T. barrera´s* karyotype.

To test the tetraploid condition of *T. barrerae*, highly-conserved, single-copy genes were studied by *in situ* PCR of bone marrow-obtained, interphase nuclei. Primers for the *Egr*1 (Early growth response 1; autosomal marker) and for the *AR* (Androgen receptor; sex-linked gene) were designed from multiple alignments of consensus sequences. In addition, Southern blots were used to corroborate *in situ* PCR essays. *T. barrerae´*s DNA was digested with several restriction enzymes using the *Ty-AR*$_{145}$ probe (not recognized by the enzymes) and having 100% homology with its genomic DNA.

For discrete signals were obtained for the autosomal gene fragments *Egr*1 by the *in situ* PCR of *T. barrerae* whereas only two signals were observed in the *Mus musculus* control. These results strongly suggest a tetrasomic condition, thus supporting tetraploidy. In addition, four signals in females and three in males were obtained by the *AR* fragment in *T. barrerae* whereas only two and one were recorded in control females and males, respectively. Thus, it can be inferred an XXXX condition in females as an XXXY constitution is expected in males.

Southern blot analysis using the *Ty-AR*$_{145}$ fragment clearly indicated two hybridization bands in *T. barrerae´*s genome. This result is consistent with the expected band number observed in other tetraploid species and thus confirms the tetraploid status of this peculiar species.

1. INTRODUCCION

Las duplicaciones génicas han sido una poderosa fuerza en la evolución del genoma eucarionte (Ohta, 1994). De esta forma, organismos que normalmente son diploides pueden dar origen a formas con dos o más juegos completos de cromosomas. Este fenómeno conocido como poliploidía es común en plantas, estimándose en un 95% en los pteridofitos y 80% en las angiospermas (Masterson, 1994; Soltis y Soltis, 1995). En animales, la poliploidia es relativamente rara (Orr, 1990), y sólo en algunos subgéneros de caracoles pulmonados se considera una forma predominante de evolución (Burch y Huber, 1966; Goldman y Lo Verde, 1983; Stadler et al., 1993, 1995). Se estima, que la alta incidencia de poliploidía en plantas comparada a los animales esta asociada con un incremento en la hibridización (Otto y Whitton, 2000). Sin embargo, la relación entre frecuencia de hibridización y la incidencia de formas poliploides no ha sido investigada en detalle (Dufresne y Hebert 1994).

En vertebrados, la presencia de genes duplicados sobre diferentes cromosomas sugiere que la poliploidización habría ocurrido frecuentemente en su evolución (Ohno et al., 1968; Skrabanet y Wolfe, 1998). Estimaciones del número de genes entre artrópodos, tunicados y humanos, sugieren que el genoma de los vertebrados habría experimentado dos rondas de duplicación a lo largo de su historia evolutiva (Simmen et al., 1998; Wolfe, 2001). Estas duplicaciones habrían ocurrido tempranamente en la evolución de los cordados (Sidow, 1996; Postlethwait et al., 1998), y se ha sugerido que la hibridización interespecífica habría jugado un rol crucial en estos eventos (Spring, 1997). Estudios comparativos han mostrado además, que muchos genes que se encuentran en copia única en *Drosophila* tienen cuatro copias ortólogas en vertebrados (Sidow, 1996). Adicionalmente, en vertebrados tetrápodos, los genes del desarrollo *HOX* están dispuestos en cuatro conglomerados parálogos que han conservado incluso los patrones de expresión y colinearidad a pesar de sus diferencias morfológicas de los taxa considerados (Brooke et al., 1998; Holland et al., 1999).

En la naturaleza, la duplicación del genoma por hibridización se denomina alopoliploidía y es la forma más frecuente de formar poliploides (Soltis y Soltis, 1993, 1995, 1999; Leitch y Bennett, 1997; Wendel, 2000). Se estima que la mayor parte de anfibios y peces poliploides tienen también un origen híbrido (Dufresne y Hebert, 1994). En contraste, la duplicación del genoma a partir de una misma especie (= autopoliploidía) se considera maladaptativa y es extremadamente rara en poblaciones naturales (Soltis y Soltis, 1995; Song et al., 1995). En ambas formas de poliploidía, la formación de gametos no reducidos es la vía más probable para generar un complemento cromosómico duplicado (Pikaard, 2001).

En mamíferos, la poliploidía se considera teóricamente imposible debido a la alteración de la relación X/A (X = cromosoma X; A= autosomas), y la esterilidad de los híbridos triploides derivados del apareamiento diploide por tetraploide (Orr, 1990; Parkhurst y Meneely, 1994; Lee y Jaenisch, 1997). Sin embargo, el descubrimiento del primer mamífero tetraploide por Gallardo et al. (1999) en un roedor sudamericano ha generado interesantes preguntas al respecto. *Tympanoctomys barrerae* tiene el número cromosómico más alto entre los mamíferos (4n = 102). Todos sus cromosomas (excepto un sólo par del complemento), están constituidos por elementos bibraquiados (Contreras et al., 1990). Basándose en la extraordinaria similitud alozímica entre *Octomys mimax* (2n=56) y *T. barrerae* (4n=102) se postuló tetraploidización de este último como alternativa citogenética para explicar la extraordinaria divergencia cromosómica con sus parientes más cercanos y la morfología metacéntrica de sus elementos cromosómicos (Gallardo, 1997; Kohler et al., 2000). Según datos de calibración molecular obtenidos por hibridización de ADN, este evento de duplicación habría ocurrido hace 6,5 millones de años (Gallardo y Kirsch, 2001).

Una aproximación metodológica que sea consistente con la hipótesis de tetraploidía, requeriría encontrar la condición tetráloga de algunos genes de copia única en el genoma de *T. barrerae*. De esta manera, la Reacción en Cadena de la Polimerasa *in situ* (PCR *in situ*), constituye una valiosa herramienta citogenética que permite estimar el número de copias génicas (Ray et al., 1991; Komminoth et al., 1992; Nuovo et al., 1999). Esta factibilidad metodológica es posible de realizarse en núcleos interfásicos ya que los cromosomas ocupan territorios discretos en esa fase del ciclo

celular (Cremer, 1980; Haff y Schmid, 1991; Hochstrasser y Sedat, 1987; Manuelidis, 1990). Así, los productos de amplificación marcados por algún hapteno conocido, quedan retenidos en el tramado proteico, revelando con señales discretas el lugar preciso del gen o secuencia nucleotídica de interés particular.

El presente trabajo pretende demostrar por medio de PCR *in situ* la existencia de cuatro copias génicas en *T. barrerae* utilizando partidores que amplifiquen secuencias de copia única. Si se utiliza una especie control, las diferencias en el número y distribución de señales servirá para poner a prueba la condición tetraploide de *T. barrerae*. De esta manera se pondrán a prueba las predicciones de las siguientes hipótesis:

H_0 : Si *T. barrerae* es un mamífero diploide, los ensayos de PCR *in situ* para un gen autosómico de copia única mostrará dos señales en los núcleos interfásicos, tal como en el control (*Mus musculus*). La prueba para un gen ligado al cromosoma X mostrará dos señales en las hembras (XX) y sólo una señal en los machos (XY), tal como en el control.

H_1: Si *T. barrerae* es un mamífero tetraploide, los ensayos para un gen autosómico mostrarán cuatro señales en los núcleos interfásicos a diferencia del control que sólo mostrará dos señales. Adicionalmente, la prueba para un gen ligado al cromosoma X mostrará cuatro señales en las hembras (XXXX) y tres en los machos (XXXY), a diferencia del control que mostrará dos señales en las hembras y sólo una en los machos.

El estudio citogenético de núcleos interfásicos, requiere respaldar las observaciones con un apropiado análisis estadístico (Kibbelaar et al., 1993). Desde esta manera, si se acepta la hipótesis nula, se espera que la distribución de señales en núcleos de *T. barrerae,* no debiera diferir de la de *M. musculus.* Análogamente, si se acepta la hipótesis alternativa, el número de señales en núcleos de *T. barrerae* debiera ser mayor, y significativamente distinta a la de *M. musculus.*

Adicionalmente, los ensayos de PCR *in situ* pueden ser corroborados por medio de análisis de Southern blot (Martínez el al., 1995). Así, al utilizar un fragmento de copia única que no sea reconocido por las enzimas utilizadas se puede establecer el número de copias génicas. De esta forma se puede inferir que cada banda sobre la

autorradiografia corresponde a un sólo locus, tal como se ha descrito en peces (Mutsuro et al., 2000), plantas poliploides (Gornicki et al., 1997; Small y Wendel, 2000), y hongos (Carr y Shearer, 1998).

Finalmente, la visión actualizada de la teoría evolutiva, enfatiza la importancia de las duplicaciones genómicas en la génesis de las novedades evolutivas (Postlethwait et al., 2000). En consecuencia, si se confirma por medio de marcadores moleculares que *T. barrerae* es tetraploide se dispondría de un excelente modelo viviente para comprender mejor la dinámica evolutiva de los genomas duplicados en mamíferos.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Obtención de muestras y animales de experimentación

Los núcleos interfásicos se obtuvieron de 4 animales: *T. barrerae* (2) *y M. musculus* (2), de ambos sexos. El ADN se obtuvo de 13 animales: *T. barrerae* (8), *M. musculus* (2), *Pipanacoctomys aureus* (1), *Octomys mimax* (1) y O*ctodontomys gliroides* (1). Los ejemplares de *T. barrerae* fueron capturados en la provincia de Mendoza durante el verano del 2001 y el otoño del 2002. Los tejidos de los otros octodóntidos (*T. barrerae, P. aureus*, *O. mimax* y O. *gliroides)* fueron obtenidos de la Colección de Mamíferos del Instituto de Ecología y Evolución de la Facultad de Ciencias de la Universidad Austral de Chile.

2.2 Diseño de partidores

Se investigó la presencia de genes de copia única, altamente conservados en el genoma de distintos organismos. Las secuencias se alinearon con el programa ClustalW 1,8 (Thompson, 1994). Los partidores fueron elegidos de regiones consenso (Anexo I). La especificidad teórica de cada partidor fue probada en bancos de datos de libre acceso vía web (Smith et al.,1996; Alschul et al.,1997). Sus características físico-químicas fueron simuladas utilizando el programa OLIGO 4.01.

Los genes seleccionados para este propósito fueron:

*Egr*1: factor de crecimiento nervioso, utilizado como marcador autosómico. (sinónimos *NGFIA* / *TIS8* / *egr* / *Zif268* / *Egr-1* / *Zenk* / *Krox24* / *NGFI-A* / *ETR103* / *Krox-24* / *Krox-1* /*Zfp).* Este gen se encuentra ubicado en el cromosoma 5 de *Homo sapiens*, y en el cromosoma 18 de *Rattus norvegicus* y *M. musculus*. (http://www.informatics.jax.org/)

AR: receptor de andrógeno, utilizado como marcador del cromosoma X. (sinónimo: *Tfm*). Este gen se encuentra ligado al cromosoma X en *H. sapiens*, *R. norvegicus*, *M. musculus*, y *Platipus sp*. (http://www.informatics.jax.org/)

2.3 Obtención de ADN

El ADN de *T.barrerae* y *M. musculus*, se obtuvo de tejido hepático siguiendo la metodología tradicional de fenol / cloroformo (Maniatis et al., 1982). Para esto se homogenizaron 50 mg aproximadamente de tejido hepático en 5 ml de tampón de lisis (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 M EDTA pH 8,0; 20 µg/ml RNAsa; 0,5% SDS). Posteriormente se agregó al homogenizado un volumen equivalente de fenol (equilibrado en Tris-HCl pH 7,5) /cloroformo/ alcohol isoamílico en una relación de 25: 24: 1 mezclando suavemente por inversión. Luego se centrifugó a 10.000 rpm por 15 min en un rotor Eppendorf 5415C y se recuperó la fase acuosa. El ADN fue precipitado agregando 2,5 vol de etanol frío, extraído con varilla de vidrio y posteriormente secado al aire. Luego el ADN se lavó suavemente en etanol 70% para finalmente ser resuspendido en una solución de TE (10mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA) y guardado a 4 ºC.

2.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El ADN genómico de *T. barrerae* y *M. musculus* fue amplificado por PCR (Mullis y Faloona, 1987; Erlich et al., 1988; Saiki et al., 1988). En una mezcla de reacción de 50 µl, se adicionaron 1 µl de ADN genómico (90 ng aproximadamente), 1 µl de dNTPs (10 mM); 2.5 µl de $MgCl_2$ (25 mM), 5 µl de *tampón* de reacción 10x, 0,5 µl de *Taq* ADN polimerasa (5U/µl). Las condiciones de denaturación, reasociación y extensión fueron estandarizadas para cada par de partidores. En el caso del gen *AR* las condiciones de PCR fueron las siguientes: un paso inicial de denaturación de 94 ºC por 4 min, 30 ciclos de denaturación (94 ºC), reasociación (56 ºC) y extensión (72 ºC) de 30 seg cada uno. El programa se terminó con una extensión final de 72 ºC por 7 min. Para el gen autosómico *Egr1* las condiciones fueron similares, aunque se cambió la temperatura de reasociación (55 ºC).

Los productos de amplificación se fraccionaron en un gel de agarosa (Maniatis et al., 1982). Para ello se prepararon geles al 2,0% en TBE 0.5x (50 mM Tris; 50 mM ácido bórico; 1 mM EDTA) conteniendo además 0,1 mg/ml de bromuro de etidio (Sharp et al., 1973). Como tampón de corrida se usó también TBE 0.5x o TAE 1x y se aplicó tampón de muestra (50% sucrosa, 0,25% azul de bromofenol). La electroforesis se realizó a 20 V/cm por 30-40 min. Los fragmentos se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta (320nm) y las imágenes fueron capturadas en una cámara polaroid (Polaroid 667).

2.5 Clonación de los productos de amplificación

Los productos de amplificación se ligaron al vector plasmidial pGEM-T Easy (Promega) acorde a las instrucciones del fabricante. Se mezcló 1µ de vector pGEM-T-Easy (50 ng/µl), 5 µl de tampón de ligación (2x), 2 µl de producto de amplificación, 1 µl de enzima T4 DNA ligasa (3U/ µl) y se incubó por 12 horas a 4 ºC.

Las células competentes XL-1 Blue (Stragene) se prepararon según una modificación de los métodos descritos por Lederberg y Cohen (1974); y Morrison (1979). Para esto se inocularon 10 ml de medio LB conteniendo 25 µg/ml de Tetraciclina (Tet) con una colonia de células XL-1 Blue, previamente sembradas por estrías el día anterior. Este cultivo se dejó crecer entre 10 a 12 horas con agitación rotatoria. Se tomaron 2.5 ml y se inocularon en 250 ml de medio LB (Tet 25 µg/ml). Se incubó por 3-4 horas a 37 ºC con agitación rotatoria (aproximadamente 225 rpm) hasta que la densidad óptica a 600 nm alcanzó un valor de 0.2-0.4. Posteriormente, las células se enfriaron en hielo por al menos una hora y del cultivo se transfirieron a una botella estéril de 250 ml. Las células se centrifugaron por 5 min a 2000 rpm en un rotor Eppendorf 5415C a 4 ºC. Las células se suspendieron suavemente en ¼ del volumen inicial de $MgCl_2$ 100 mM previamente enfriado a 4 ºC. Nuevamente se centrifugaron a 2000 rpm por 5 min en un rotor Eppendorf 5415C a 4 ºC y se resuspendieron suavemente en 1/20 del volumen inicial de $CaCl_2$ 100 mM previamente enfriado a 4 ºC. Una vez suspendidas las células, se agregaron 112,5 ml de $CaCl_2$ 100 mM (4 ºC). En esta solución de calcio permanecieron por 20 min a 4 ºC tras lo cual se centrifugaron a

2000 rpm por 5 min en un rotor Eppendorf 5415C a 4 ºC. Finalmente las células competentes se resuspendieron en 1/100 del volumen inicial (2,5 ml) en una solución consistente de 85% de $CaCl_2$ 100 mM y 15% glicerol. Las células se distribuyeron en alícuotas de 200-300 µl que se usaron inmediatamente.

Para la transformación de las células competentes, se repartió la mezcla de ligación en dos tubos Eppendorf de 1,5 ml. Se agregó a cada tubo 50 µl de células competentes (XL-1 Blue) y se dejó 20 min en hielo. Posteriormente se realizó un shock termico a 42 ºC por 90 seg. Se enfrío por 2 min en hielo y se agregó 0,9 ml de medio SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0.5%; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCL; 1M $MgSO_4$; 20 mM glucosa). Luego de agregado el SOC, se incubó a 37 ºC por 1h con agitación rotatoria (aproximadamente 225 rpm). Finalmente, se sembró directamente 0,5 ml de esta mezcla de transformación en una placa de LB-agar (15 cm) conteniendo Ampicilina (50 µg/ml), 50 µl de X-Gal (10%) y 125 µl IPTG (0,5 M) y se incubó por 8 a 12 horas a 37 ºC. Las colonias azules correspondieron a células transformadas con el vector, mientras que las colonias blancas correspondieron a células transformadas con el ADN recombinante (*pTy-Egr1*$_{143}$, *pTy-AR*$_{145}$).

En la preparación del ADN plasmidial a pequeña escala (*miniprep*), se seleccionaron algunas de las colonias blancas obtenidas de la transformación de las células competentes. Luego se inocularon por separado en aproximadamente 15 ml de medio LB-Amp (50 µl/ml) y se incubaron por 12 horas a 37 ºC con agitación rotatoria. El ADN se preparó con 1,5 ml del cultivo estacionario. Las células fueron sedimentadas por 15 seg a 15000 rpm en un rotor Eppendorf 5415C. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 300 µl de solución S1 (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 400 µg/µl de RNAsa A). Posteriormente se agregó 300 µl de solución S2 (200mM NaOH, 1% SDS), se mezcló suavemente y se dejó 5 min a temperatura ambiente. Se adicionó 300 µl de solución S3 (2,55 M acetato de potasio pH 4,8) mezclando por inversión y se incubó 10 min en hielo. Enseguida se centrífugó a 14000 rpm en un rotor Eppendorf 5415C por 5 min y se recuperó el sobrenadante en un nuevo tubo Eppendorft. Se agregó 1/2 vol de fenol equilibrado en Tris-HCl (450 µl) y 1/2 vol de cloroformo/alcohol isoamilico 24:1 (450 µl). Después se mezcló por 3 min y se separaron las fases por centrifugación a 10000 rpm en un rotor Eppendorf 5415C a

4 ºC. Se recuperó cuidadosamente la fase acuosa superior (900 µl aprox) y se repartió en dos tubos Eppendorf de 1,5 ml. Se precipitó agregando 900 µl de isopropanol frío y se incubó por al menos 20 min. Luego se centrifugó a 14000 rpm por 20 min en un rotor Eppendorf 5415C a 4 ºC. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se lavó con etanol 70% frío. El ADN plasmidial se resuspendió en 30 µl de agua con TE/RNAsa (10 U/µl) para eliminar el RNA contaminante. La concentración del ADN se determinó en un espectrofotómetro a 260 nm. Finalmente a partir de 1,5 µl de cultivo bacteriano se aisló aproximadamente 12 µg de ADN plasmidial. El ADN plasmidial se caracterizó por digestión con *Eco*RI para liberar el inserto del vector. De esta manera, en un volumen final de 20 µl se digirió aproximadamente 5 µg del ADN recombinante con 10 U de *EcoR*I en tampón 3 (Gibco BRL) por 2 horas a 37 ºC. Los fragmentos se fraccionaron en un gel de agarosa al 1,5% y por comparación con el estándar de tamaño molecular se estimó el tamaño del fragmento liberado. Los insertos del tamaño esperado fueron secuenciados para corroborar la especificidad de los fragmentos clonados y de los partidores utilizados en *T. barrerae.*

2.6 Preparación de sondas y ensayos de Southern blot

En los análisis de Southern blot se utilizaron como sondas homólogas las secuencias génicas aisladas de *T. barrerae*. Las sondas correspondieron a los fragmentos *Ty-AR*$_{145}$ y *Ty-Egr1*$_{143}$ (Ver Fig 1a y 2a). El fragmento aislado se marcó radiactivamente con α [^{32}P] dCTP (3000C/mmol; 1mCi/ml, NEN) en una mezcla de reacción de PCR con partidores aleatorios (Random Primer DNA Kit, Promega) que se basa en el método descrito por Feinberg y Vogelstein (1983). El marcaje se realizó en un volumen de 50 µl con 5 µl de α [^{32}P] dCTP (3000Ci/mmol) según instrucciones del *KIT.* El rendimiento del marcaje de determinó por cuentas precipitables utilizando ácido tricloroacetico (TCA); (Sambroock et al., 1989). Para ello, una alícuota (1µl) de la reacción de marcaje se diluyó 100 veces en agua destilada. En duplicado (10 y 20 µl) se precipitó el ADN en 5 ml de TCA 10% frío utilizando como coprecipitador 1µl de ADN de espermio de salmón fragmentado (1µg/ml). Se incubó en hielo por 15 min y se

filtró en una membrana de nitrocelulosa (0.45 µm). La membrana se lavó con la misma solución de TCA frío, luego con 100% de etanol frío y se secó al aire. Posteriormente, la membrana se depositó en un vial con 3,5 ml de solución de centelleo (4 g PPO y 0.1 g POPOP en un litro de tolueno). Finalmente la cuantificación se realizó en un contador de centelleo Packard tri-carb 1600TR, obteniendo aproximadamente una actividad especifica de 10^9 cpm/µg de ADN.

El ADN genómico de distintos octodóntidos incluido un *M. musculus* fue digerido con las enzimas *Eco*RI, *Bam*HI, *Hind*III y *Pst*I. Para esto se mezclaron aproximadamente 12 µg de cada ADN con el tampón adecuado para la enzima correspondiente. La digestión total se llevó a cabo en un volumen de reacción final de 20 µl. Se incubó a 37 ºC por 12 horas y el ADN se fraccionó en gel de agarosa 1% en TAE 0.5X. Posteriormente los geles fueron sumergidos 10 min en HCl 0.25 N, luego 45 min en solución denaturante (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) y finalmente 45 min en solución neutralizante (0,5 M Tris-HCl pH 7.4, 1.5 M NaCl). Los geles fueron montados sobre papel filtro (3M) y el ADN fue transferido por capilaridad a membranas de nitrocelulosa (Southern et al., 1975 y Sambrook et al., 1989). Para esto se utilizó 20X SSC (3 M NaCl, 0.3 M citrato de sodio) y se dejó transfiriendo toda la noche. Finalmente cada membrana se retiró y se secó en una estufa al vacío a 80 ºC por 40 min. El ADN denaturado y fijado en las membranas de nitrocelulosa se hibridó con las sondas homólogas *Ty-AR*$_{145}$ y *Ty-Egr*1$_{143}$ denaturadas y marcadas con $\alpha[^{32}P]$ dCTP. Este procedimiento se realizó según Sambrook et al. (1989). Cada membrana se sumergió 15 min en solución de prehibridación (50% formamida, 6X SSPE, 0.5% SDS, 100ug/ml de ADN de espermio de salmón) y se dejó en un horno de hibridación a 42 ºC por 30 min. Luego se agregó la sonda marcada radiactivamente a la bolsa de prehibridación diluyéndola hasta una concentración aproximada de $3x10^6$ moléculas. Se hibridó durante 12 horas con agitación suave a 42 ºC. Terminada la fase de hibridación, se recuperó la solución y se lavó la membrana en la siguiente secuencia de concentraciones de sal; 15 min 25 ºC SSC 2X, SDS 0,1%; 15 min a 45 ºC con SSC 2X, SDS 0,1%; 15 min a 45 ºC con SSC 1X, SDS 0,1%; 15 min a 45 ºC con SSC 0,5%, SDS 0,1%. Finalmente se procedió a exponer a un *film* autoradiográfico a

-80 ºC por 12 a 48 horas dependiendo de la intensidad de la señal que presentó la membrana.

2.7 PCR *in situ* y preparación de controles

Se prepararon las muestras según una modificación de los métodos descritos por Schwarzacher y Harrison (1995). Los núcleos interfásicos de *T. barrerae* y *M. musculus*, fueron depositados en portaobjetos xilanizados. La muestra se secó en una estufa a 60 ºC por 30 min y se deshidrató en etanol usando concentraciones ascendentes. Los portaobjetos con la muestra fueron guardados secos a – 4 ºC para su posterior uso.

Los núcleos de *T. barrerae* y *M. musculus* fueron tratados con una solución de lisis (0.5 M SDS, 100 mM Tris-HCl pH 7.2, 50 mM EDTA) en agua desionizada por 20 min. Luego se prepararon 500 µl de pepsina (Sigma) 2 mg/ml en 0.01 N HCl. Para optimizar el tiempo de digestión con proteasa, se aplicaron 100 µl de solución a cada pocillo de núcleos en los portaobjetos (tres pocillos por cada portaobjeto) y se incubaron a temperatura ambiente por 45, 60 y 90 min en cámara húmeda. Posteriormente, la pepsina fue inactivada con agua ultra-pura.

La PCR *in situ* se realizó en un termociclador Perkin-Elmer (GeneAmp In Situ PCR System 1000) y el sistema utilizado fue de tipo directo. El programa de amplificación para el gen *Egr*1 consistió en: 1 paso inicial de denaturación de 94 ºC por 4 min, 30 ciclos de denaturación (94 ºC), reasociación (55 ºC) y extensión (72 ºC) de 30 seg cada uno. El programa se terminó con una extención final de 72 ºC por 7 min. En el caso del gen *AR* las condiciones fueron las mismas, excepto que las condiciones de reasociación fueron de 56 ºC. La amplificación se llevó a cabo en una mezcla de reacción total de 50 µl con los siguientes componentes: 5 µl de tampón PCR 10x; 2 µl de dNTP, 10 mM; 3 µl de $MgCl_2$, 25 mM; 1 µl de *Taq* DNA Polimerasa (5U/µl); 0.8 µl de digoxigenina-11-dUTP (Roche), 10 µM; 38 µl de H_2O desionizada. Finalizada la PCR *in situ*, se procedió a retirar cuidadosamente los portaobjetos del termociclador. El procedimiento posterior se realizó según una modificación a los métodos descritos por Nuovo et al. (1995). La muestra fue pre-tratada con tampón de bloqueo (0.1X SSC, 0.2% BSA) en un baño a 45 ºC por 5 min. Luego se aplicó a cada muestra 50 µl de

anticuerpo anti-digoxigenina (Roche) diluido 1:1000 en tampón A (0,1M Tris-HCl pH 7,5; 0,15 M NaCl). Las muestras se encubaron por 2 horas a temperatura ambiente para ser lavadas en tampón B (0,1 M Tris-HCl pH 9,5; 0,15 M NaCl; 50 mM $MgCl_2$). Posteriormente se agregó a cada muestra 50 µl de solución substrato NBT/ BCIP (2.5 µl NBT/ BCIP (Promega)/ ml de tampón B), incubando por 20 min hasta la aparición del color. Las muestras fueron deshidratadas en una batería de etanol, inmersas en xilol puro y finalmente montadas con un cubre-objetos para ser observadas al microscopio óptico. Las fotografías fueron capturadas a una amplificación de 100X. Para una correcta interpretación de los resultados, se llevaron a cabo los siguientes controles experimentales:

Control positivo: Se utilizaron núcleos de *M. musculus*, partidores y *Taq* DNA polimerasa. Así, se generaron productos de amplificación específicos y se visualizaron señales que corresponden a genes de copia única. Además se muestra que la *Taq* DNA polimerasa se encuentra activa.

Controles negativos: En un primer control, la mezcla de reacción no contiene partidores, pero sí contiene *Taq* DNA polimerasa. Así, no hay productos de amplificación y no se visualiza ninguna señal. Este control descarta *mispriming* ó amplificaciones internas (Martínez et al., 1995). En un segundo control, la mezcla de reacción no contiene *Taq* DNA polimerasa, pero sí contiene partidores. De esta manera, no hay productos de amplificación y no se visualiza ninguna señal. Este control también contribuye a descartar falsos positivos.

Adicionalmente se realizaron calibraciones que permitieron estimar las cantidades de digoxigenina (digoxigenin-11-dUTP 25 nm; Roche) y del anticuerpo antidigoxigenina (antidigoxigenin-AP 150 U; Roche) para un revelado óptimo. De esta manera en una primera etapa se estimó la sensibilidad del anticuerpo antidigoxigenina mediante un PCR estándar con ADN de *M. musculus* usando los mismos componentes de la mezcla de reacción del PCR *in situ* que contiene dUTP-Dig. Al finalizar los ciclos correspondientes, se depositaron dos alícuotas sobre una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se secaron a temperatura ambiente por 40 min y se sumergieron en antidigoxigenina (conjugada al fragmento Fab de la fosfatasa alcalina) en una relación 1:1000 y 1:2000 respectivamente. Finalmente se reveló con

el substrato respectivo simulando el mismo proceso final de la PCR *in situ.* En una segunda etapa, se estimó la especificidad del fragmento de PCR marcado con dUTP-Dig. Para esto se depositaron en las membranas vectores que contienen distintos insertos y uno que contiene el fragmento del gen *Egr1*. Los vectores fueron denaturados y depositados en una membrana de nitrocelulosa, para luego ser secados en una estufa al vacío a 80 ºC. Los productos de amplificación del gen *Egr*1 que contienen dUTP-Dig incorporados fueron diluidos en tampón de hibridación y la membrana de nitrocelulosa fue hibridada por 2 horas a 45 ºC. Luego las membranas se sumergieron en Anti-dig (conjugada al fragmento Fab de la fosfatasa alcalina) en una relación 1: 2000. Finalmente se reveló con el substrato respectivo simulando el mismo proceso final de la PCR *in situ.*

2.8 Análisis estadísticos de los datos

Se contaron 100 núcleos *T. barrerae* macho y 100 núcleos *T. barrerae* hembra para los ensayos con *Egr*1 y *AR*. Igual número se contabilizó con los núcleos control de *M. musculus.* De esta forma se consideraron 4 clases de observaciones; núcleos con 1, 2, 3 y 4 señales respectivamente. Las observaciones fueron agrupadas según frecuencia y por sexo. Los datos se analizaron con la prueba de Chi-cuadrado (χ^2) para poner a prueba las diferencias significativas entre la distribución de señales de *T. barrerae* respecto a la de *M. musculus* considerada como esperada. El número de categorías fue 4 (K = 4), los grados de libertad 3 (g.l. = 3) y se aceptó un nivel de significación del 5% (α= 0,05). Posteriormente, la distribución de señales en núcleos interfásicos se ajustó a la ecuación $\boldsymbol{y = f x^{1/x} + C}$, donde ***y*** es la categoría (1, 2, 3 ó 4), **C** = 0 (definida como una constante), **x** es la frecuencia relativa obtenida del cociente entre la frecuencia absoluta y el total de observaciones para cada categoría, y f es la función de ajuste que refleja la probabilidad de encontrar hasta cuatro sitios distintos en el núcleo interfásico de *T. barrarae*.

3. RESULTADOS

Los partidores de los genes *Egr*1 y *AR* obtenidos de una alineación múltiple de secuencias consenso (Anexo I), mostraron en *T. barrerae* productos de amplificación discretos en concordancia a los fragmentos esperados (Fig 1 y 2). La secuenciación de los productos de amplificación confirmaron la especificidad de la PCR (Anexo III). El análisis de las secuencias, indica que el fragmento de 143 pb del gen *Egr*1 tiene un 87% de similitud respecto a igual secuencia en *M. musculus* (banco de genes: NM_007913). Adicionalmente, el fragmento de 146 pb. del gen *AR*, mostró un 97% de similitud respecto a *M. musculus* (banco de genes: X59592).

La técnica de PCR *in situ* permitió evidenciar señales discretas en *T. barrerae* y *M. musculus*. La utilización de controles experimentales, permitió precisar el tiempo de digestión enzimática necesaria para una adecuada retención de los productos de amplificación (Anexo IV). Además, los controles negativos permitieron descartar adecuadamente los falsos positivos (Fig 3).

Respecto del gen *Egr*1, los núcleos de *T. barrerae* mostraron cuatro señales en hembras y machos respectivamente (Fig 4A y 5A). En contraste, en los núcleos control se observaron dos señales en ambos sexos, confirmando de esta manera la condición autosómica del gen (Fig 4B y 5B). La prueba de docimasia entre frecuencias observadas versus esperadas entregó un valor de $\chi^2_{(3)} = 208$ ($P < 0{,}001$), lo que indica que existen diferencias altamente significativas entre *M. musculus* y *T. barrerae* (Anexo V).

Adicionalmente, respecto del gen *AR*, los núcleos de *T. barrerae* mostraron cuatro señales en las hembras y tres en los machos (Fig 6A y 7A). En contraste, los núcleos de *M. musculus* mostraron dos señales en las hembras y sólo una en los machos (Fig 6B y 7B). La diferencia en el número de señales entre ambos sexos confirma que se trata de un gen ligado al cromosoma X. La prueba de docimasia entre frecuencias observadas versus esperadas entregó en machos un valor de $\chi^2_{(3)} = 451{,}6$ ($P < 0{,}001$) y en hembras un valor de $\chi^2_{(3)} = 286{,}5$ ($P < 0{,}001$), lo que indica que existen diferencias significativas entre *M. musculus* y *T. barrerae* independientes del sexo. Por

lo tanto, al igual que en el gen autosómico, se rechazó la hipótesis nula que suponía diploidia en *T. barrerae* (Anexo V).

Finalmente, la ecuación **y = *f*i x 1/x + C** mostró ser adecuada para ajustar la distribución de señales en función de la probabilidad de los partidores de generar productos de amplificación en sitios independientes del núcleo interfásico (Fig 8B, 9B, y 10B).

Fig 1: Factor de crecimiento nervioso *Egr*1, marcador autosómico.

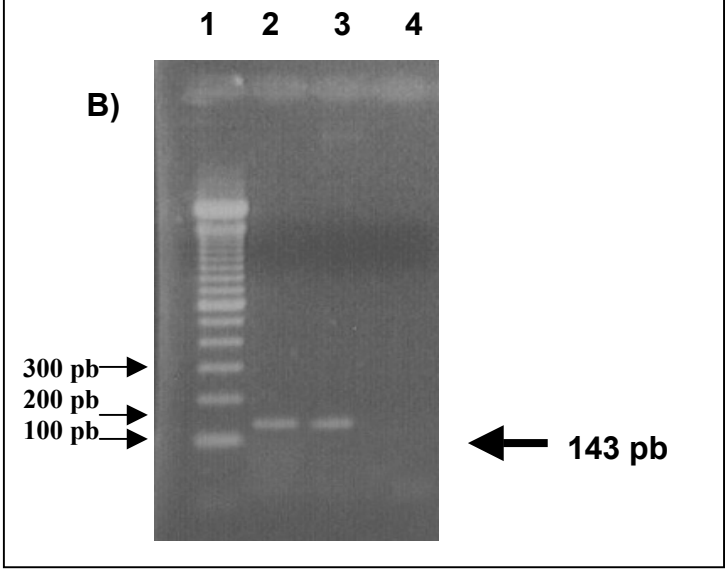
A): Secuencia del fragmento *Ty-Egr1*$_{143}$ y en negrita secuencia de los partidores *Egr1* específicos.

B): Fraccionamiento de productos de PCR en gel de agarosa 2% teñido con EtBr. Carril 1: Marcador de tamaño molecular (100 pb DNA Ladder; GIBCO BRL)., Carril 2: Templado ADN de *M. musculus.*, Carril 3: Templado ADN de *T. barrerae*., Carril 4: Sin templado (control negativo). La flecha indica el producto de amplificación *Ty-Egr*1$_{143}$ especifico.

C): Fracción de ADN p*Ty-Egr1*$_{143.}$ digerido con *Eco*RI en gel de agarosa 1,5% teñido con EtBr. Carril 1: Marcador de tamaño molecular (1Kb DNA Ladder; Gibco BRL)., Carril 2: Fracción p*Ty-Egr*1$_{143}$. La flecha indica el fragmento *Ty-Egr1*$_{143}$ especifico.

A) >Ty-*Egr1*$_{143}$

AAGGCACCAAGACGTGAAACTTTTTAAACCAAAAGGACAAGAGAAAAAAAAAAAAGAGGAA
GAAAAACCAAACCATATTTTGTCACGTGAGAGTACGGTCGAGCAATATTTACAAAAAGGC
TAACGGAACAACACTCTGACACA



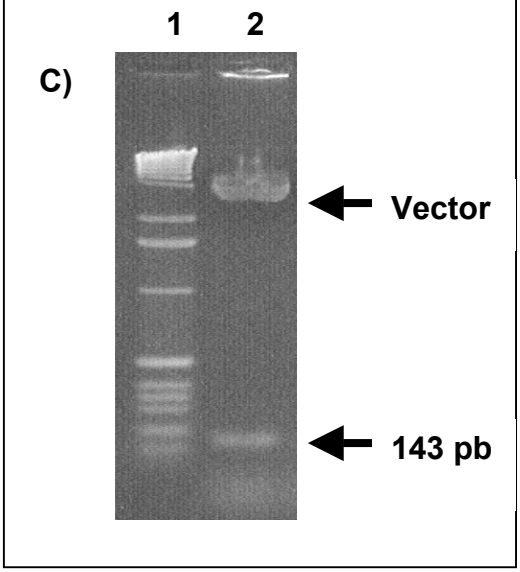


Fig 2 : Receptor de Andrógeno *AR*, marcador cromosoma X.

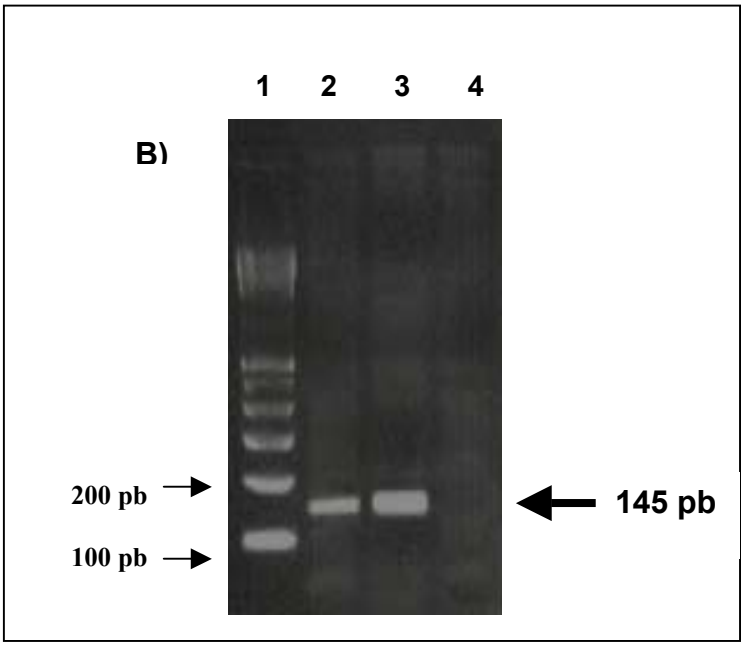
A): Secuencia del fragmento *Ty-AR* $_{145}$ y en negrita secuencia de los partidores *AR* específicos.

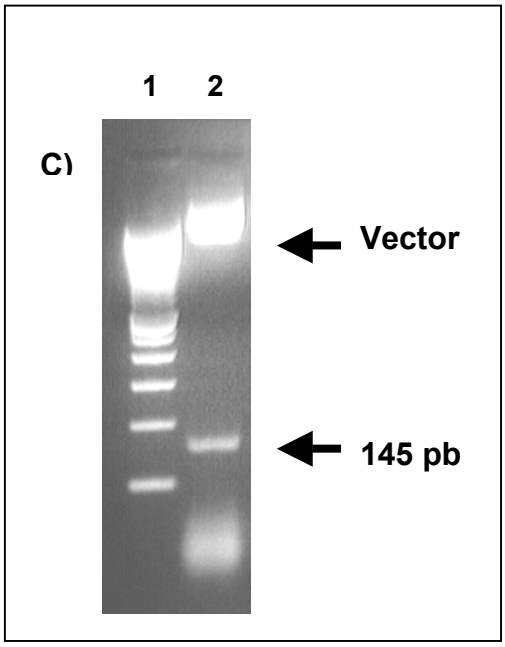
B): Fraccionamiento de productos de PCR en gel de agarosa 2% teñido con EtBr. Carril 1: Marcador de tamaño molecular (100 pb DNA Ladder Gibco BRL)., Carril 2: Templado ADN de *M. musculus.*, Carril 3: Templado ADN de *T. barrerae*., Carril 4: Sin templado (control negativo). La flecha indica el producto de amplificación *Ty-AR*$_{145}$ especifico.

C): Fracción de ADN p*Ty*-AR$_{145.}$ digerido con *Eco*RI en gel de agarosa 1,5% teñido con EtBr. Carril 1: Marcador de tamaño molecular (100 pb DNA Ladder Gibco BRL)., Carril 2: Fracción p*Ty-AR*$_{145}$. La flecha indica el fragmento *Ty-AR* $_{145}$ especifico.

A) >*Ty-AR*$_{145}$

GTGTGTGGAAATAGATGGGCTTGACTTTCCCAGAAAGGATCTTGGGCACTTGCACAGAGA
TGATCTCTGCCATCATTTCCGGGAAGTCCACGCTCACCATGTGTGACTTGATTAGCAGGT
CAAAA**GTGAACTGATGCAGCTCTCTA**





3.1. PCR *IN SITU*

Los controles negativos permitieron corroborar la eficacia y la verisimilitud de la técnica. Así, al prescindir de la enzima (*Taq*) y los partidores no se observó ninguna reacción atribuible a PCR *in situ* (Fig 3A y 3B). La señal que se indica con la flecha corresponde al precipitado formado entre la enzima y el substrato respectivo, y muestra el lugar donde los productos de amplificación quedaron retenidos en el tramado proteico (Fig 4, 5, 6 y 7). Se puede ver además la deformación de la membrana nuclear producto de la temperatura y la digestión enzimática previa (Fig 6). Se observa también transformación del tamaño de los núcleos y en algunos casos liberación parcial de fibras de cromatina (Fig 6 y 7).

Fig 3 Control negativo del PCR *in situ* de *T. barrerae* sin partidor (A) y sin Taq DNA polimerasa (B).

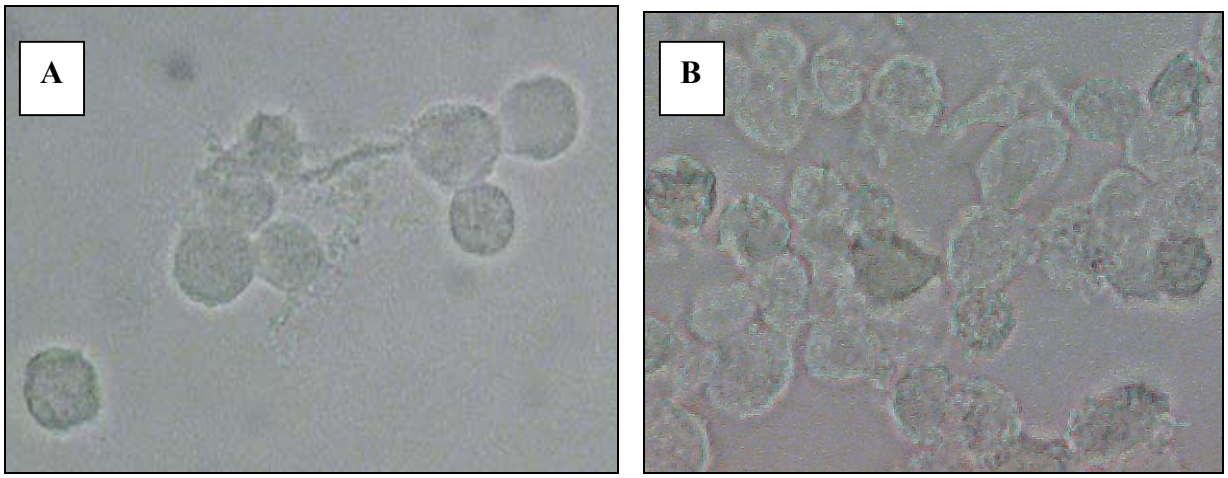


Fig 4: PCR *in situ* del gen autosómico *Egr*1 en núcleos interfásicos de machos *T. barrerae* (A) y *M. musculus* (B).

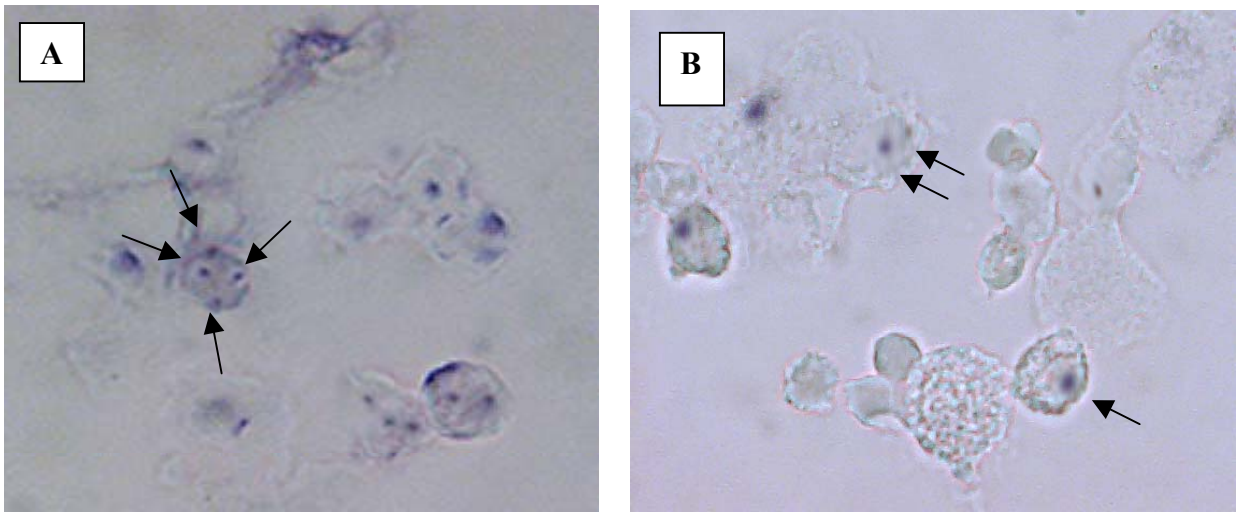


Fig 5: PCR *in situ* del gen autosómico *Egr*1 en núcleos interfásicos de hembras *T. barrerae* (A) y *M. musculus* (B).

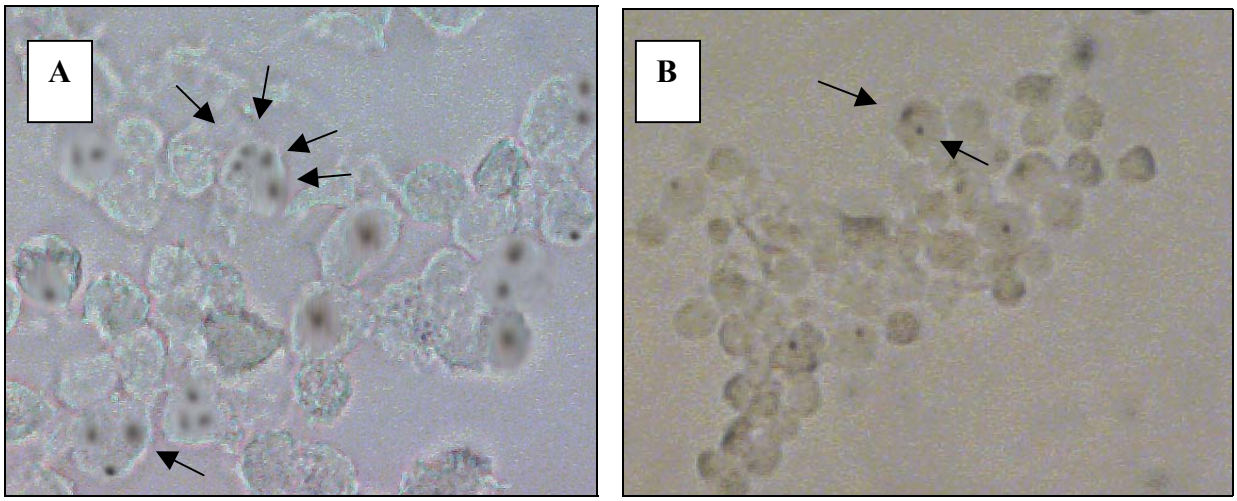


Fig 6: PCR *in situ* del gen AR en núcleos interfásicos de machos *T.barrerae (A)* y *M. musculus (B).*

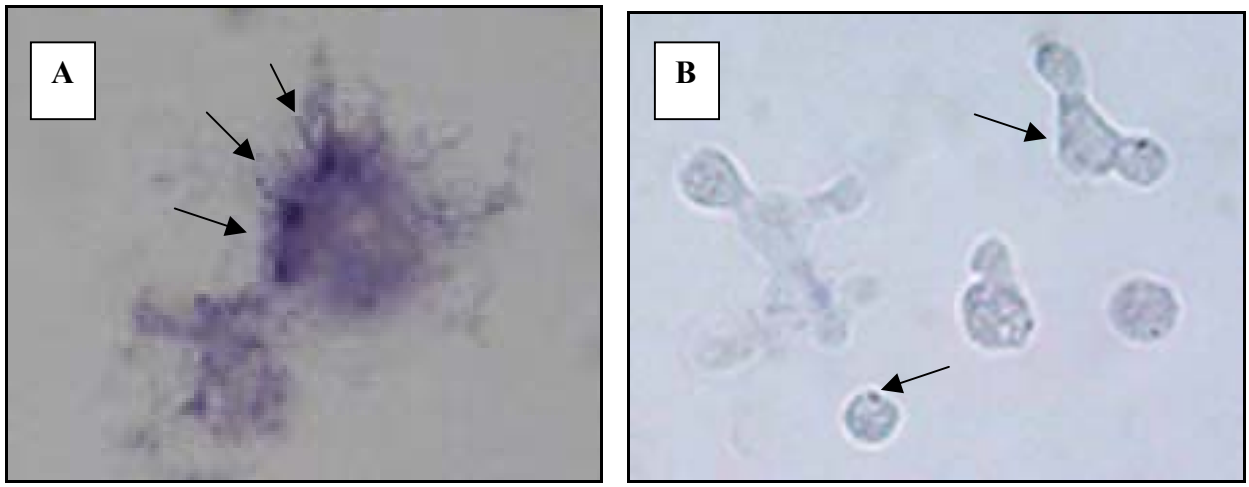
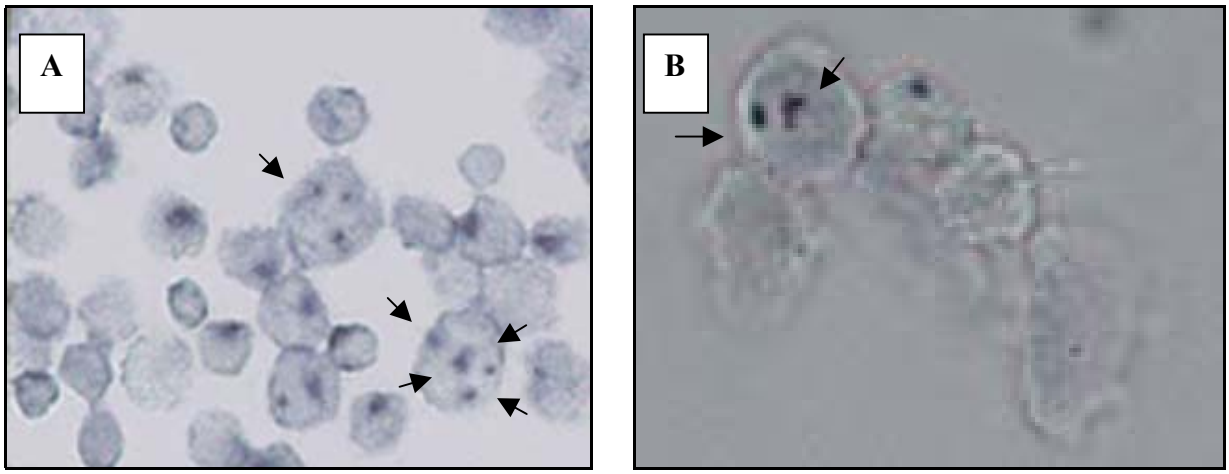


Fig 7: PCR *in situ* del gen AR en núcleos interfásicos de hembras *T. barrerae* (A) y *M. musculus* (B).



3.2 Análisis estadístico de los datos.

Fig 8: Distribución de señales del gen autosómico *Egr*1 en núcleos de machos *M. musculus* y *T. barrerae*, respectivamente. En (A) se muestran las frecuencias absolutas de un total de 100 núcleos muestreados al azar y en el recuadro se incluye valor de χ^2 y significación estadística. En (B) se muestran las frecuencias relativas de (A) ajustadas a la función y = *f*i x 1/x+C.

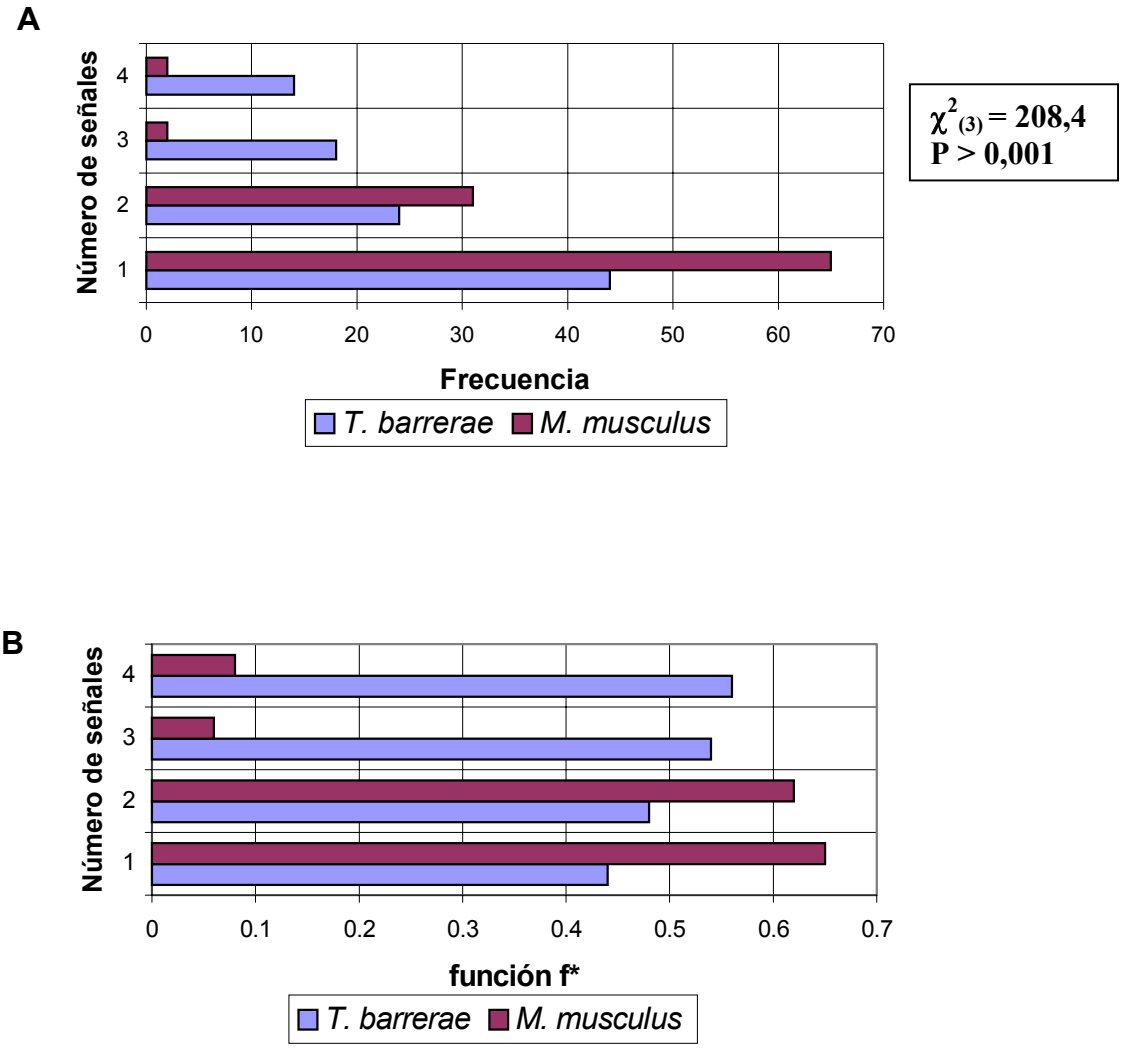
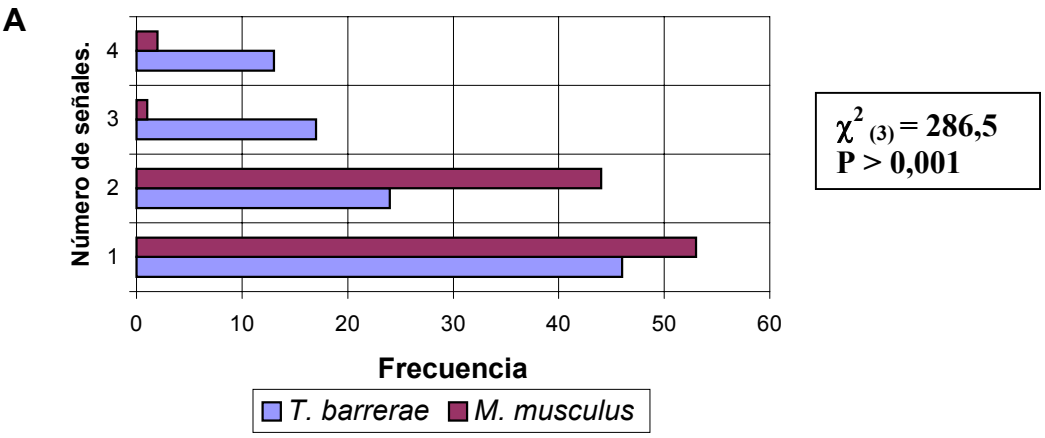


Fig 9: Distribución de señales del gen AR en núcleos de hembras *M. musculus* y *T. barrerae*, respectivamente. En (A) se muestran las frecuencias absolutas de un total de 100 núcleos muestreados al azar y en el recuadro se incluye valor de χ^2 y significación estadística. En (B) se muestran las frecuencias relativas de (A) ajustadas a la función y = fi x 1/x + C.



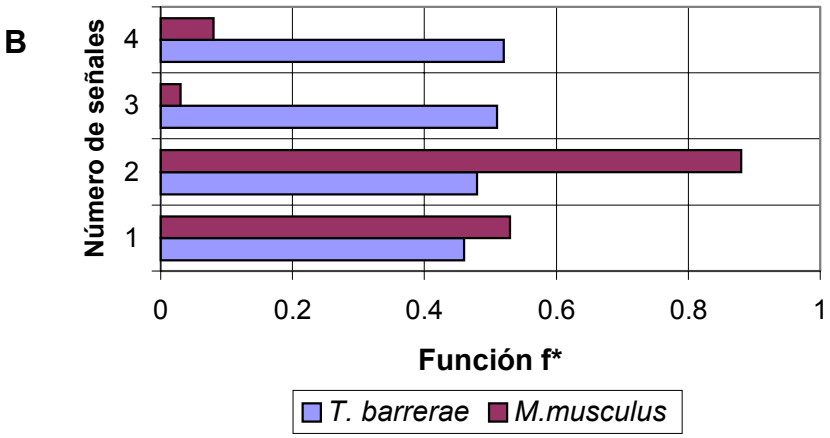
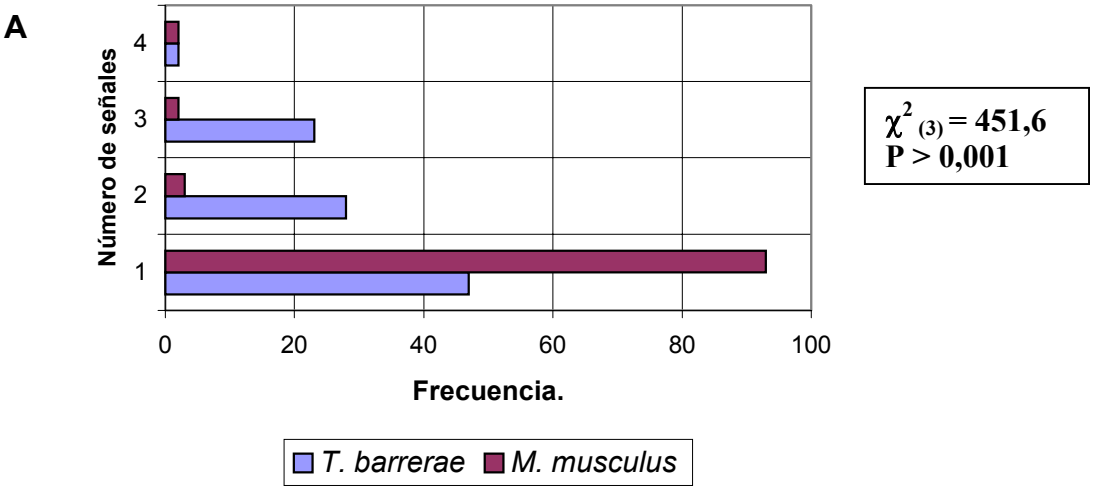
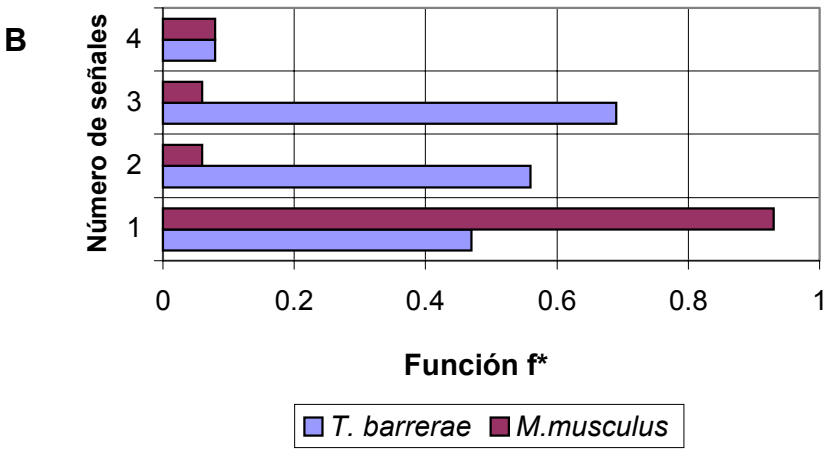


Fig 10: Distribución de señales del gen AR en núcleos de machos *M. musculus* y *T. barrerae,* respectivamente. En (A) se muestran las frecuencias absolutas de un total de 100 núcleos muestreados al azar y en el recuadro se incluye valor de χ^2 y significación estadística. En (B) se muestran las frecuencias relativas de (A) ajustadas a la función y = ƒi x 1/x+C.





3.3 Análisis de ADN genómico por Southern blot

Para corroborar los ensayos de PCR *in situ,* se realizaron análisis de Southern blot. (Fig 11, 12, 13 y 14). La sonda utilizada corresponde a un fragmento *Ty-AR*$_{145}$ de *T. barrerae*. La secuencia no es reconocida por ninguna de las enzimas utilizadas (Anexo VI) y se dedujo a partir de un alineamiento múltiple de secuencias codificantes (Anexo I). Por lo tanto, se infirió que cada banda sobre la autorradiografía corresponde a un sólo locus *AR*. De esta forma, dos bandas de hibridación fueron detectadas con las digestiones *Eco*RI y *Hind*III (Fig 11 y 12, carriles 4-6), mientras que en las especies diploides se observa sólo una banda (Fig 11 y 12, carriles 7 y 8). La digestión con *Bam*HI, muestra dos claras bandas de hibridación, aunque también se sugiere una tercera banda en *T. barrerae y P. Aureus* (Fig 13, carriles 3-6), mientras que en los taxa diploides se observa sólo una banda. (Fig 13, carriles 7 y 8). Estas observaciones proveen evidencia que el fragmento AR se encuentra duplicado en las especies *T. barrerae* y *P. aureus*. Finalmente, se observa sólo una banda con la digestión *Pst*I en *T. barrerae* y *P. Aureus* (Fig 14), sugiriendo que la sonda reconoce el sitio *Pst*I, pero no discrimina entre loci duplicados. Todos los blot muestran patrones de bandas compartidos, indicando que los sitios de restricción de las enzimas utilizadas se encuentran altamente conservadas entre las especies consideradas (*T. barrerae*, *P. aureus*, *O. mimax* y *O. gliroides*).

Fig 11: Southern blot de ADN genómico digerido con *Eco*RI e hibridado con *Ty-AR*$_{145}$. A, fraccionamiento de ADN genómico en gel de agarosa 1% TAE teñido con EtBr. En el carril 1: Marcador de tamaño molecular., Carril 2: ADN de *M. musculus*., Carril 3: ADN de *P. Aureus* ♂., Carril 4: ADN de *T. barrerae* (1) ♂., Carril 5: ADN de *T. barrerae* ♀., Carril 6: ADN de *T. barrerae* ♂ (2)., Carril 7: ADN de *O. mimax* ♂., Carril 8: ADN de *O. gliroides* ♀. B, autorradiografía de (A). Cada flecha indica el lugar donde la sonda *Ty-AR*$_{145}$ hibridó al genoma respectivo. Entre (A) y (B) marcador de tamaño molecular (1Kb DNA ladder Gibco).

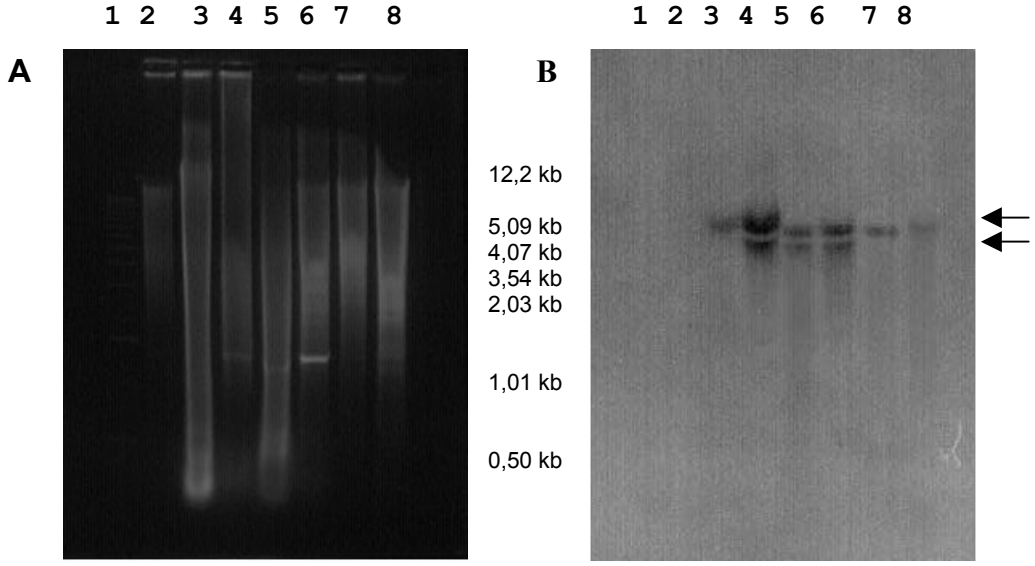


Fig 12: Southern blot de ADN genómico digerido con *Hind*III e hibridado con *Ty-AR*$_{145}$. A, fraccionamiento de ADN genómico en gel de agarosa 1% TAE teñido con EtBr. En el carril 1: Marcador de tamaño molecular., Carril 2: ADN de *M. musculus*., Carril 3: ADN de *P. aureus*., Carril 4: ADN de *T. barrerae* (1) ♂., Carril 5: ADN de *T. barrerae* ♀., Carril 6: ADN de *T. barrerae* ♂ (2)., Carril 7: ADN de *O. mimax* ♂., Carril 8: ADN de *O. gliroides* ♀. B, autorradiografía del gel en (A). La flecha indica el lugar donde la sonda *Ty-AR*$_{145}$ hibridó al genoma respectivo. Entre (A) y (B) marcador de tamaño molecular (1Kb DNA ladder Gibco).

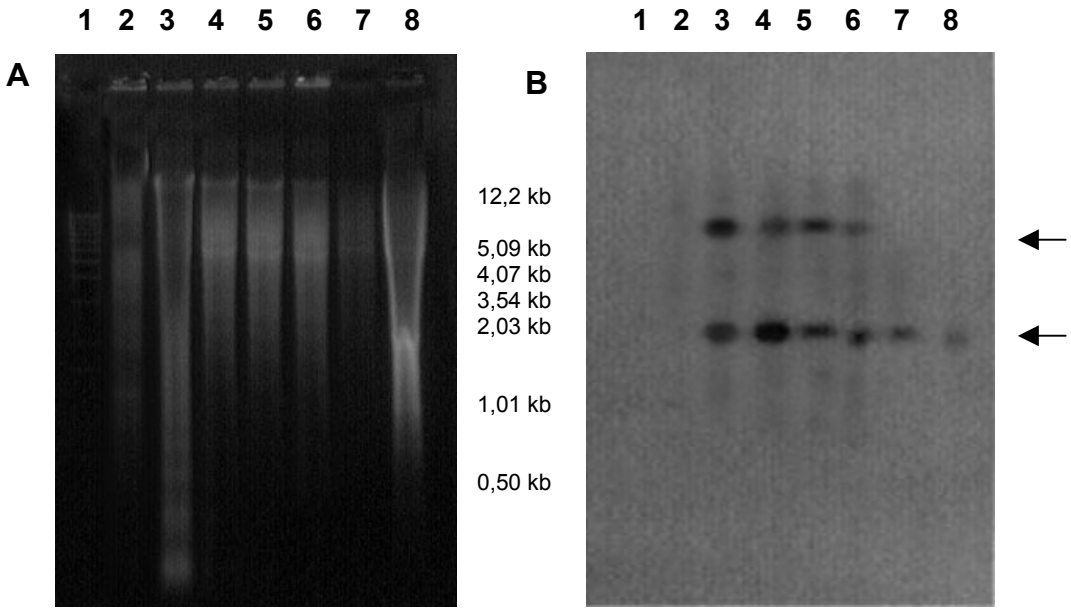


Fig 13: Southern blot de ADN genómico digerido con *Bam*H1 e hibridado con *Ty-AR*$_{145}$. A, fraccionamiento de ADN genómico en gel de agarosa 1% TAE, teñido con EtBr. En el carril 1: Marcador de tamaño molecular., Carril 2: ADN de *M. musculus*., Carril 3: ADN de *P. aureus*., Carril 4: ADN de *T. barrerae* (1) ♂., Carril 5: ADN de *T. barrerae* ♀., Carril 6: ADN de *T. barrerae* ♂ (2)., Carril 7: ADN de *O. mimax* ♂., Carril 8: ADN de *O. gliroides* ♀. B, autorradiografía del gel en (A). Cada flecha indica el lugar donde la sonda *Ty-AR*$_{145}$ hibridó al genoma respectivo. Entre (A) y (B) marcador de tamaño molecular (1Kb DNA ladder Gibco).

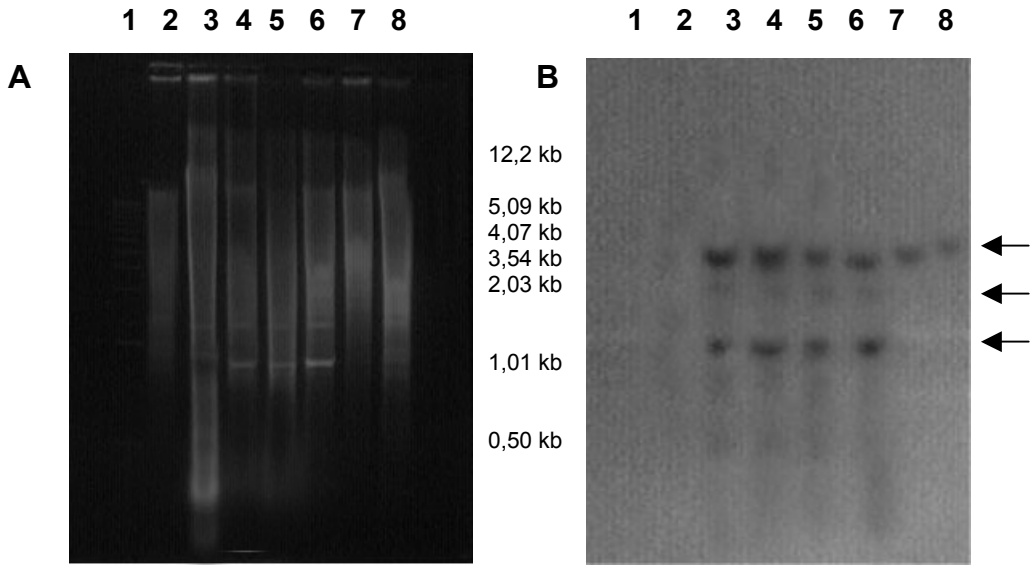
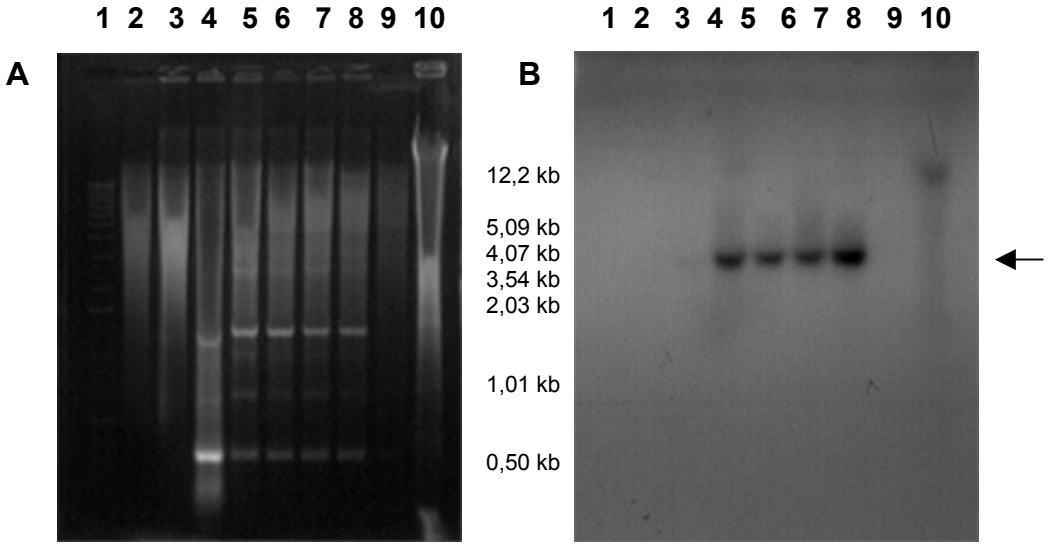


Fig 14: Southern blot de ADN genómico digerido con *Pst*I e hibridado con *Ty-AR*$_{145}$. A, muestra fraccionamiento de ADN genómico en gel de agarosa 1% TAE teñido con EtBr. En el carril 1: Marcador de tamaño molecular., Carril 2: ADN de *M. musculus*., Carril 3: ADN de *C. carpio*., Carril 4: ADN de *P. aureus*., Carril 5: ADN de *T. barrerae* (1) ♀., Carril 6: ADN de *T. barrerae* ♂., Carril 7: ADN de *T. barrerae* ♀ (2)., Carril 8: ADN de *T. barrerae* ♀ *(3)., Carril 9: ADN de O. mimax* ♂., Carril 10: ADN de *O. Gliroides* ♀. B, autorradiografia del gel en (A). Cada flecha indica el lugar donde la sonda hibridó al genoma respectivo. Entre (A) y (B) marcador de tamaño molecular (1Kb DNA ladder Gibco).



4. DISCUSION

Tympanoctomys barrerae (4n= 102) tiene un genoma duplicado en sus células somáticas y germinales (16,8 pg y 9,2 pg ADN respectivamente; Gallardo et al., 2003). Es el primer mamífero tetraploide descrito por la ciencia y constituye una de las novedades evolutivas más interesantes de los últimos años. El enigmático número cromosómico de *T. barrerae* no ha podido ser explicado por duplicación genómica total de sus congéneres. Por ejemplo, se han encontrado dos constricciones secundarias en todos los octodóntidos (Spotorno et al., 1995). Por lo tanto, se esperaba que el cariotipo de *T. barrerae* mostrará cuatro contricciones secundarias y no dos. Adicionalmente, la observación de un aparente sistema de determinación del sexo XY llevó a Gallardo et al., (1999) a sugerir una eliminación selectiva de autosomas y cromosomas sexuales.

Los resultados obtenidos con el fragmento del gen autosomico *Egr1* son consistentes con la hipótesis de tetraploidia propuesta por Gallardo et al., (1999) al encontrarse cuatro señales discretas en los núcleos interfásicos de *T. barrerae*. Este resultado contrasta con lo obtenido en el control, donde se observaron sólo dos señales. El análisis estadístico apoya fuertemente a lo observado en PCR *in situ*, al mostrar que la distribución de señales del gen *Egr1* en *T. barrerae* es significativamente distinta y mayor que *M. musculus* (χ^2= 208; P< 0,001). Por lo tanto, y en concordancia a lo anterior, se rechazó la hipótesis nula que suponía diploidia en *T. barrerae*. Es importante destacar, que las señales discretas observadas en el PCR *in situ,* corresponden a productos de amplificación retenidos en el tramado proteico (O´Leary et al., 1996). Por lo tanto, la condición tetráloga aquí observada sugiere la existencia de cuatro cromosomas en los cuales se encuentra el gen. Esta observación se sustentó con la PCR estándar al verificarse un sólo producto de amplificación tanto en *M. musculus* como en *T. barrerae* (Fig 1B). Esto último, confirmó el alto grado de conservación de gen (Spring, 1997; O`Donovan et al., 1999) y la especificidad de los partidores deducidos a partir de secuencias codificantes (Anexo I).

Los resultados obtenidos con el fragmento AR ligado al sexo indican tetraploidía en *T. barrerae* al mostrar por PCR *in situ* cuatro señales en las hembras y tres en los machos. En contraste, en los núcleos de *M. musculus* se observó dos señales en las hembras y sólo una en los machos. Al igual que con el fragmento del gen *Egr*1, la PCR estándar del fragmento AR, generó un sólo producto de amplificación (Fig 2B), lo que sugiere que las señales mostradas por PCR *in situ* corresponden a un mismo gen que se encuentra duplicado. También, los análisis estadísticos apoyan fuertemente esta observación al mostrar que la distribución de señales de *T. barrerae* es significativamente mayor y distinta a *M. musculus* ($\chi^2_{(3)}$ =287; P< 0,001 en hembras y $\chi^2_{(3)}$= 452; P< 0,001 en machos). La pequeña proporción de señales superior a dos que mostraron los núcleos control, fue consistente con el fenómeno de *mispriming* descrito por Gu (1994). Sin embargo su frecuencia observada no fue significativa. Por lo tanto y al igual que el fragmento del gen *Egr*1, se rechazó la hipótesis nula que suponía diploidía en *T. barrerae*.

Actualmente se sabe que las células de los machos *T. barrerae* presentan un corpúsculo de Barr, mientras que en las hembras se observan dos corpúsculos (M. Gallardo, comunicación personal). Esta observación es coherente con la emergencia de un mecanismo de compensación de dosis en tetraploides humanos, ya que sólo las células de hembras tetraploides presentan dos corpúsculos de Barr, mientras que en las hembras diploides se observa sólo un corpúsculo de Barr (Gotto y Monk, 1998; Lyon, 1998). Esto último, sumado a los resultados del PCR *in situ* obtenidos con el fragmento del gen *AR* (cuatro señales en hembras y tres en machos) y el alto grado de conservación que tienen los genes ligados al cromosoma X (O`Brien y Graves, 1990; Levan et al., 1991; Herman et al., 1996; Lyon et al., 1997), permiten sugerir en *T. barrerae* una composición XXXX en hembras y XXXY en machos.

En humanos, la duplicación del gen de copia única *AR*, ha sido relacionado con el cáncer de próstata en los hombres (Kaufman et al., 1990; Qian et al., 1998; Grossmann et al., 2001). Desde esta perspectiva, la duplicación del cromosoma X en *T. barrerae* y la supuesta presencia de dos cromosomas X activos, constituye una interrogante que aún no ha sido esclarecida. En mamíferos diploides, la inactivación del

cromosoma X es dependiente del fenómeno de *imprinting* y por lo tanto, se expresa sólo un cromosoma X en ambos sexos (Gotto y Monk, 1998). Sin embargo en *T. barrerae,* no se conoce si los dos cromosomas supuestamente activos se encuentran transcripcionalmente activos y expresan por duplicado los genes ligados al cromosoma X. Adicionalmente, la lógica de relacionar genes de copia única con cromosomas, ha sido la base para postular una ronda de duplicación en el genoma de *Saccharomyces cerevisiae* y dos rondas en vertebrados al mostrar ambos un incremento en el número de genes parálogos (Spring,1997; Ruvinsky et al., 2000). Sin embargo, no existe evidencia que relacione en términos evolutivos la duplicación de cromosomas sexuales con los eventos de poliploidización sugeridos en vertebrados. Esto último puede deberse probablemente a que estas duplicaciones ocurrieron antes de la aparición de cromosomas sexuales heteromórficos (Leipoldt, 1983).

La función matemática $y = f_i x1/x + C$ utilizada para ajustar la distribución de señales en núcleos interfásicos constituye una novedad en la interpretación del PCR *in situ.* Si se considera por ejemplo que el gen *Egr1* tiene dos copias en un genoma diploide, entonces la distribución de señales de *M. musculus* no refleja estadísticamente esa realidad. Por lo tanto, se puede inferir que los productos de amplificación son un reflejo de la probabilidad que tienen los partidores de encontrar dos sitios distintos en el núcleo interfásico. De esta manera, al graficar la función $y = fx1/x + C$ se puede concluir que la distribución en núcleos de *T. barrerae* no se ajusta a un modelo diploide, sino que más bien, refleja una duplicación proporcional al número de señales observadas en *M. musculus*. Lo mismo ocurre con el fragmento del gen AR. Sin embargo, las diferencias en el número de señales entre machos y hembras confirman que *AR* es un gen ligado al cromosoma X.

Metodológicamente, la duplicación de un genoma ha sido también probado con ensayos de Southern blot. De esta manera, al utilizar sondas de copia única y digerir el ADN con diversas endonucleasas de restricción, se puede establecer el número de loci génicos o sus alelos respectivos (Small y Wendel, 2000). Actualmente se acepta que los patrones de variabilidad alélica son consecuencia de la inserción o delección de regiones hipervariables entre los sitios de restricción o, a la presencia y/o ausencia de los mismos (Mueller y Wolfenbarger, 1999). En ambos casos, la probabilidad de

revelar la variabilidad alelica es baja, pues se requieren varias enzimas y un mayor número de sondas para detectar dicho polimorfismo (Smouse y Chevillon, 1998). Sin embargo, cuando se considera un genoma híbrido, la existencia de dos o más loci debería reconocerse con la mayoría de las enzimas utilizadas, debido a la diferencia intrínseca de dos genomas con evolución diferencial en un mismo núcleo (Small y Wendel, 2000). Esta lógica, ha sido la base para demostrar (con el gen de copia única *ACCasa; Acetyl-CoA carboxilase*) la presencia de tres cromosomas homeólogos en el genoma hexaploide del trigo (Gornicki et al., 1997). También ha servido para probar (con el gen de la *B-tubulina*) la duplicación génica de *H. Capsulatum*, un hongo patogénico (Carr y Shearer, 1998). Por ejemplo en el algodón (Gossypium), se utilizó un fragmento del gen *AdhA* (*Alcohol dehydrogenase A*) que no es reconocido por las enzimas utilizadas en la digestión. Los análisis de Southern blot, mostraron consistentemente dos bandas de hibridación y en algunos casos hasta tres. Así, se infirió que cada banda sobre la autorradiografia corresponde a un locus *AdhA*. Por lo tanto, la presencia de una tercera banda fue discutida en términos de una probable y única duplicación del genoma ocurrida en un ancestro, previo a la diversificación del linaje del algodón (Small y Wendel, 2000). Adicionalmente, el uso de genes de copia única, ha servido para demostrar novedosos mecanismos de eliminación cromosómica somática en marsupiales. Por ejemplo, en los machos del marsupial australiano *Isoodon macrourus*, los análisis de Southern blot confirmaron un mecanismo de compensación de dosis basado en eliminación cromosómica (Watson et al., 1998). Para tales efectos se utilizó una sonda de copia única del gen *Sry* (*Sex determining region Y*; marcador del cromosoma Y) y otra sonda control de copia única del gen *G6PD*, (*Glucose 6 phosphate dehydrogenase*; marcador del cromosoma X). La prueba con *Sry* no mostró bandas en los tejidos carentes del cromosoma Y en machos, mientras que la prueba de control con *G6PD* mostró consistentemente sólo una banda indicando de esta manera la condición X0 en los tejidos analizados.

Mis análisis de Southern blot del genoma de dos machos y una hembra *T. barrerae* mostraron duplicación génica y permitieron confirmar los resultados de PCR *in situ*. De esta manera, la sonda homóloga del gen *AR* digerida con *Eco*RI, *Bam*HI y *Hind*III mostró claramente dos bandas de hibridación en los genomas de

T. barrerae y *P. aureus*. Como la sonda no es reconocida por ninguna de las enzimas utilizadas, entonces la presencia de dos bandas en machos y hembras de *T. barrerae* indica que hay al menos otro locus y por ende que el gen AR se encuentra duplicado. Esta observación es coherente con la presencia de una banda en los taxa diploides (*O. mimax* y *O. gliroides*), sugiriendo que no existe otra secuencia relacionada. Otra evidencia indirecta de duplicación es la densidad de las bandas sobre la autorradiografía, donde se puede observar un aumento del grosor de las mismas en *T. barrerae* y *P. aureus* en comparación a las especies diploides. La similitud de los patrones de restricción entre *T. barrerae* y *P. aureus* muestra que ambos genomas se encuentran estrechamente relacionados. Adicionalmente la digestión con *Pst*I mostró sólo una banda sugiriendo que la sonda *Ty-AR*$_{145}$ reconoce el sitio *pst*I pero no discrimina entre loci duplicados. La ausencia de bandas de hibridación en algunos carriles control, sugiere que la sonda homóloga al ADN de *T. barrerae* no hibridó adecuadamente con el ADN de *M. musculus* a pesar de tener una similitud del 97% respecto a igual región del genoma (Anexo III).

Desde una perspectiva evolutiva, los ensayos de Southern blot pueden ayudar también a establecer el origen auto o alopoliploide. La lógica del argumento es que en los alopoliploides estables, los cromosomas homólogos derivados de cada progenitor se aparean y recombinan en la metafase; pero el apareamiento entre cromosomas homeólogos habitualmente no existe (Pikaard, 2001). La consecuencia es una forma permanente de “heterocigocidad” en el cual uno de los alelos de cada progenitor es transmitido a cada gameto. En contraste en los autopoliploides, la cromátida hermana esencialmente idéntica puede recombinar y segregar aleatoriamente resultando un estado de homocigosis significativamente idéntico a lo que podría ocurrir en un diploide (Pikaard, 2001). Al observar los blot digeridos con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III, los análisis de Southern blot sugieren una tercera banda de hibridación. Si se supone que estas bandas son alelos, y se toma en cuenta que la sonda es un marcador del cromosoma X, entonces los resultados sugieren alopoliploidía, debido a que si se tratara de un autopoliploide, se esperarían como máximo dos bandas.

La alopoliploidía en *T. barrerae* también ha sido sugerida por la presencia de bivalentes heteromórficos en la meiosis (Lanzone et al., 2001). Adicionalmente, la

observación de dos regiones organizadoras del nucléolo en el cariotipo de *T. barrerae* al igual que un mamífero diploide, también podría ser evidencia de un genoma híbrido. Esto se debe a que cuando se origina una especie por alopoliploidización, los genes rRNA heredados de uno de los progenitores son silenciados por mecanismos epigenéticos como la hipermetilación del ADN y la acetilación de las histonas que forman la cromatina (Chen y Pikaard, 1997). Este fenómeno se conoce como dominancia nucleolar y ha sido ampliamente descrito en alopoliploides sintéticos y en poblaciones naturales de *Xenopus* híbridos (Reeder, 1985), algunos insectos y *Arabidopsis* (Pikaard, 2000). Actualmente se acepta que el estado de dominancia nucleolar es controlado por los niveles de transcripción de la RNA *pol* I. Sin embargo los mecanismos de discriminación entre los progenitores permanecen desconocidos (Matthew et al., 1998).

También permanecen relativamente desconocidos los mecanismos celulares que permiten que un genoma se duplique. Así, se estima que el mecanismo más habitual es la endorreduplicación, donde los genomas se duplican sin que exista una división celular. Este fenómeno es común en muchos organismos en donde la cromátida permanece asociada formando cromosomas politénicos, y ha sido descrita en diversos tejidos y taxa (Leitch, 2000). Un segundo mecanismo es la endomitosis y ocurre cuando los cromosomas se condensan como si entraran en mitosis, pero no segregan, quedando los núcleos con la "carga del genoma anterior" (Leitch y Bennett, 1997). Desde esta perspectiva la novedad evolutiva que representa *T. barrerae* podría ayudar a esclarecer algunas interrogantes. Por ejemplo, en organismos normalmente diploides, existe una tendencia de ciertas células a permanecer en un estado de poliploidía. Este fenómeno conocido como endopoliploidía ha sido descrito en distintos organismos (incluido el hombre) y es especialmente común en artrópodos y angiospermas (Galbraith et al., 1991). Los altos niveles de endopoliploidía son típicos de células involucradas en la secreción o intensa producción de proteínas (Gregory y Hebert, 1999). Por lo tanto, se podrían comparar los niveles de ploidia entre los megacariocitos (que normalmente son poliploides) y las células de *T. barrerae*. Así, se tendría un excelente modelo de estudio que permitiría entender los mecanismos que modulan la variación intraindividual del contenido de ADN.

Finalmente, las expectativas que ofrece el estudio de la duplicación del genoma de *T. barrerae* son muchas. Por ejemplo, si se considera que su proceso de poliploidización ocurrió hace aproximadamente 6,5 millones de años (Gallardo y Kirsch, 2001), entonces el estudio de algunos genes duplicados permitiría conocer la tasa de erosión genética para que la copia extra derive en un pseudogen. Con ello se tendrían estimaciones más recientes de la tasa de deterioro de genes duplicados en donde sólo uno de ellos es funcional.

5. CONCLUSIONES

La técnica de PCR *in situ*, mostró cuatro señales del gen autosómico *Egr*1 en los núcleos interfásicos de *T. barrerae* sugiriendo una condición tetrasómica del mismo.

Se observaron cuatro señales del gen AR (ligado al cromosoma X), sugiriendo una composición XXXX en las hembras. Adicionalmente se observaron hasta tres señales sugiriendo una composición XXXY en los machos.

Las pruebas estadísticas indicaron diferencias altamente significativas entre la distribución de señales en núcleos *T. barrerae* respecto a los de *M. musculus,* descartando de esta manera la hipótesis nula que supone diploidía en *T. barrerae*.

Los análisis de Southern blot en machos y hembras *T. barrerae* confirmaron los ensayos de PCR *in situ* al mostrar dos bandas indicadoras del gen *AR*, lo que sugiere la presencia de dos loci génicos.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Altschul, S., Maddlen, T., Schäffer, A., Zhang, J., Miller, W., and Lipman, D. (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleics Acids Res*., 25: 3389-3402.

Brooke N., Garcia-Fernández, J., and Holland, P. (1998). The ParaHox gene cluster is an evolutionary sister of the Hox gene cluster. *Nature,* 392: 920-922.

Burch, J., and Huber, J. (1966). Polyploidy in mollusks. *Malacologia*, 5: 41-43.

Carr, J., and Shearer, G. (1998). Genome size, complexity, and ploidy of the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum. J. Bacteriol.*, 180: 6696-6703.

Chen, Z., and Pikaard, C. (1997). Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription: a role for DNA methylation and histone modification in nuclear dominance. *Genes Dev*., 11: 2124-2136.

Contreras, J., Torres-Mura, J., and Spotorno, A. (1990). The highest chromosomal number for a mammal in a South American desert rodent. *Experientia*, 46: 506-508.

Cremer, T. (1980). Rabl`s model of the interphase chromosome arrangement tested in Chinese hamster cell by premature chromosome condensation and laser-UV-microbeam experiments. *Hum. Genet*., 60: 46-56.

Dufresne, F., and Hebert, P. (1994). Hybridization and origins of polyploidy. *Proc. R. Soc. Lond*. *B*., 258: 141-146.

Erlich, H., Gelfand, D., and Saiki, R. (1988). Specific DNA amplification. *Nature,* 331: 461- 462.

Feinberg, A., and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to the high specific activity. *An. Biochem*., 123: 6-13.

Galbraith, D., Harkins, K., and Knapp. (1991). Systemic endopolyploidy in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*. 96: 985-989.

Gallardo, M. (1997) . A saltation model of karyotypic evolution in the Octodontidea (Mammalia, Rodentia). En: Henríques-Gil N. y Parker J.S. (eds.). *Chromosomes Today*, Vol. 12. Chapman and Hall, London, pp. 347-365.

Gallardo, M., and Kirsch, J. (2001). Molecular relationships among octodontidae (Mammalia: Rodentia: Caviomorpha). *J. Mamm. Evol*., 8:73-89.

Gallardo, M., Bickham, J., Kausel, G., Köhler, N., and Honeycutt, R. (2003). Gradual and quantum genome size shifts in the hystricognath rodents. *J. Evol. Biol*. 18: 1-7.

Gallardo, M., Bickham, J., Honeycutt, R., Ojeda, R., and Köhler, N. (1999). Discovery of tetraploidy in a mammal. *Nature,* 401: 341.

Goldman, M., and Lo Verde, P. (1983). Hybrid origin of polyploidy in freshwater snails of the genus *Bulinus* (Mollusca. Planorbidae). *Evolution,* 37: 592-600.

Gornicki, P., Faris, J., King, I., Podkowinski, J., Bikram, G., and Haselkorn, R. (1997). Plastid-localized acetyl-CoA carboxilase of bread wheat is encoded by a single gene on each of the three ancestral chromosome sets. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94: 14179-14184.

Goto, T., and Monk, M. (1998). Regulation of X-chromosome inactivation in development in mice and humans. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*., 62:362-378.

Gregory, R., and Hebert, P. (1999). The modulation of DNA content: proximate causes and ultimate consequences. *Genome Res*., 9: 317-324.

Grossmann, M., Huang, H., and Tindall, D. (2001). Androgen receptor signaling in androgen-refractory prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 93: 1687-1697.

Gu, J. (1994). Principles and application of *In situ* PCR. *CellVision ,*1, 8-19.

Haaf, T., and Schmid, M. (1981). Chromosome topology in mammalian interphase nuclei. *Exp. Cell Res*., 192: 325-332.

Herman, G., Blair, H., Boyd, Y., Brown, S., Gouyon, B., Haynes, A., and Quaderi, N. (1996). Mouse X chromosome*. Mamm. Genet.,* 6:317-330.

Hochstrasser, M., and Sedat, J. (1987). Three-dimensional organization of *Drosophila melanogaster* interphase nuclei II. Chromosome spatial organization and gene regulation. *J. Cell Biol*., 104: 1471-1483.

Holland, P. (1999). Introduction: gene duplication in development and evolution. *Sem. Cell. Dev. Biol*., 10: 515-516.

Kaufman, M., Pinsky, L., Gottlieb, B., Schweitzer, M., Brezezinski, B., Westarp,C., and Ginsberg, J. (1990). Androgen receptor defects in patients with minimal and partial androgen resistance classified according to a model of androgen-receptor complex energy states. *Hormones Res.*, 33: 87-94.

Kibbelaar, R., Kok, F., Dreef, E., Kleiverda, J., Cornelisse, C., Raap, A., and Kluin, P. (1993). Statistical methods in interphase cytogenetics: an experimental approach. *Cytometry*, 14: 716-724.

Kohler, N., Gallardo, M., Contreras, L., and Torres-Mura, J. (2000). Allozymic variation and systematic relationships of the Octodontidae and allied taxa (Mammalia, Rodentia). *J. Zool.,* (*Lond.*). 252: 243-250.

Komminoth, P., Long, A., Ray, R., and Wolfe, H. (1993). *In situ* polimerase chain reaction detection of viral DNA single copy genes and gene re- arrangements in cell suspensions and cytospins. *Diagnosis Mol. Pathol*., 1: 85-97.

Lanzone, C., Bidau, C., Gallardo, M., and Santos, J. (2001). Male meiosis in a rodent with 2n=102 chromosomes, *Tympanoctomys barrerae* (Octodontidae). *Chromosome Res.*, 9:129.

Lederberg, E. and Cohen, S. (1974). Transformation of *salmonella typhymurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol*., 119: 1.072-1.074.

Lee, J. and Jaenisch, R. (1997). Long-range cis effects of ectopic X-inactivatión centres on a mouse autosome. *Nature,* 386: 275-279.

Leipoldt, M. (1983). Towards an understanding of the molecular mechanisms regulating gene expression during diploidization in phylogenetically polyploid lower vertebrates. *Hum. Genet.,* 65: 11-18.

Leitch, A. (2000). Higher levels of organization in the interphase nucleus of cycling and differentiated cell. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*., 64: 138-152.

Leitch, I., and Bennett. (1997). Polyploidy in angiosperms. *Trends Plant Sci*., 12: 470-476.

Levan, G., Szpirer, J., Szpirer, C., Klinga, K., Hanson, C., and Islam, M. (1991). The gene map of the norway rat (*Rattus norvegicus*) and comparative mapping with mouse and man. *Genomics,* 10: 699-718.

Lyon, M. (1998). X-Chromosome inactivation: a repeat hypothesis. *Cytogenet. Cell Genet*., 80: 133-137.

Lyon, M., Cocking, Y., and Gao, G. (1997) Mouse chromosome atlas. *Mouse Genome*. 95: 29-78.

Maniatis, T., Fritsch, E. and Sambrook, J. (1982). Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, N.Y.

Manuelidis, L. (1990). A view of interphase chromosomes. *Science*, 250: 1533-1540.

Martinez, A., Miller, M., Quinn, K., Unsworth, E., Ebina, M., and Cuttitta, F. (1995). Non-radiactive localization of nucleic acids by direct *in situ* PCR and *in situ* RT-PCR in paraffin-embedded sections. *J. Histochem Cytochem*., 43: 739-747.

Masterson, J. (1994). Stomatal size in fossil plants evidence for polyploidy in the majority of angiosperms. *Science,* 264: 421-424.

Matthew, F., Chen, Z., Saez-Vasquez, J., Shen, L., and Pikaard, C. (1998). RNA Polimerase I transcription in *Brassica* interspecific hybrid and its progenitors: test of transcription factor involvement in nucleolar dominance. *Genetics*, 152: 451-460.

Morrison, D. (1979). Transformation and preservation of competent bacterial cells by freezing. Colowick S. and Kaplan N. (eds.). En: Methods in Enzymology, 68: 326- 331. Academic Press, N.Y.

Mueller, U., and Wolfenbarger, L. (1999). AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol. Evol.*, 14: 389-394

Mullis, K., and Faloona, F. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polimerase catalized chain reaction. Colowick S. and Kaplan N. (eds.). En: Methods in Enzymology, 155: 335-350. Academic Press. N.Y.

Mutsuro, J., Nakao, M., Fujiki, K., and Yano, T. (2000). Multiples form of α_2-macroglobulin from a bony fish, the common carp (*Cyprinus carpio*): striking sequence diversity in functional sites. *Immunogenetics*, 51: 847-855.

Nakao, M., Osaka,K., Kato, Y., Fujiki,K., and Yano, Y. (2001). Molecular cloning of the complement C1r/C1s/MASP2-like serine proteases from the common carp (*cyprinus carpio*). *Immunogenetics,* 52: 255-263.

Nuovo, G. (1995). *In situ* RT-PCR detection of gelatinase mRNA in HeLa cells on the GENE Amp *In Situ* PCR System 1000. *Res. News. Perkin-Elmer/ Applied Biosystems Division.*

Nuovo, G., Plaia, T., Belinsky, S., Baylin, S., and Her, J. (1999). *In situ* detection of the hypermethylation- induced inactivation of the p16 gene as an early event in oncogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci*., 96: 12754-12759.

O`Brien, S., and Graves, J. (1990). Report of the committee on comparative gene mapping. *Cytogenet. Cell Genet*. , 55: 406-433.

O`Donovan, K., Tourtellotte, W., Milbrandt, J., and Baraban, J. (1999). The EGR family of transcription- regulatory factors: Progress at the interface of molecular and systems neuroscience. *Trends Neurosci*., 22: 167-173.

Ohno, S., Wolf, U., and Atkim, N. (1968). Evolution from fish to mammals by gene duplication. *Hededitas,* 59:169-187.

Ohta, T. (1994). Further examples of evolution by gene duplication revealed through DNA sequence comparisons. *Genetics*, 138: 1331-1337.

O`Leary, J., Chetty, R., Graham, K., and Mcgee. (1996). *In situ* PCR: Pathologist`s dreams or nightmare?. *J. Pathol*., 178: 1-10.

Orr, H. (1990). “Why polyploidy is rarer in animals than in plants”. *Revisited Amer. Nat*., 136: 759-770.

Otto, S., and Whitton, J. (2000). Polyploidy incidence and evolution. *Annu. Rev. Genet.* 34: 401-437.

Parkhurst, S., and Meneely, P. (1994). Sex determination and dosage compensation: lessons from flies and worms. *Science*, 264: 924-932.

Pikaard, C. (2000).The epigenetics of nuclear dominance. *Trends Genet*., 16: 495-500.

Pikaard, C. (2001). Genomic change and gene silencing in polyploids. *Trends Genet*., 17: 675-677.

Postlethwait, J., Woods, I., Ngo-Hazelett, P., Yan, Y., Kelly, P., Chu, F., Huang, H., Hill-Force, A., and Talbot, W. (2000). Zebrafish comparative genomics and the origins of vertebrate chromosomes. *Genome Res.,* 10: 1890-1902.

Postlethwait, J., Yan, Y., Gates, M., Horne, S., Amores, A., Brownlie, A., Donovan, A., Egan, E., Force, A., and Gong, Z. (1998). Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map. *Nature Genet*., 18: 345-349.

Qian, J., Jenkins, R. and Bostwick, D. (1998). Determination of gene and chromosome dosage in prostatic intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Anal. Quant. Cytol. Histol.,* 20: 373-380.

Ray, R., Komminoth, P., Macado, M., and Woffe, H. (1991). Combined polimerase chain reaction and *in situ* hybridisation for the detection of single copy genes and viral genome sequences in intact cells. *Modern Pathol*., 4:124.

Reeder, R. (1985). Mechanisms of nucleolar dominance in animals and plants. *J. Cell Biol.,* 101: 2013-2016.

Ruvinsky, I., Silver, L., and Gibson-Brown, J. (2000). Phylogenetic analysis of T-Box genes demonstrates the importance of amphioxus for understanding evolution of the vertebrate genome. *Genetics,* 156: 1249-1257

Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Higuchi, S., Horn, G., Mullis, K., and Erlich, H. (1988). Primer-Direct enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491.

Sambrook, J., Frisch, E., and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, N.Y.

Schwarzacher, T., and Heslop-Harrison P. (1995). Preparation of chromosome spreads. BIOS Scientific Publishers. En: Practical *in situ* Hybridization. Pag 68-70. Oxford, UK.

Sharp, P., Sugden, B., and Sambrook, J. (1973). Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry,* 12: 3.055.

Sidow, A. (1996). Gen(om)e duplications in the evolution of early vertebrates. *Curr. Opin. Genet. Dev.,* 6: 715-722.

Simmen, M., Leitgeb, S., Clark, V., Jones, S., and Bird, A. (1998). Gene number in an invertebrate chordate *Ciona intestinalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci*., 95: 4437-4440.

Skrabanek L., and Wolfe, K. (1998). Eukaryote genome duplication- where`s the evidence?. *Curr. Opinion Genet. Dev*., 8: 694-700.

Small, R., and Wendel, J. (2000). Phylogeny, duplication, and intraspecific variation of Adh sequences in new world diploid cottons (*Gossypium L., Malvaceae*). *Mol. Phylogenet. Evol.,* 16: 73-84.

Smith, R., Wiese, B., Wojzynski, M., Davison, D., and Worley, K. (1996) BCM Search Launcher -An Integrated Interface to Molecular Biology Data Base Search and Analysis Services Available on the World Wide Web. *Genome Res*., 6: 454-62.

Smouse, P., and Chevillon, C. (1998). Analytical aspects of population-specific DNA fingerprinting for individuals. *J. Heredity*, 89: 143-150.

Soltis, D., and Soltis, P. (1993). Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. *Crit. Rev. Plant Sci*., 12: 243-273.

Soltis, D., and Soltis, P. (1995).The dynamic nature of polyploid genomes. *Proc. Natl. Acad, Sci*., 92: 8089-8091.

Soltis, P., and Soltis, D. (2000). The role of genetics and genomic attributes in the success of polyploids. *Proc. Natl. Acad, Sci*., 97: 7051-7057.

Song, K., Tang, K., and Osborn, T. (1995). Rapid genome change in syntetic polyploids of *Brassica* and its implications for polyploid evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci*., 92: 7719-7723.

Southern, E. (1975). Detection of specific sequences amoung DNA fragments by gel electroforesis. *J. Mol. Biol.,* 98: 503-517.

Spotorno, A., Walker, L., Contreras, L., Torres, J., Fernández-Donoso, R., Berríos, M., and Pincheira, J. (1995). Chromosome divergence of *Octodon lunatus* and *Abrocoma bennetti* and the origins of Octodontoidea (Rodentia: Histricognathi). *Rev. Chilena. Hist. Nat*. 68: 227-239.

Spring, J. (1997). Vertebrate evolution by interspecific hybridisation – are we poliploid? *FEBS Lett.,* 400: 2-8.

Stadler, T., Loew, M., and Streit, B. (1993). Genetic evidence for low outcrossing rates in polyploid freshwater snails (*Cylus fluviatilis*). *Proc. R. Soc. Lond. B.,* 251: 207-213.

Stadler, T., Loew, M., and Streit, B. (1995). Genetic and mating systems of polyploid freshwater hermaphroditc snails. *Malacological Rev*., 6: 121-127.

Thompson, J., Higgins, D., and Gibson, T. (1994). Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleics Acids Res*., 22: 4673-4680.

Wang, E., Kitson, J., Then, A., Williamson, J., Farrow, S., and Owen, M. (2001). Genomic structure, expression, and chromosome mapping of the mouse homologue for the WSL-1 (DR3, Apo3, TRAMP, LARD, TR3, TNFRSF12) gene. *Immunogenetics*, 53:59-63.

Watson, C., Margan, S., and Johnston, P. (1998). Sex-chromosome elimination in the bandicoot *Isoodon macrourus* using Y- linked markers. *Cytogenet. Cell Genet*., 81: 54-59.

Wendel, J. (2000) Genome evolution in polyploids. *Plant Mol. Biol.,* 42: 225-249.

Wolfe, K. (2001). Yesterday`s polyploids and the mystery of diploidization. *Nature Rev*., 2: 333-341.

ANEXO I. Alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas en CLUSTAL W (1.82).

A) Alineación de secuencias nucleotídicas del gen *Egr1*. Se indica el número de acceso al banco de genes y el nombre de la especie utilizada. La flecha muestra la región conservada a partir de la cual se dedujo el partidor en sentido y antisentido.

```
AJ243425  Homo_gene_egr1        TATTC--TCAGAGCATGTGTCAGAGTGTTGTTCCGTTAACCTTTTTGTAA 5622
NM_001964 Homo_EGR1_mRNA        TATTC--TCAGAGCATGTGTCAGAGTGTTGTTCCGTTAACCTTTTTGTAA 2556
MN_012551 Mus_Egr1_mRNA         GTATTAACTGGAGCATGTGTCAGAGTGTTGTTCCGTTAA---TTTTGTAA 2528
M18416    Rat_NGFI-A_           GTATTAACTGGAGCATGTGTCAGAGTGTTGTTCCGTTAA---TTTTGTAA 2528
MN_007913 Mus_Egr1_mRNA         GTATTAACTGGAGCATGTGTCAGAGTGTTGTTCCGTTAA---TTTTGTAA 3930
M20157    Mouse_Egr-1_mRNA      GTATTAACTGGAGCATGTGTCAGAGTGTTGTTCCGTTAA---TTTTGTAA 2509
```

```
AJ243425  Homo_gene_egr1        ATACTG-CTTGACCGTA-CTCTCACATGTGGCAAAATATGGTTTGGTTTT 5670
NM_001964 Homo_EGR1_mRNA        ATACTG-CTTGACCGTA-CTCTCACATGTGGCAAAATATGGTTTGGTTTT 2604
MN_012551 Mus_Egr1_mRNA         ATACTG-CTCGACTGTAACTCTCACATGTGACAAAATACGGTTTGTTTGG 2577
M18416    Rat_NGFI-A_           ATACTG-CTCGACTGTAACTCTCACATGTGACAAAATACGGTTTGTTTGG 2577
MN_007913 Mus_Egr1_mRNA         ATACTG-CTCGACTGTAACTCTCACATGTGACAAAGTATGGTTTGTTTGG 3979
M20157    Mouse_Egr-1_mRNA      ATACTGGCTCGACTGTAACTCTCACATGTGACAAAGTATGGTTTGTTTGG 2559
```

```
AJ243425  Homo_gene_egr1        TCTTTTTTT------TTTTTGAAAG-------TGTTTTTTCTTCGTCCTT 5707
NM_001964 Homo_EGR1_mRNA        TCTTTTTTT------TTTTTGAAAG-------TGTTTTTTCTTCGTCCTT 2641
MN_012551 Mus_Egr1_mRNA         TTGGGTTTTTTGTTGTTTTTGAAAAAAAAATTTTTTTTTTGCCCGTCCCT 2627
M18416    Rat_NGFI-A_           TTGGGTTTTTTGTTGTTTTTGAAAAAAAAATTTTTTTTTTGCCCGTCCCT 2627
MN_007913 Mus_Egr1_mRNA         TTGGGTTTT-----GTTTTTGAGAA--------TTTTTTTGCCCGTCCCT 4016
M20157    Mouse_Egr-1_mRNA      TTGGGTTTT-----GTTTTTGAGAA--------TTTTTTTGCCCGTCCCT 2596
```

```
AJ243425  Homo_gene_egr1        TTGGTTTAAAAAGTTTCACGTCTTGGTGCCTTTTGTGTGATGCCCCTTGC 5757
NM_001964 Homo_EGR1_mRNA        TTGGTTTAAAAAGTTTCACGTCTTGGTGCCTTTTGTGTGATGCCCCTTGC 2691
MN_012551 Mus_Egr1_mRNA         TTGGTTTCAAAAGTTTCACGTCTTGGTGCCTTT-GTGTGACACACCTTGC 2676
M18416    Rat_NGFI-A_           TTGGTTTCAAAAGTTTCACGTCTTGGTGCCTTT-GTGTGACACACCTTGC 2676
MN_007913 Mus_Egr1_mRNA         TTGGTTTCAAAAGTTTCACGTCTTGGTGCCTTTTGTGTGACACGCCTTGC 4066
M20157    Mouse_Egr-1_mRNA      TTGGTTTCAAAAGTTTCACGTCTTGGTGCCTTTTGTGTGACACGCCTT-C 2645
```

B) Alineación de secuencias nucleotídicas del gen AR. Se indica el número de acceso al banco de genes y el nombre de la especie utilizada. La flecha muestra la región conservada a partir de la cual se dedujo el partidor en sentido y antisentido.

```
NM_7304900_Mus_mRNA          CTGGATTCTGTGCAGCCTATTGCAAGAGAGCTGCATCAGTTCACTTTTGA 2576
X59592   Mouse_mRNA          CTGGATTCTGTGCAGCCTATTGCAAGAGAGCTGCATCAGTTCACTTTTGA 2696
X53779   Mouse               CTGGATTCTGTGCAGCCTATTGCAAGAGAGCTGCATCAGTTCACTTTTGA 2608
J05454   Rat_gene            CTGGATTCTGTGCAGCCTATTGCAAGAGAGCTGCATCAATTCACTTTTGA 2582
M20132   homo_mRNA           CTGGACTCCGTGCAGCCTATTGCGAGAGAGCTGCATCAGTTCACTTTTGA 2998
M34233   HUMAn_mRNA          CTGGACTCCGTGCAGCCTATTGCGAGAGAGCTGCATCAGTTCACTTTTGA 2705
U94179   macaca_mRNA         CTGGACTCCGTGCAGCCTATTGCGAGAGAGCTGCATCAGTTCACTTTTGA 2564
U16366   Oryctolagus_mRNA    CTGGACTCTGTGCAGCCTATTGCAAGAGAGCTGCACCAGTTCACTTTTGA 2006
AF202775 Sus_mRNA            CTGGACTCTGTGCAGCCTATTGCACGAGAACTGCATCAGTTCACTTTTGA 2574
AF324243 Homo_mRNA           CTGGACTCCGTGCAGCCTATTGCGAGAGAGCTGCATCAGTTCACTTTTGA 1789
                             ***** ** **************  **** ***** ** ***********
```

```
NM_7304900_Mus_Ar_mRNA       CCTGCTAATCAAGTCCCATATGGTGAGCGTGGACTTTCCTGAAATGATGG 2626
X59592   Mouse_mRNA          CCTGCTAATCAAGTCCCATATGGTGAGCGTGGACTTTCCTGAAATGATGG 2746
X53779   Mouse               CCTGCTAATCAAGTCCCATATGGTGAGCGTGGACTTTCCTGAAATGATGG 2658
J05454   Rat_gene            CCTGCTAATCAAGTCCCATATGGTGAGCGTGGACTTTCCTGAAATGATGG 2632
M20132   homo_mRNA           CCTGCTAATCAAGTCACACATGGTGAGCGTGGACTTTCCGGAAATGATGG 3048
M34233   HUMAn_mRNA          CCTGCTAATCAAGTCACACATGGTGAGCGTGGACTTTCCGGAAATGATGG 2755
U94179   macaca_mRNA         CCTGCTAATCAAGTCACACATGGTGAGCGTGGACTTTCCGGAAATGATGG 2614
U16366   Oryctolagus_mRNA    CCTGCTTATTAAGTCTCACATGGTGAGCGTAGACTTTCCAGAAATGATGG 2056
AF202775 Sus_mRNA            CCTGCTAATCAAGTCCCATATGGTGAGCGTGGACTTTCCAGAAATGATGG 2624
AF324243 Homo_mRNA           CCTGCTAATCAAGTCACACATGGTGAGCGTGGACTTTCCGGAAATGATGG 1839
                             ****** ** ***** ** *********** ******** **********
```

```
NM_7304900_Mus_Ar_mRNA        CAGAGATCATCTCTGTGCAAGTGCCCAAGATCCTTTCTGGGAAAGTCAAG 2676
X59592   Mouse_mRNA           CAGAGATCATCTCTGTGCAAGTGCCCAAGATCCTTTCTGGGAAAGTCAAG 2796
X53779   Mouse                CAGAGATCATCTCTGTGCAAGTGCCCAAGATCCTTTCTGGGAAAGTCAAG 2708
J05454   Rat_gene             CAGAGATCATCTCTGTGCAAGTGCCCAAGATCCTTTCTGGGAAAGTCAAG 2682
M20132   homo_mRNA            CAGAGATCATCTCTGTGCAAGTGCCCAAGATCCTTTCTGGGAAAGTCAAG 3098
M34233   HUMAn_mRNA           CAGAGATCATCTCTGTGCAAGTGCCCAAGATCCTTTCTGGGAAAGTCAAG 2805
U94179   macaca_mRNA          CAGAGATCATCTCTGTGCAAGTGCCCAAAATCCTTTCTGGGAAAGTCAAG 2664
U16366   Oryctolagus_mRNA     CAGAGATCATCTCTGTGCAAGTGCCCAAGATTCTTTCTGGGAAAGTCAAG 2106
AF202775 Sus_mRNA             CAGAGATCATCTCTGTGCAAGTGCCCAAGATTCTTTCCGGGAAAGTCAAG 2674
AF324243 Homo_mRNA            CAGAGATCATCTCTGTGCAAGTGCCCAAGATCCTTTCTGGGAAAGTCAAG 1889
                              **************************** ** ***** ************
```

```
NM_7304900_Mus_Ar_mRNA        CCCATCTATTTCCACACACAGTGA------------------------- 2700
X59592   Mouse_mRNA           CCCATCTATTTCCACACACAGTGAAGATTTGGAAA-CCCTAATACCCAAA 2845
X53779   Mouse                CCCATCTATTTCCACACACAGTGAAGATTTGGAAA-CCCTAATACCCAAA 2757
J05454   Rat_gene             CCCATCTATTTCCACACACAGTGA------------------------- 2706
M20132   Homo_mRNA            CCCATCTATTTCCACACCCAGTGAAGCATTGGAAA-CCCTATTTCCCCA- 3146
M34233   HUMAn_mRNA           CCCATCTATTTCCACACCCAGTGAAGCATTGGAAA-CCCTATTTCCCCA- 2853
U94179   Macaca_mRNA          CCCATCTATTTCCACACCCAGTGAAGCATTGGAAATCCCTATTTCCTCA- 2713
U16366   Oryctolagus_mRNA     CCCATCTATTTCCACACGCAGTGAAGCTTTGGAAGTGTCCATTTCCCTAA 2156
AF202775 Sus_mRNA             CCCATCTATTTTCACACACAGTGAAGCTTTGGAAGCCCCCATTTTCTCA- 2723
AF324243 Homo_mRNA            CCCATCTATTTCCACACCCAGTGA------------------------- 1913
                              *********** ***** ******
```

ANEXO II

a) Reactivos y proveedores:

En Sigma Chemical Co., fueron adquiridos los siguientes reactivos; ampicilina, SDS, azul de bromofenol, EDTA, ácido bórico, bromuro de etidio, citrato de sodio, RNAsa.

En NEN se adquirió α [^{32}P]dCTP (3000 Ci/mmol), film radiográfico, solución reveladora y fijador Kodak, adyuvante incompleto de Freund, adyuvante completo.

En Merck (Darmstadt, Alemania), se adquirió glicerol, etanol, isopropanol, metanol, tolueno, cloroformo, gelatina, maltosa, bálsamo del Canadá.

Del proveedor Gibco-BRL se usaron las enzimas de restricción *Eco*RI, *Hind*III, *Bam*HI y *Pst*I.

De Zymed laboratories: cromógeno NBT, sustrato de la fosfatasa alcalina BCIP.

De Boehringer Mannheim: 1 mM digoxigenina-11-dUTP, anticuerpos antidigoxigenina, fragmento fab, fosfatasa alcalina conjugada.

De Perkin- Elmer: AmpliCover Discs, AmpliCover Clips, *in situ* PCR glass slides.

ANEXO III. Comparación de los fragmentos Ty- *Egr*1$_{143}$ y Ty-*AR* $_{145}$ respecto a igual secuencia de *M. musculus* según *Blast search*. En (A) comparación con fragmento Ty-*Egr*1$_{143}$. En B comparación con fragmento Ty-*AR* $_{145}$.

A) >**NM_007913** *M. musculus*. Factor de crecimiento nervioso *Egr*1. $_{C}$DNA (4494 pb)

```
 Identidades = 69/79 (87%), Gaps = 6/79

T.barr: 68   caaaccatattttgtcac--gtgagagt-acggtcgagcaatatttacaaaaaggctaac 124
             ||||||||| ||||||||  |||||||| || |||||||| ||||||||||    ||||
M.mus: 3974  caaaccatactttgtcacatgtgagagttacagtcgagcagtatttacaaaat---taac 3918


T.barr: 125  ggaacaacactctgacaca 143
             ||||||||||||||||||
M.mus: 3917  ggaacaacactctgacaca 3899
```

Identidades = 36/38 (94%)

```
T.barr: 1    aaggcaccaagacgtgaaacttttaaaccaaaaggac 38
             ||||||||||||||||||||||| |||||||| ||||
M.mus: 4048  aaggcaccaagacgtgaaacttttgaaaccaaagggac 4011
```

B) > **X59592** M. musculus. Receptor de Andrógeno. $_{C}$DNA (2700 pb)

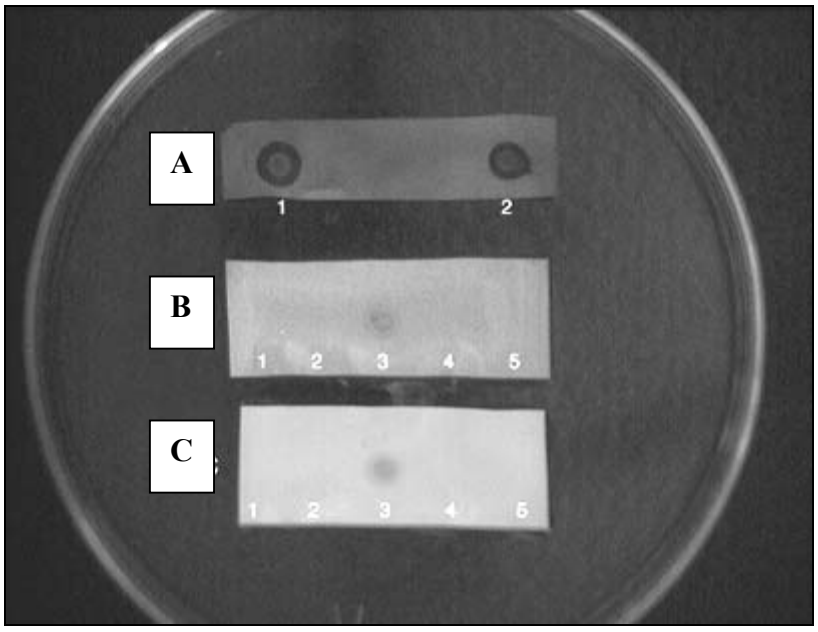
Identidades = 141/145 (97%)

```
T.barr: 1    gtgtgtggaaatagatgggcttgactttcccagaaaggatcttgggcacttgcacagaga 60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
M.mus: 2695  gtgtgtggaaatagatgggcttgactttcccagaaaggatcttgggcacttgcacagaga 2636


T.barr: 61   tgatctctgccatcatttccgggaagtccacgctcaccatgtgtgacttgattagcaggt 120
             |||||||||||||||||| || |||||||||||||||| || ||||||||||||||||
M.mus:  2635 tgatctctgccatcatttcaggaaagtccacgctcaccatatgggacttgattagcaggt 2576


T.barr: 121  caaaagtgaactgatgcagctctct 145
             |||||||||||||||||||||||||
M.mus: 2575  caaaagtgaactgatgcagctctct 2551
```

ANEXO IV. Control dilución Digoxigenona- antidigoxigenina.

Control I (A): Se muestran dos alícuotas de 1 y 2 µl en (1) y (2) respectivamente de una mezcla de reacción de PCR que contiene dUTP-digoxigenina (20nm). En (1) la dilución antidigoxigenina es 1:1000 y en (2) es de 1:2000 respectivamente. Se aprecia que no existen diferencias entre ambas diluciones. En la PCR *in situ* se utilizó la dilución 1: 2000.

Control II (B y C): Se muestran 2 membranas. En (1) 200 ng de pBlueScript., (2) 200 ng de pGEM-T-Easy *Ty-Egr1*(143)., (3) 200 ng de pGEM-T-Easy *Ty-AR* (146)., (4) 200 ng de pGEM-T-Easy *Ty-p53* (600) y (5) 2ul de TE (Tris-EDTA pH 8.0). Ambas membranas fueron híbridadas por 30 min con la sonda Ty-AR_{145} marcada con dUTP-Dig. En (B) la dilución de antidigoxigenida fue de 1:1000 y en (C) de 1:2000. Se puede observar la especificidad de los productos de amplificación al hibridar con pTy-AR_{145} (B3 y C3).



ANEXO V. Frecuencia de señales observadas (Obs) y esperadas (Esp) en núcleos de *T. barrerae* y valor de χ^2. A, frecuencia de señales observadas versus esperadas y valor de χ^2 del gen *Egr1* en núcleos de machos *T. barrerae*. B, frecuencia de señales observadas versus esperadas y valor de χ^2 del gen *AR* en núcleos de hembras *T. barrerae*. C, frecuencia de señales observadas versus esperadas y valor de χ^2 del gen *AR* en núcleos de machos *T. barrerae.*

A

Número de señales	Observadas *T. barrerae*	Esperadas *M. musculus*	(Obs- Esp)	$(O-E)^2/E$
1	44	65	-21	6,78
2	24	31	-7	1,58
3	18	2	16	128
4	14	2	12	72
P< 0,001				$\chi^2_{(3)} = 208,36$

B

Número de señales	Observadas *T. barrerae*	Esperadas *M. musculus*	(Obs- Esp)	$(O-E)^2/E$
1	46	53	-7	0,92
2	24	44	-20	9,09
3	17	1	16	256
4	13	2	11	60,5
P< 0,001				$\chi^2_{(3)} = 286,5$

C

Número de señales	Observadas *T. barrerae*	Esperadas *M. musculus*	(Obs- Esp)	$(O-E)^2/E$
1	47	93	-46	22,75
2	28	3	25	208,33
3	23	2	21	220,5
4	2	2	0	0
P< 0,001				$\chi^2_{(3)} = 451,6$

ANEXO VI. Sitios de restricción de la sonda *Ty-AR*$_{145}$ utilizada en los análisis de Southern Blot.

```
                                    MflI
                                    XhoII              MslI
gtgtgtggaaatagatgggcttgactttcccagaaaggatcttgggcacttgcacagagatgatctctgccatca Pares de bases
cacacacctttatctacccgaactgaaagggtctttcctagaacccgtgaacgtgtctctactagagacggtagt 1 a 75
                                    BstYI
                                    BstX2I


                          DraIII             BspMI
tttccgggaagtccacgctcaccatgtgtgacttgattagcaggtcaaaagtgaactgatgcagctctcta  Pares de bases
aaaggcccttcaggtgcgagtggtacacactgaactaatcgtccagttttcacttgactacgtcgagagat  76 a 145
```