



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO**

---

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE  
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA**

**INFORME FINAL  
DE SERVICIO SOCIAL**


**TÉCNICAS CITOGENÉTICAS SIMPLES PARA LA OBTENCIÓN DE  
METAFASE EN MITOSIS PARA PECES**


**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
BIÓLOGA  
PRESENTA**

**ESTEFANIA MARTINEZ FLORES**

**2153027600**

**ASESORES**

  
DR. LUIS AMADO AYALA PÉREZ, NO. ECO. 18075  
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE

  
DRA. BRENDA ILIANA VEGA RODRÍGUEZ, NO. ECO. 42784  
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE

**MÉXICO, CDMX.**

**NOVIEMBRE, 2023**

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>4</b>
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>4</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>8</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>9</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>9</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>19</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>20</b>

## RESUMEN

La citogenética ha permitido determinar el cariotipo de diversas especies y detectar alteraciones en los cromosomas. Se han implementado metodologías citogenéticas en peces que difieren en sus fases, en el origen de la muestra, en el medio de cultivo y en tiempos de exposición a los distintos reactivos. Lo anterior ha propiciado una confusión en la aplicación de las técnicas y en la calidad y el nivel de condensación de los cromosomas. El objetivo de este trabajo fue comparar y discutir técnicas citogenéticas simples para peces. Se realizó un análisis bibliográfico de técnicas citogenéticas. Se identificaron siete fases metodológicas: toma de muestra, estimulación de mitosis, inhibición del huso acromático, aumento del volumen celular, preservación celular, tinción y observación cromosómica. Se identificó que una de las principales diferencias en las técnicas es el tipo de muestra a utilizar, ya que se puede emplear tejido o linfocitos. El medio de cultivo (MEM, RPMI 1640 y TC- 199) y los tiempos de exposición (18 a 840 hrs.) varían dependiendo del autor. Para la inhibición acromática se utilizan concentraciones de colchicina de 0.1 a 0.25 mg/ml y con tiempos de exposición de 15 a 660 min, sin una relación lineal entre ambas variables ( $r^2 = 0.2039$ ). La concentración de KCL, utilizado para aumentar el volumen celular, generalmente es de 0.075 M y el tiempo de exposición es de 30 min. Para preservar el botón celular se utiliza una proporción etanol y ácido acético glacial de 3:1 en tiempos que varían de 0.16 a 10,080 min. La concentración del Giemsa para la tinción varía de 2% a 5% y con tiempos de exposición de 5 a 25 min. Se concluye que los medios de cultivo y periodos largo de exposición a la colchicina mejoran la calidad y cantidad de la dispersión de los cromosomas.

**Palabras clave:** mitosis, cromosomas, tiempos de exposición, cultivo celular.

## INTRODUCCIÓN

La citogenética es el estudio de los cromosomas y tiene como finalidad determinar el cariotipo de las especies (Waldeyer 1988; Mancera-Rodríguez *et al.* 2013). Se enfoca en el estudio de la organización, distribución y segregación del material genético; sus aplicaciones son: la identificación de especies, la particularidad cromosómica y el mejoramiento genético (Nirchio y Oliveira 2006).

Los primeros cromosomas en ser visualizados de manera experimental fueron en *Drosophila melanogaster* por Thomas H. Morgan en 1910 (Nikoloff y Ruiz 2021). El término cariotipo, posicionamiento ordenado de los cromosomas, fue propuesto por Levitsky en 1924 gracias a las mejoras en lentes ópticas, a las técnicas de tinción y a la manipulación de tejidos (Catanesi y Villegas-Castagnasso 2021). A partir de 1960 la caracterización en peces se hizo efectiva con las técnicas desarrolladas en tejidos para mamíferos y en cultivo de células (Booke 1968; Denton 1973). Sin embargo, el costo de los medios de cultivo, el uso de activadores mitóticos y el tiempo en técnicas *in vitro*, propició el uso de métodos directos (*in vivo*) (Osouf-Costaz y Foresti 1992).

Los estudios sobre los cromosomas en peces han brindado información valiosa sobre: mecanismos de determinación de sexo (Pisano *et al.* 2007; Rodríguez-Pulido *et al.* 2018; Zhang *et al.* 2019; Enriquez-Valencia *et al.* 2022), biodiversidad (Bertollo *et al.* 2000; Fenocchio *et al.* 2000), clasificación taxonómica (Castorena-Sánchez *et al.* 1983; Durán-González *et al.* 1990; Nirchio y Oliveira, 2014), regiones organizadoras nucleolares (NORs) (Diniz *et al.* 2009; Nirchio *et al.* 2010; Alves *et al.* 2012), la existencia de cromosomas supernumerarios (Pauls *et al.* 1996; Arias-Rodríguez *et al.* 2008), el papel de la poliploidía en la evolución (Pineda *et al.* 2004; Alcantar-Vázquez 2016) y secuencias de ADN en los cromosomas (Martínez *et al.* 1996; Falco *et al.* 2006; Mani *et al.* 2011).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de la amplia diversidad ictiofaunística, los trabajos citogenéticos que se han realizado en las diferentes especies son limitados. Además, las técnicas citogenéticas utilizadas en peces presentan diferencias en sus fases, en el origen de la muestra, en el medio de cultivo y en tiempos de exposición a los distintos reactivos. Lo anterior ha propiciado una confusión en la aplicación de las técnicas y en la calidad y el nivel de condensación de los cromosomas (Rocco 2015).

## MARCO TEÓRICO

### a. Ciclo celular y mitosis

El ciclo celular es la secuencia cíclica de procesos en la vida de una célula eucariota que conserva la capacidad de dividirse (Rivera 2008). Un ciclo celular típico está constituido por dos fases principales, la interfase y la mitosis (Cruz, 2009). La etapa durante la cual una célula no se divide se llama *interfase*, que se subdivide en tres períodos G1, S y G2, en este periodo se efectúa la síntesis del ADN y consecuentemente la duplicación de los cromosomas (Nirchio y Oliveira 2006). Al período de duplicación cromosómica se le llama S (por Síntesis). Este período es precedido por un período G1 (por *Gap*, hueco en inglés) y seguido por un período G2, durante los cuales la célula presenta actividad metabólica y crecimiento, pero no duplicación de cromosomas (Rodríguez-Gómez y Frías Vázquez 2014). La fase M o Mitosis es un proceso de división celular en el que dos células resultantes obtienen exactamente la misma información genética de la célula progenitora (Niessen 1986).

La mitosis es el proceso por el cual los cromosomas replicados se segregan en dos núcleos hijos, generalmente va acompañada de la citocinesis, que es la división del citoplasma y separación física de las dos células hijas (Núñez y Escalona 1993). Cuando una célula se divide, la información genética contenida en su ADN debe duplicarse de manera precisa y las copias se transmiten a cada célula hija, al

desplazarse mediante microtúbulos hacia un polo de la célula (Catorena *et al.* 1983; Nirchio y Oliveira 2006). Este proceso se caracteriza por dos eventos importantes la condensación y la segregación cromosómica haciendo posible su visualización a través del microscopio de luz y electrónico. A pesar de ser un proceso continuo se identifican cuatro etapas: profase, metafase, anafase y telofase (Niessen 1986; Núñez y Escalona 1993; Rivera 2008; Rodríguez-Gómez y Frías-Vázquez 2014):

1. *Profase*: Se caracteriza porque la cromatina se condensa para formar cromosomas que son visibles al microscopio como filamentos. Cada cromosoma parece estar constituido por dos copias, una junto a la otra y unidas por el centrómero. Los centriolos inician su viaje hacia los polos, se forma el huso mitótico y desaparece la envoltura nuclear.
2. *Metafase*: La condensación cromosómica iniciada en la profase continúa, dejando libres a los cromosomas en el citoplasma. Se observa a los cromosomas en metafase mitótica cada uno con dos cromátidas hermanas y se encuentran alineados en el centro de la célula.
3. *Anafase*: Es la etapa más corta, las cromátidas hermanas son separadas por las fibras del huso mitótico y son llevadas hacia los centriolos.
4. *Telofase*: los microtúbulos cinetocóricos desaparecen y las cromátidas hermanas ya se encuentran en los polos y la membrana nuclear se forma alrededor de cada conjunto de cromosomas. La división de la célula (citocinesis) se completa durante esta etapa. Durante la telofase tardía los cromosomas empiezan a transcribir y se restablece el nucleolo, marcando el término de la mitosis.

## **b. Cromosomas y cariotipo**

El cromosoma es el material genético visible durante la división celular, donde cada cromosoma está formado por una molécula de ADN duplicada altamente condensada (Cremer y Cremer 1988). En un cromosoma mitótico se puede identificar un brazo

corto (p), brazo largo (q), telómero y centrómero. El centrómero o constricción primaria es una región estrecha que divide al cromosoma en dos brazos, permitiendo así la clasificación de los cromosomas en cuatro tipos de acuerdo con su ubicación; metacéntrico (el centrómero se ubica en el centro del cromosoma), submetacéntrico (el centrómero se encuentra desplazado hacia un extremo), acrocéntrico (el centrómero está cerca del extremo del cromosoma) y telocéntrico (el centrómero está en el extremo del cromosoma) (Cairus *et al.* 2016).

El cariotipo es el juego completo que posee un organismo y se representa con un diagrama de los cromosomas metafásicos ordenados en grupos según su tamaño (Solari 2011)

### **c. Citogenética**

La citogenética se divide en 2 etapas: la citogenética clásica, simple o convencional y la citogenética molecular (Delgadillo 2021). La primera realiza análisis cromosómico por el cariotipo de rutina y por el cariotipo de alta resolución; y la segunda con hibridación *in situ* fluorescente (FISH), hibridación *in situ* fluorescente multicolor (M-FISH o SKY) o hibridación genómica comparada (CGH) (Gersen y Keagle 2013; Lawce y Brown 2017).

La citogenética convencional requiere la realización de cultivos celulares para la obtención de células mitóticas para detectar alteraciones numéricas y estructurales en los cromosomas (Cairus *et al.* 2016; Domínguez 2017). Los principales métodos aplicados en fauna pueden agruparse en:

1. Preparaciones de diversos tejidos (sangre, médula ósea, líquido amniótico, ganglio, hepatocitos, bazo, gónadas, masas o efusiones tumorales) tratados *in vivo* o *in vitro* con colchicina, sulfato de vinblastina o cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) (Ford y Hamerton 1956; Álvarez 1994; Hernández *et al.* 2002; Delgadillo 2021).

2. Preparaciones de sangre de los organismos inoculados con fitohemaglutinina (FHA) para inducir la mitosis de los leucocitos junto o seguido de colchicina o sulfato de vinblastina (Baker *et al.* 1972; Gutiérrez *et al.* 2016)
3. Cultivo *in vitro* de leucocitos con FHA y posterior tratamiento con colchicina o sulfato de vinblastina para detener la mitosis (Moorhead *et al.* 1960; Hastings *et al.* 1961). Una vez obtenidos los cromosomas de las células en cultivo estos se someten a un procedimiento de bandeo (Lawce y Brown 2017).

Con el perfeccionamiento de las técnicas de bandeo en 1971 se hizo posible analizar cada cromosoma individualmente y estudiar con mayor detalle las alteraciones cromosómicas mediante cinco tipos de análisis de los patrones de bandas citogenéticas (Islam y Levan 1987; Vázquez 2011; Domínguez 2017):

- Bandas Q: Aparecen como bandas fluorescentes y brillantes en contraste con otras no fluorescentes (Caspersson *et al.* 1970).
- Bandas C: Tiñen específicamente la heterocromatina de las regiones centroméricas (Arrighi y Hsu 1971).
- Bandas G: Se tiñen con Giemsa en forma de bandas transversales claras y oscuras (Matsui y Sasaki 1973; Lawce y Brown 2017).
- Bandas R: Representan lo contrario a las bandas G, si estas son oscuras, las R son claras en la tinción y viceversa (Dutrillaux y Lejeune 1971).
- Bandas Ag-NOR: Muestran las NORs, de los cromosomas acrocéntricos (Yunis 1976).

La tinción de bandas más utilizada es el bandeo G porque los cromosomas son expuestos a la acción enzimática controlada y al ser teñidos permite detectar aneuploidías (ganancias y/o pérdidas cromosómicas) y aberraciones estructurales (Yunis 1976; Lawce y Brown 2017).



Para la investigación citogenética se requiere de un método efectivo de preparaciones cromosómicas (Shao *et al.* 2010). Sin embargo, la estandarización de técnicas para la obtención de cromosomas distribuidos en peces difiere de acuerdo a cada especie (Karami *et al.* 2015); principalmente en los reactivos utilizados, las concentraciones y las cantidades de exposición (Rieder y Palazzo 1992). Las metodologías convencionales emplean un inhibidor del huso mitótico como la colchicina, que detiene las células en la metafase (Kligerman y Bloom 1977; Paz-y-Miño *et al.* 2007), el tiempo y concentración de éste va a determinar la obtención de una propagación cromosómica clara e identificable, sin son insuficientes no detendrán a las células en la etapa de metafase; y concentraciones excesivas o prolongadas pueden provocar una condensación cromosómica (Rieder y Palazzo 1992). Después, las células se incuban en una solución hipotónica adecuada, para garantizar que se hinchen y los núcleos se rompan (Moore y Best 2001; Paz-y-Miño *et al.* 2007) si el tiempo y la incubación son erróneos los cromosomas pueden superponerse o que exista una pérdida de los cromosomas (Baksi y Means 1988). A esto le sigue la fijación con Carnoy (3:1 metanol y ácido acético glacial), en una suspensión celular. La preparación del portaobjetos es importante, pues la evaporación del fijador y el precalentado de este puede afectar la calidad y la cantidad de la dispersión de los cromosomas mitóticos; y a la tinción (Moore y Best 2001; Wang *et al.* 2010, Delgadillo-Díaz 2021).

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Discutir y comparar técnicas citogenéticas simples para la obtención de metafase en mitosis para peces.

### **Objetivos específicos**

1. Describir las técnicas citogenéticas simples para la obtención de metafase en mitosis.

2. Clasificar las técnicas citogenéticas simples según sus diferencias y similitudes.
3. Analizar las ventajas y desventajas de las técnicas citogenéticas simples aplicadas en peces.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Para el desarrollo de esta investigación se realizó una revisión bibliográfica. Se consultaron siete bases de datos: PubMed Central, Google Academic, Springerlink, Scielo, Sci-Hub, Redalyc y Elsevier. Se consultaron 58 artículos científicos, 15 libros, 4 capítulos de libro y 7 tesis. Las palabras clave utilizadas fueron: citogenética, peces, técnicas simples, técnicas convencionales, colchicina.

El primer paso fue describir el proceso general de las técnicas citogenéticas mediante un diagrama. Posteriormente, se elaboró una tabla para describir y contestar las técnicas citogenéticas empleadas en peces. Finalmente, se discutieron las ventajas y desventajas de las diversas variantes de las técnicas citogenéticas con un énfasis en la obtención de la muestra (tejido o sangre) y en el uso de los reactivos.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En la revisión bibliográfica se identificaron varias propuestas de técnicas citogenéticas que han sido aplicadas en peces (Tabla 1), sin embargo, algunas de ellas han realizado adaptaciones a partir de otras aplicadas en reptiles, mamíferos o humanos (Bertollo 1978; Foresti *et al.* 1993).

Tabla 1. Técnicas citogenéticas aplicadas en peces.

No.	Fuente
1	Kligerman y Bloom (1977)
2	Bertollo <i>et al.</i> (1978)
3	Castorena-Sánchez <i>et al.</i> (1983)
4	Amemiya <i>et al.</i> (1984)
5	Fenocchio y Bertollo (1988)
6	Gold <i>et al.</i> (1990)
7	Moreira-Filho y Bertollo (1990)
8	Fenocchio <i>et al.</i> (1991)
9	Foresti <i>et al.</i> (1993)
10	Álvarez (1994)
11	Camacho-Garzón y Burbano (1999)
12	Parada-Guevara (2003)
13	Molina-Martínez <i>et al.</i> (2008)
14	Fabian-Rivera (2008)
15	Blanco <i>et al.</i> (2012)

Se identificaron siete pasos frecuentes para el procesamiento de preparaciones cromosómicas mitóticas (Figura 1). Una de las principales diferencias en las técnicas es el tipo de muestra a utilizar, ya que se puede emplear tejido o linfocitos. Once de los trabajos revisados utilizaron tejido (branquias, riñón, bazo, aletas y escamas) y los demás tomaron muestras de sangre (Tabla 2). Es importante mencionar que algunas de estas técnicas requieren de un pretratamiento con los organismos vivos para la estimulación mitótica. Molina-Martínez (2008), Castorena-Sánchez *et al.* (1983) y Álvarez (1994) aplicaron  $\text{CaCl}_2$  para aumentar las divisiones mitóticas. Esta solución se inyecta en la zona intraperitoneal, de dos a tres horas antes de administrar la colchicina.

Por otro lado, otros autores como Bertollo *et al.* (1978), Foresti *et al.* (1993) y Moreira-Filho y Bertollo (1990), agregan solución salina equilibrada de Hanks (por sus siglas en inglés, HBSS) a la caja de Petri que contiene al tejido. Esta solución se utiliza principalmente para lavar y resuspender las células en disociación (Lin *et al.* 2017; Biowest 2023). Hasan *et al.* (2017), mencionan que esta solución es ampliamente utilizada para la preservación de tejidos vivos.

Algunos estudios inician la técnica de manera invasiva o *in vivo* (sacrificio del animal) al experimentar dentro o en el tejido de un organismo vivo o muerto y otros de manera *in vitro* (cultivos celulares), siendo este un procedimiento sencillo pues no produce sufrimiento, ya que se recogen muestras de sangre o se administra alguna sustancia. La utilización de animales se ha vuelto más restrictiva por sensibilización o la implementación de métodos alternos, es por ello que se han creado leyes y normas que regulan el uso de animales en experimentación (Molina *et al.* 2018) y se ha desarrollado la citogenética de manera directa (Kligerman y Bloom 1977; Bertollo *et al.*, 1978; Castorena-Sánchez *et al.* 1983; Álvarez 1994; Molina-Martínez *et al.* 2008; Blanco *et al.* 2012). El órgano más utilizado en estos estudios es el riñón por su actividad hematopoyética, aunque las branquias también suelen ser muy utilizadas (Bertollo *et al.*1978). Para la proliferación celular en medios de cultivo completos se utiliza TC-199 (por sus siglas en inglés Tissue Culture Medium 199) y el RPMI 1640 (por sus siglas en inglés Roswell Park Memorial Institute<sup>1</sup>). Adicionalmente, hay estudios en donde se utilizan suplementos para favorecer el crecimiento celular, la fitohemaglutinina (FHA) y/o el suero fetal bovino (SFB).

---

<sup>1</sup> El RPMI se diseñó para un crecimiento óptimo de linfoblastos humanos. a través de muchos ensayos se han establecido los niveles de sus componentes. a lo largo de 25 años se han difundido diversos medios "RPMI 1640 modificados" con aumento en los niveles de aminoácidos y vitaminas (Moore y Hood 1993).

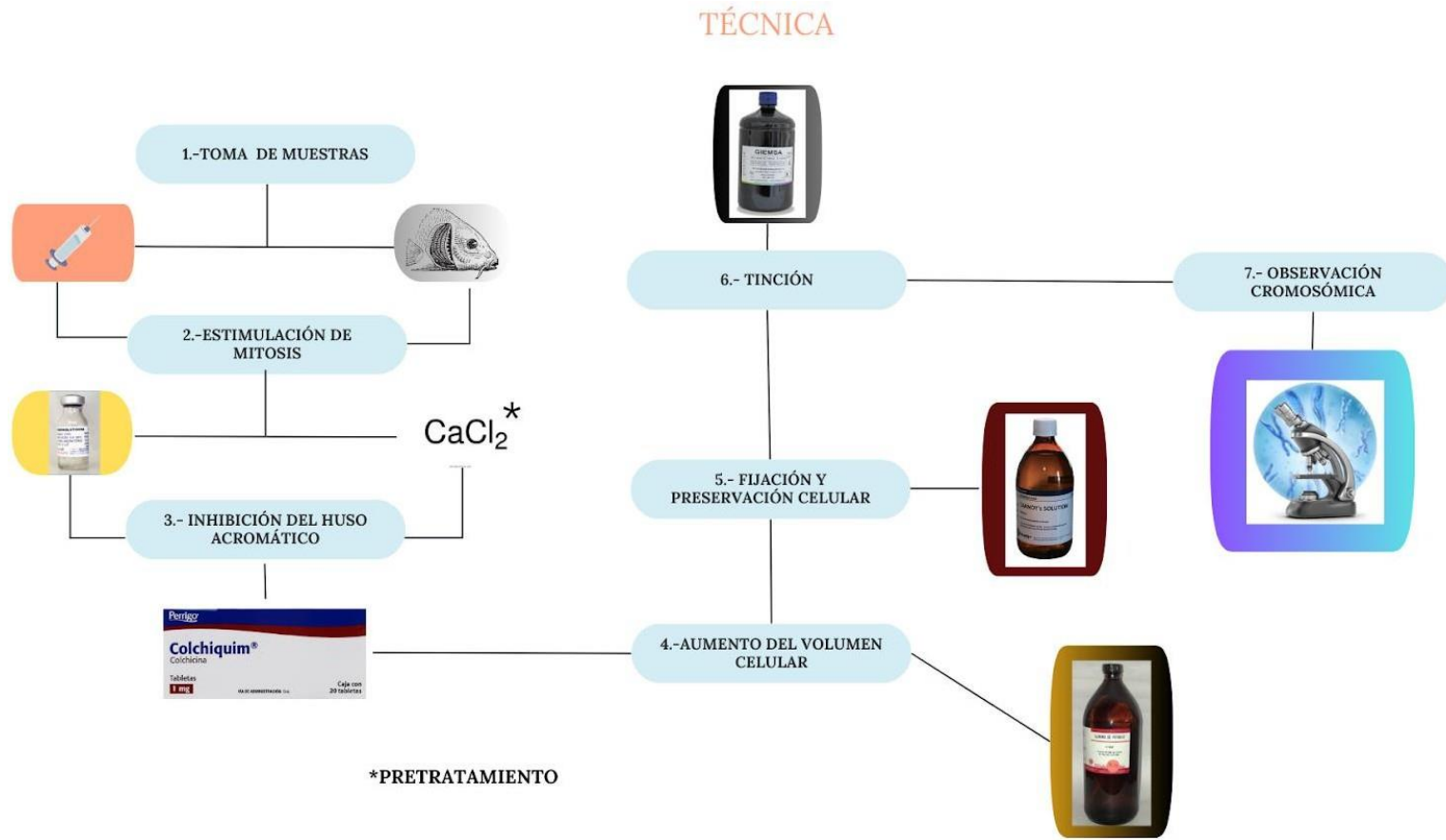


Figura 1. Pasos frecuentes para la obtención de las preparaciones cromosómicas mitóticas. 1) La muestra puede provenir de tejido o sangre; 2) Estimulación de la mitosis puede ser con fitohemaglutinina (FHA) o cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ), este último es utilizado como pretratamiento por algunos autores; 3) Inhibición del huso acromático que es inducido por la colchicina; 4) Aumento del volumen celular mediante cloruro de potasio (KCl); 5) Fijación y conservación celular con Carnoy; 6) Tinción de la muestra con Giemsa; y 7) Observación de los cromosomas con microscopio óptico.

Tabla 2. Tipos de muestra en el estudio citogenético.

Fuente	Tipo de muestra					
	Sangre	Tejido				
		Branquias	Riñón	Bazo	Aletas	Escamas
Kligerman y Bloom (1977)		✓	✓			
Bertollo <i>et al.</i> (1978)			✓			
Castorena-Sánchez <i>et al.</i> (1983)		✓				
Amemiya <i>et al.</i> (1984) <sup>s, 1, 2, 4</sup>					✓	✓
Fenocchio y Bertollo (1988) <sup>1, 2, 4, 5</sup>	✓					
Gold <i>et al.</i> (1990) <sup>s, 2, 4</sup>		✓	✓			
Moreira-Filho y Bertollo (1990)			✓			
Fenocchio <i>et al.</i> (1991) <sup>1, 2, 4</sup>			✓			
Foresti <i>et al.</i> (1993)		✓	✓			
Álvarez (1994)		✓				
Camacho-Garzón y Burbano (1999) <sup>1, 2, 3, 4, 5</sup>	✓					
Parada-Guevara (2003) <sup>1, 4, 5</sup>	✓					
Molina-Martínez <i>et al.</i> (2008)	✓	✓		✓		
Fabian-Rivera (2008) <sup>2, 4, 5</sup>	✓					
Blanco <i>et al.</i> (2012)			✓			

<sup>s</sup> Subcultivo de células

Cultivo celular: <sup>1</sup>TC-199, <sup>2</sup>RPMI 1640 y <sup>3</sup>MEM  
 Suplementos en el cultivo celular: <sup>4</sup>SFB y <sup>5</sup>FHA

Silva *et al.* (1991) recomiendan el uso de medios de cultivo en polvo por su facilidad de almacenamiento y estabilidad, los medios más apropiados son el medio esencial mínimo (MEM), RPMI 1640 y TC- 199. Este último se considera como la primera opción de medio de cultivo y como segunda el penúltimo porque brinda mejores condiciones para los linfocitos (Camacho-Garzón y Burbano 1999). Ham y Mckeehan (1979) mencionan que el TC-199 es un medio de cultivo altamente enriquecido con aminoácidos, aunque con una menor concentración de vitaminas. Mientras que el medio RPMI 1640 contiene altas concentraciones de vitaminas (Thermo Fisher Scientific 2023). Por lo tanto, una combinación de ambos medios de cultivo optimiza el desarrollo celular.

Con respecto a los suplementos en el cultivo celular, la FHA es el mitógeno más empleado, aunque no todas las especies responden adecuadamente a las concentraciones y debe establecerse una dosis eficaz para cada caso (Rodríguez *et al.* 2003). En un estudio se sugiere que la FHA no estimula la mitosis en los leucocitos, sino que transforma a los monocitos y a los linfocitos a un estado donde pueden dividirse (Nowell 1960). Romo (1969) menciona que su propiedad mitogénica modula en las células la desdiferenciación para iniciar la división en un lapso de 24 a 48 hrs. Se recomienda calcular la solución apropiada para que la concentración final no sea mayor de 10 mg/ml debido a que es el tope de su actividad mitogénica (Silva *et al.* 1991).

Macleod (1988) considera fundamental el uso de SFB para el cultivo de células en medios artificiales, pues se requiere de un suplemento con hormonas y otros factores de crecimiento para mantener el balance de energía celular, el transporte de nutrientes y el control de síntesis de macromoléculas. Sin embargo, el SFB no es utilizado frecuentemente, éste sólo permite el crecimiento de algunos tipos celulares, por lo tanto, su uso aumenta el costo del cultivo a gran escala (Escobar *et al.* 2011).

Cuando se implementan medios de cultivo en las técnicas citogenéticas existe la posibilidad de una contaminación microbiana. Por esta razón, en algunos estudios se agregan antibióticos y antimicóticos (Fenocchio *et al.* 1991; Parada-Guevara 2003). Para reducir la contaminación se emplea el uso de penicilina ( $8.3 \times 10^{-18}$  mg/ml) y estreptomina (5 mg/ml) para las bacterias gram positivas y negativas, respectivamente. (Silva *et al.* 1991). Edridge (1985) recomienda agregar 119  $\mu$ g de penicilina, 100  $\mu$ g de estreptomina y 25  $\mu$ g de Fungizone <sup>®</sup> por cada centímetro cúbico del medio a preparar.

El desarrollo de cultivos celulares aumenta la probabilidad de encontrar un elevado número de células viable para el análisis citogenético. En la figura 2 se muestran los tiempos que conlleva la implementación de un medio de cultivo en las técnicas aplicadas en peces. Autores como Eldrige (1985), McFeelly (1990), y Camacho-Garzon y Burbano (1999), recomiendan que el tiempo del cultivo celular debe oscilar entre las 60 y 72 hrs.

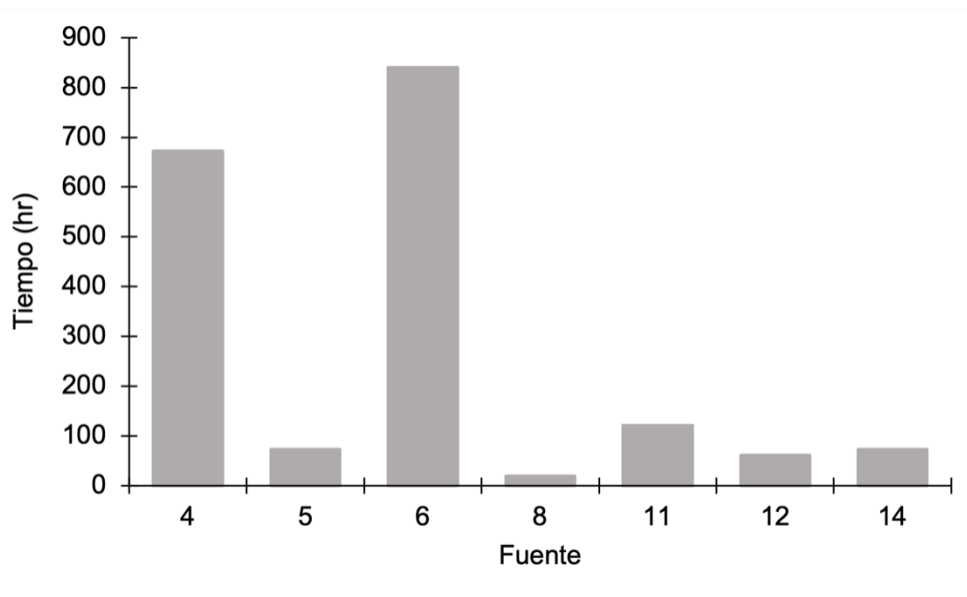


Figura 2. Tiempos de los medios de cultivo en técnicas citogenéticas aplicadas en peces. Los números en el eje horizontal representan la fuente bibliográfica, **ver tabla 1**.



Las concentraciones y tiempos de exposición de la colchicina varían y no hay una relación entre ambas (Figura 3). El modelo lineal indica que hay una baja relación inversa entre la concentración de la colchicina y el tiempo de exposición ( $r^2=0.2039$ ). Debe aclararse que en el estudio de Amemiya *et al.* (1984) no se menciona tiempo de exposición. Camacho-Garzón y Burbano (1999) mencionan que debe tomarse a consideración el tiempo empleado porque los ciclos celulares de los organismos se encuentran sujetos a los procesos fisiológicos, y en peces la profase se observa en tiempos largos y si la colchicina es aplicada en un periodo de tiempo corto producirá índices mitóticos bajos. Silva *et al.* (1991) menciona que la preparación de la solución madre de colchicina 0.16% es con agua destilada estéril y para la solución de uso se diluye 1/10 y aplicando 0.1 ml por cada 5 ml de cultivo. Meyer (1943) considera que un pre-tratamiento con colchicina es eficaz en una solución acuosa de colchicina al 0.01-0.02% en un lapso de 2-3 horas y posteriormente la fijación.

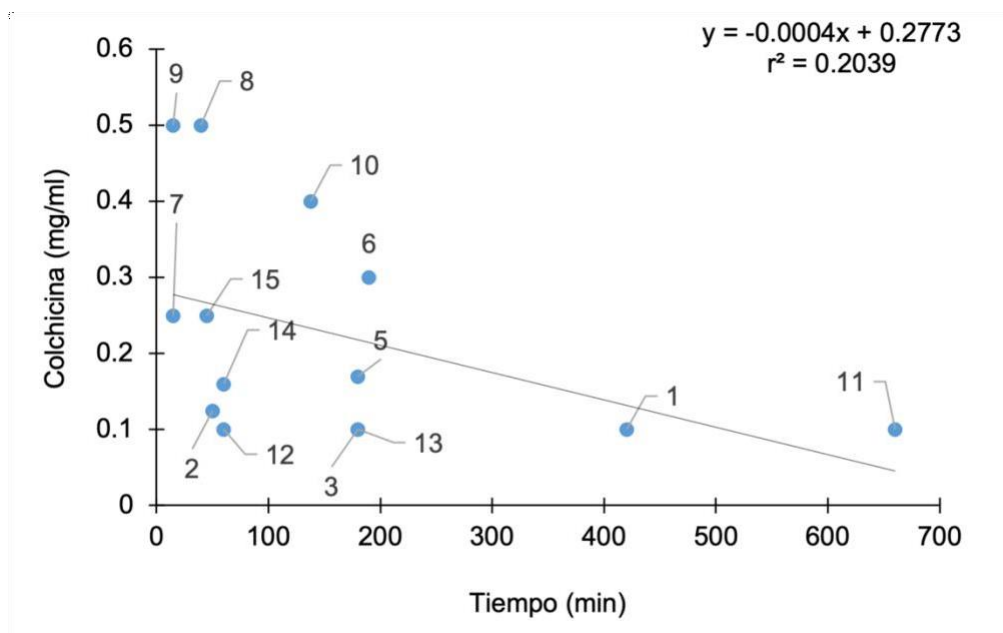


Figura 3. Tiempos de exposición a la colchicina en las técnicas citogenéticas aplicadas en peces. Los números ligados a los puntos de dispersión representan la fuente bibliográfica, **ver tabla 1.**

El tiempo de exposición a la solución de KCL utilizado por los autores para el desarrollo de técnicas citogenéticas en peces es de 30 min. La concentración de la solución hipotónica utilizada es 0.075 M, excepto Kligerman y Bloom (1977), quienes utilizaron 0.053 M. La concentración de esta solución y el tiempo de exposición debe ser precisa para la obtención de metafase. Una concentración baja en sales o un tiempo de exposición prolongado puede provocar la ruptura celular, incluso si la concentración de sales es cercana a la isotonía puede ocasionar metafases que afecten al estudio (Baksi y Means 1988). La solución hipotónica de KCl más recomendada es de 0.075 M por su baja afectación a la estructura cromosómica (Silva *et al.* 1991).

La solución Carnoy, es utilizada por la mayoría de los autores en una proporción 3:1 de etanol y ácido acético, sin embargo, Camacho-Garzón y Burbano (1999) y Parada-Guevara (2003) emplearon una concentración 6:1. Los tiempos de exposición varían desde segundos hasta horas (Figura 4). Castorena-Sánchez *et al.* (1983), Álvarez-Espíndola (1994) y Molina-Martínez *et al.* (2008) no mencionan tiempo de exposición en su estudio. Blanco *et al.* (2012) utilizó un lapso máximo de 168 hrs (10,080 min). En la mayoría de los estudios se emplea el fijador con una proporción 3:1, ya que el alcohol endurece el tejido y provoca contracción y el ácido acético contrarresta esta última acción (Humason 1979). Silva *et al.* (1991), recomiendan conservar una proporción 3:1 durante las primeras dos fijaciones para evitar el deterioro de la muestra y en los últimos dos lavados variar la proporción incrementando la concentración de 1:1 a 6:1 para mejorar la eliminación de restos citoplasmáticos.

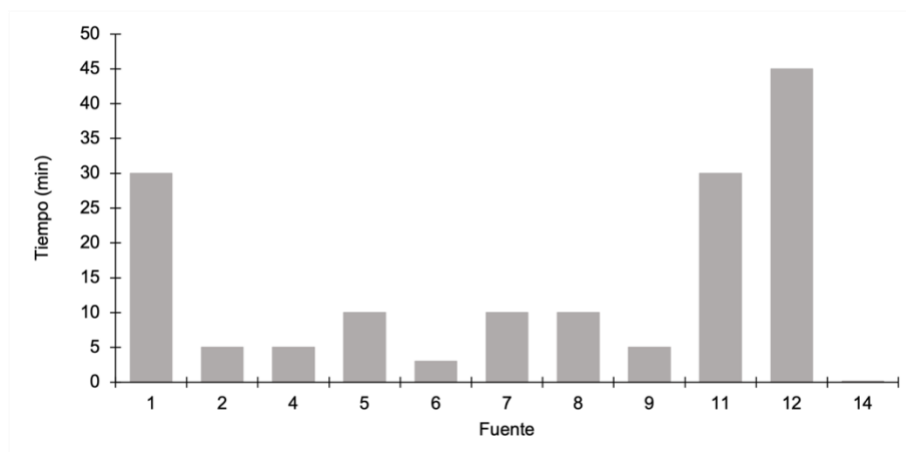


Figura 4. Tiempos de exposición al Carnoy en técnicas citogenéticas aplicadas en peces. Los números en el eje horizontal representan la fuente bibliográfica, **ver tabla 1**.

Después de que las muestras se fijaron, debe colocarse una muestra en un portaobjetos. El número de gotas varía de 5-6 gotas (Bertollo *et al.* 1978; Fenocchio y Bertollo 1988; Foresti *et al.* 1993) a 8-10 gotas (Moreira-Filho y Bertollo 1990). Silva *et al.* (1991) sugieren que las láminas se laven previamente por 30 min con etanol, 15 min en metanol y pasarlas en Carnoy y guardarlas en el congelador; posteriormente, gotear la muestra en el portaobjetos, este debe tomarse con una pinza y hacerlo en una altura mínima de 30 cm (para la lisis celular), después de 4-5 gotas, se flamea la lámina para que los alcoholes desprendan el vapor.

La concentración del Giemsa para la tinción de los portaobjetos varía de 4-5% (Kligerman y Bloom 1977; Bertollo *et al.* 1978; Amemiya *et al.* 1984; Fenocchio y Bertollo 1988; Moreira-Filho y Bertollo 1990; Gold *et al.* 1990; Fenocchio *et al.* 1991; Foresti *et al.* 1993; Molina-Martínez *et al.* 2008; Rivera 2008 y Blanco *et al.* 2012) y en menor frecuencia 2% (Camacho-Garzón y Burbano 1999; Parada-Guevara *et al.* 2003) y 10% (Álvarez 1994). Castorena-Sánchez *et al.* (1983) no mencionan la concentración de este reactivo que utilizaron en su estudio. Shao *et al.* (2010) recomienda concentraciones de Giemsa de

11% con un corto periodo de exposición. Los tiempos de exposición varían de 5 a 25 minutos (Figura 5).

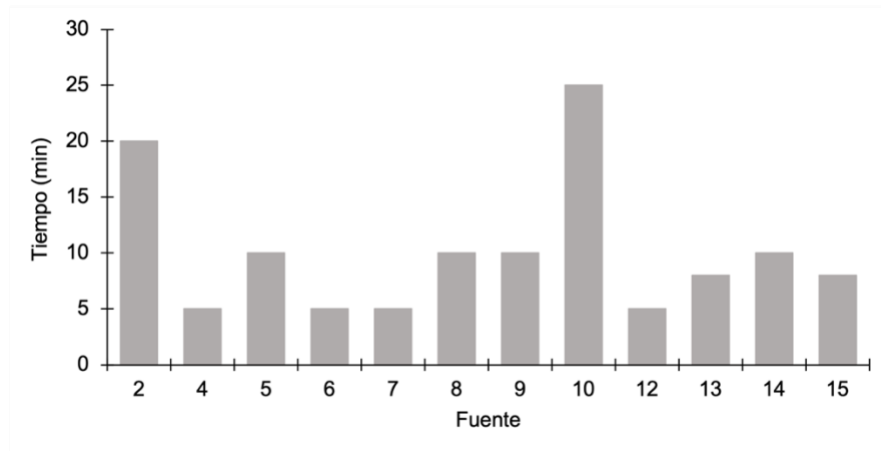


Figura 5. Tiempos de exposición al Giemsa en técnicas citogenéticas aplicadas en peces. Los números en el eje horizontal representan la fuente bibliográfica, **ver tabla 1**.

## CONCLUSIONES

- La utilización de los medios de cultivo TC-199 y RPMI1640 optimizan el desarrollo celular.
- La fitohemaglutinina (FHA) es el mitógeno más empleado, aunque no todas las especies responden adecuadamente a las concentraciones y debe establecerse una dosis eficaz para cada caso en un lapso de 24 a 48 hrs. Se recomienda calcular la solución apropiada para que la concentración final no sea mayor de 10 mg/ml.
- La profase en peces se observa en tiempos largos y si la colchicina es aplicada en un periodo de tiempo corto se producen índices mitóticos bajos.
- El uso más recomendado de KCl es de 0.075 M por su baja afectación a la estructura cromosómica.

## REFERENCIAS

- Alcántar-Vázquez JP. 2016. Fisiología de los peces triploides. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 44(1):1-15. DOI: [10.3856/vol44-issue1-fulltext-1](https://doi.org/10.3856/vol44-issue1-fulltext-1)
- Álvarez MA. 1994. Estudio citogenético del charal prieto (*Chirostoma attenatum*) Meek, 1902 (Pisces: Atherinidae) en el Lago de Pátzcuaro, Michoacán. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Alves AL, RS De Borba, C Oliveira, M Nirchio, A Granado, F Foresti. 2012. Karyotypic diversity and evolutionary trends in the Neotropical catfish genus *Hypostomus Lacépède*, 1803 (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Comparative Cytogenetics*, 6(4):443-452. DOI: [10.3897/CompCytogen.v6i4.4028](https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v6i4.4028)
- Amemiya CT, JW Bickham y JR Gold. 1984. A Cell Culture Technique for Chromosome Preparation in Cyprinid Fishes. *Copeia*, 1984(1):232–235. DOI: [10.2307/1445065](https://doi.org/10.2307/1445065)
- Arias-Rodríguez L, L Ibarra-Castro, y S Páramo-Delgadillo. 2008. Los cromosomas mitóticos y meióticos del pez tropical *Petenia splendida* (Cichlidae). *Revista de Biología Tropical*, 56(2):895-907.
- Arrighi FE y TC Hsu. 1971. Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics*. 10(2):81-6. DOI: [10.1159/000130130](https://doi.org/10.1159/000130130)
- Baker RJ, GA Mengden y JJ Bull. 1972. Karyotypic Studies of Thirty-Eight Species of North American Snakes. *Copeia*, 2:257–265. DOI: [10.2307/1442486](https://doi.org/10.2307/1442486)
- Baksi S y J Means. 1988. Preparation of chromosomes from early stages of fish for cytogenetic analysis. *Journal of Fish Biology*, 32 (3):321-325.
- Bertollo LAC, GG Born, JA Dergam, AS Fenocchio y O Moreira-Filho. 2000. A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographical distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. *Chromosome Research*, 8:603-613.

- Bertollo LAC. 1978. Estudios citogeneticos do genero hoplias gill, 1903 (pisces, Erytrinidae. Tesis de doctorado. Universidade de São Paulo. Brasil.
- Biowest. 2023. Solución salina equilibrada de Hanks. Consultado: 14 de marzo de 2023. Disponible en:  
[https://protena.com.pe/wp-content/uploads/2022/03/l0611\\_fichatecnica\\_es.pdf](https://protena.com.pe/wp-content/uploads/2022/03/l0611_fichatecnica_es.pdf)
- Blanco DR, LAC Bertollo, RL Lui, MR Vicari, VP Margarido, RF Artoni y O Moreira-Filho. 2012. A new technique for obtaining mitotic chromosomes spreads from fishes in the field. *Journal of Fish Biology*, 81(1):351–357. DOI:[1095-8649.2012.03325.x](https://doi.org/10.1095-8649.2012.03325.x)
- Booke HE. 1968. Cytotaxonomic studies of the coregonine fishes of the Great Lakes, USA: DNA and karyotype analysis. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 25:1667-1687.
- Cairus A, M Choca, F Savio, V Silva, y C Vera. 2016. Implementación de la técnica Hibridación in situ fluorescente (FISH) en Facultad de Medicina. *Anales De La Facultad De Medicina*, 4, 52-61.
- Camacho-Garzón, J y C Burbano. 1999. Técnica para el cultivo in vitro de linfocitos de peces. *Dahlia*. 3: 69-79.
- Caspersson T, L Zech y C Johansson. 1970. Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Experimental Cell Research*. 60(3):315-319. DOI: [10.1016/0014-4827\(70\)90523](https://doi.org/10.1016/0014-4827(70)90523)
- Castorena-Sánchez I, M Uribe y J Arreguín-Espinosa. 1983. Estudio cromosómico de poblaciones del género Tilapia Smith (Pisces: Cichlidae) provenientes de tres regiones de México. *Veterinaria México*, 14(3): 137-141.
- Catanesi CI, y EE Villegas-Castagnasso. 2021. *Elementos de genética para estudiantes de ciencias biológicas*. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. DOI: [10.35537/10915/129625](https://doi.org/10.35537/10915/129625)
- Cremer T y C Cremer. 1988. Centennial of Wilhelm Waldeyer's. Introduction of the term "chromosome" in 1888. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 48(2):66-67.

- Cruz S. 2009. Estudio de mitosis de raíces de cebolla (*Allium cepa*) con microscopía de fuerza atómica. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Delgadillo FD. 2021. Análisis cromosómico de *Neotomodon alstoni* de Tepatlaxco de Hidalgo, Puebla. Tesis de licenciatura. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México.
- Denton TE. 1973. *Fish chromosome methodology*. Charles C. Thomas Publisher. University of California E.E. U. U.166 p.
- Diniz D, A Laudicina y LAC Bertollo. 2009. Chromosomal location of 18S and 5S rDNA sites in *Triportheus* fish species (Characiformes, Characidae). *Genetics and Molecular Biology*, 32(1):37-41.
- Domínguez AG. 2017. Evaluación de aberraciones cromosómicas en muestras de sangre periférica obtenidas en niños expuestos y no expuestos a la contaminación de la Refinería Estatal de Esmeraldas. Tesis de Licenciatura. Universidad Central del Ecuador. Ecuador.
- Durán-González A, CE García-Rucias y A Laguarda-Figueras. 1990. The karyotype and “G” bands of *Haemulon aurolineatum* Clavier, 1829 (Pisces:Haemulidae). *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología*, 17: 299-307.
- Dutrillaux B y J Lejeune. 1971. Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. *Comptes Rendus Hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences*, 272(20):2638-2640.
- Eldridge FE. 1986. *Cytogenetics of livestock*. Avi Publishing Company. University of California. E.E. U. U. 298 p.
- Enríquez-Valencia CE, CA Prieto-Mojica y FZ Gómez-Balanta. 2022. Regulación genética de la determinación sexual y diferenciación gonadal en peces teleósteos. *Entramado*, 18(1):e-7607 DOI: [10.18041/1900-3803/entramado.1.7607](https://doi.org/10.18041/1900-3803/entramado.1.7607)
- Escobar ML, S Morantes, CP Cordero y FA Aristizábal. 2011. Implementación de estrategias in vitro para evaluar la funcionalidad de un suero fetal bovino colombiano. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 40(2):201-221.

- Fabian-Rivera D. 2008. Estandarización de técnicas en citogenética animal reporte de casos experimentales en aves y peces. Tesis de Licenciatura. Universidad Surcolombiana. Colombia.
- Falco A, A Rocha, C Tafalla, A Estepa y J Coll-Morales. 2006. Posibles aplicaciones de los transposones de peces a la acuicultura. *AquaTIC*. 24:61-71.
- Fenocchio AS y LA Bertollo. 1988. A simple method for fresh-water fish lymphocyte culture. *Brazilian Journal of Genetics*, 11: 847-852.
- Fenocchio AS, LA Bertollo, CS Takahashi y JP Camacho. 2000. B chromosomes in two fish species, genus *Rhamdia* (Siluriformes, Pimelodidae). *Folia Biologica*, 48:105-109
- Fenocchio AS, PC Venere, ACG Cesar y AL Dias. 1991. Short term culture from solid tissues of fishes. *Caryologia*, 44:161-166.
- Ford CE y JL Hamerton . 1956. A colchicine, hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosomes. *Stain Technology*, 31(6):247-51. DOI: [10.3109/10520295609113814](https://doi.org/10.3109/10520295609113814)
- Foresti F, C Oliveira, PM Galetti y LF Almeida-Toledo. 1993. Synaptonemal complex analysis in spermatocytes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae). *Genome*, 36:1124-1128.
- Gersen SL y MB Keagle MB. 2013. *The Principles of Clinical Cytogenetics*. Springer. E. U. U. 569 p.
- Gold JR, YC Li, NS Shipley y PK Powers. 1990. Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. *Journal of Fish Biology*, 37:563-575. DOI: [10.1111/j.1095-8649.1990.tb05889.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1990.tb05889.x).
- Gutiérrez JM, A Solórzano y L Cerdas. 2016. Estudios cariológicos de cinco especies de serpientes costarricenses de la familia Colubridae. *Revista de Biología Tropical*, 32(2):263–267.
- Ham RC y WL McKeehan. 1979. Media and growth requirements. *Methods in Enzymology*, 58:44-93. DOI: [10.1016/S0076-6879\(79\)58126-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(79)58126-9)



- Hasan R, AT Leeson-Payne, JH Jaggar, y X Zhang. 2017. Calmodulin is responsible for Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation of TRPA1 Channels. *Scientific Reports*, 7(1):e45098.
- Hastings J, S Freedman, O Rendon, HL Cooper y K Hirschhorn. 1961. Culture of human white cells using differential leucocyte separation. *Nature*, 192(4808):1214–1215. DOI:[10.1038/1921214a0](https://doi.org/10.1038/1921214a0)
- Hernández JM, NC Gutiérrez, MB González y JL García. 2002. Técnicas de estudio cromosómico. Citogenética convencional, hibridación *in situ* fluorescente y sus variedades. Aplicaciones clínicas. *Medicine*, 8(82):4392–4397. DOI:[10.1016/s0304-5412\(02\)70820-2](https://doi.org/10.1016/s0304-5412(02)70820-2)
- Humason GL. 1979. *Animal tissue techniques*. W.H. Freeman. E. E. U. U.
- Islam MQ y G Levan. 1987. A new fixation procedure for improved quality G-bands in routine cytogenetic work. *Hereditas*, 107(1):127-130. DOI: [10.1111/j.1601-5223.1987.tb00277.x](https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1987.tb00277.x)
- Karami A, PS Araghi, MA Syed, SP Wilson. 2015. Chromosome preparation in fish: effects of fish species and larval age. *International Aquatic Research*, 7(3):201–210. DOI: [10.1007/s40071-015-0104-z](https://doi.org/10.1007/s40071-015-0104-z)
- Kligerman AD y SE Bloom. 1977. Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes. *Journal of the Biological Board of Canada*, 34: 266-269.
- Lawce HJ y MG Brown. 2017. Cytogenetics: an overview. 25-84 pp. En: Arsham MS, MJ Barch y HJ Lawce (eds.). *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. Wiley-Blackwell. E. E. U. U.
- Lin GL, M Monje. 2017. A protocol for rapid post-mortem cell culture of diffuse intrinsic pontine glioma (DIPG). *Journal of Visualized Experiments*, (121):e55360, DOI:[10.3791/55360](https://doi.org/10.3791/55360)
- Macleod AJ. 1988. The use of plasma protein fractions as medium supplements for animal cell culture. *Advances in Biochemical*, 37: 41-56.
- Mancera-Rodríguez NJ, EJ Márquez y JC Hurtado-Alarcón. 2013. Uso de citogenética y técnicas moleculares en estudios de diversidad genética en peces colombianos. 237-312 pp. En: López HA (ed.). *Biología Molecular aplicada a la producción*

*animal y la conservación de especies silvestres*. Universidad Nacional de Colombia. Colombia.

- Mani I, R Kumar, M Singh, NS Nagpure, B Kushwaha, PK Srivastava, DS Rao y WS Lakra. 2011. Nucleotide variation and physical mapping of ribosomal genes using FISH in genus *Tor* (Pisces, Cyprinidae). *Molecular Biology Reports*,38(4):2637-47. DOI: [10.1007/s11033-010-0405-7](https://doi.org/10.1007/s11033-010-0405-7)
- Martínez JL, P Moran, E García-Vázquez, y AM Pendas. 1996. Chromosomal localization of the major and 5S rRNA genes in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Cytogenetics and cell genetics*, 73:149-152
- Matsui S y M Sasaki. 1973. Differential staining of nucleolus organizers in mammalian chromosomes. *Nature*, 246(5429):148-150. DOI: [10.1038/246148a0](https://doi.org/10.1038/246148a0)
- McFeely R. 1990. *Domestic Animals Cytogenetics*. 19-40 pp. En: CE Cornelis y CF Simpson. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*. Academic Press. E. E. U. U. 317 p.
- Meyer JR. 1943. Colchicine-Feulgen leaf smears. *Stain Technology*, 18(2):53-56. DOI: [10.3109/10520294309105791](https://doi.org/10.3109/10520294309105791)
- Molina MJ, A Obaya, J Ramos, V Solís, J Sparrowe y C Muñoz. 2018. Por qué los animales importan: argumentario sobre la experimentación animal. *Animales de Laboratorio*, (79):17-24.
- Molina-Martínez MF, JM Leshner-Gordillo y A Rivera-Rodríguez. 2008. Determinación de los cromosomas del pejelagarto, *Atractosteus tropicus* Gill, 1863. Semana de Divulgación y Video Científico 2008. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.
- Moore CM y RG Best. 2001. Chromosome preparation and banding. *Encyclopedia of Life Sciences*. DOI: [10.1038/npg.els.0001444](https://doi.org/10.1038/npg.els.0001444)
- Moore GE y DB Hood. 1993. Modified RPMI 1640 culture medium. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*. 29(4):268–268. DOI:[10.1007/bf02633952](https://doi.org/10.1007/bf02633952)
- Moorhead PS, PC Nowell, WJ Mellmand, DM Battips y DA Hungerforh. 1960. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Experimental Cell Research*, 20:613-16.

- Moreira-Filho O y LAC Bertollo. 1990. Uma tecnica alternativa para preparacoes cromossomicas em peixes. III Simposio de Citogenetica Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais. Brasil.
- Niessen AI. 1986. Análisis ultraestructural y reconstrucción tridimensional computarizada de la mitosis en suspensiones celulares de maíz (*Zea mays*). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Colombia.
- Nikoloff N y C Ruiz. 2021. Introducción a la Citogenética. 48-68 pp. En: Catanesi CI, y EE Villegas-Castagnasso (eds.). *Elementos de Genética para estudiantes de Ciencias Biológicas*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata. Argentina.
- Nirchio M y C Oliveira. 2006. *Citogenética de peces*. Coordinación de Publicaciones del Rectorado de la Universidad de Oriente. Venezuela. 203 p.
- Nirchio M y C Oliveira. 2014. Citogenética como herramienta taxonómica en peces. *Saber*, 26(4):361-372.
- Nirchio M, ERM Martinez, F Foresti y C Oliveira. 2010. Cytogenetic analysis of three sea catfish species (Teleostei, Siluriformes, Ariidae) with the first report of Ag-NOR in this fish family. *Genetics and Molecular Biology*. 33(2),262–265. DOI:[10.1590/s1415-47572010005000038](https://doi.org/10.1590/s1415-47572010005000038)
- Nowel PC. 1960. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Research*, 20:462-466.
- Núñez R y JR Escalona. 1993. Ciclo celular. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 9 p.
- Ozouf-Costaz C y F Foresti. 1992. Fish cytogenetic research: advances, applications and perspectives. *Netherlands Journal of Zoology*, 42:277-290.
- Parada-Guevara SL, JA Arias-Castellanos y P Cruz-Casallas. 2003. Caracterización cariotípica del yamú (*Brycon siebenthalae*). *Orinoquia*, 7(1):42–46. DOI: [10.22579/20112629.261](https://doi.org/10.22579/20112629.261)
- Pauls E, PRAM Affonso, MRCB Netto y ML Pacheco. 1996. Supernumerary chromosomes on marine fish *Upeneus parvus* (Poey 1853, Mullidae) from Atlantic Ocean. *Archivos de zootecnia*, 45 (170):295-299.

- Paz-y-Miño C, M Sánchez, M Arévalo, M Muñoz, T Witte, G De-la-Carrera y P Leone. 2007. Evaluation of DNA damage in an Ecuadorian population exposed to glyphosate. *Genetics and Molecular Biology*, 30(2):456-460.
- Pineda HR, JE Jaramillo, DM Echeverri y M Olivera. 2004. Triploidía en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*): posibilidades en Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 17(1):45-52.
- Pisano E, C Ozouf-Costaz, F Foresti y BG Kapoor. 2007. *Fish Cytogenetics*. Science Publishers Inc. E. E. U. U.
- Rieder CL y RE Palazzo. 1992. Colcemid and the mitotic cycle. *Journal of Cell Science*, 102(3):387–392.
- Rivera, FD. 2008. Estandarización de técnicas en citogenética animal: Reporte de casos experimentales en aves y peces. Tesis de doctorado. Universidad Surcolombiana. Colombia.
- Rocco L. 2015. Direct mitotic chromosome preparations from chondrichthyan tissues. 27-31 pp. En: Ozouf-Costaz C, E Pisano, F Foresti, LF Almeida-Toledo (eds.). *Fish Cytogenetic Techniques*. Science Publishers Inc. E. E. U. U.
- Rodríguez PA, ML Ortiz y ML Bueno. 2003. Agentes mitogénicos para cultivos de linfocitos en quelonios. *Orinoquia*, 7(1-2):47-49.
- Rodríguez-Gómez AJ y S Frías-Vázquez. 2014. La mitosis y su regulación. *Acta pediátrica de México*, 35(1): 55-68.
- Rodríguez-Pulido JA, TM Mira-López y PE Cruz-Casallas. 2018. Determinación, diferenciación sexual y pubertad en peces. *Orinoquia*, 22 (1):80-91.
- Romo P. 1969. Acción de la fitohemaglutinina en la regeneración de la planaria *Dugesia dorocephala*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 50 p. DOI: 20.500.14330/TES01000773349
- Shao CW, PF Wu, XL Wang, YS Tian y SL Chen. 2010. Comparison of chromosome preparation methods for the different developmental stages of the half-smooth tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*. *Micron*, 41(1):47–50. DOI: [10.1016/j.micron.2009.08.002](https://doi.org/10.1016/j.micron.2009.08.002)

- Silva E, C Crane, A Bermúdez, M Bueno, X Pedraza, A Giraldo. 1991. Citogenética humana: manual de procedimientos. Instituto Nacional de Salud. Colombia. 44 p.
- Solari AJ. 2011. Genética humana. Fundamentos y aplicaciones en medicina. Editorial Médica Panamericana. Argentina. 556 p.
- Thermo Fisher Scientific Inc. 2023. Invitrogen. Consultado: 14 de marzo de 2023. Disponible en:  
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/11875176?SID=srch-hj-11875176>
- Vázquez BE. 2011. Valoración Epidemiológica de 10264: Estudios citogenéticos prenatales y contribución de las técnicas de biopsia corial y FISH a su diagnóstico. Universidad de La Laguna. España. 219 p.
- Waldeyer W. 1988. Ueber Karyokinese und ihre Beziehungen zu den Befruchtungsvorgängen. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 32:1-122.
- Wang S, Y Su, S Ding, Y Cai y J Wang. 2010. Cytogenetic analysis of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, using chromosome banding and fluorescence in situ hybridization. *Hydrobiologia*, 638(1):1–10. DOI: [10.1007/s10750-009-9980-9](https://doi.org/10.1007/s10750-009-9980-9)
- Yunis JJ. 1976. High resolution of human chromosomes. *Science*, 191(4233):1268-70. DOI: [10.1126/science.1257746](https://doi.org/10.1126/science.1257746)
- Zhang S, X Zhang, X Chen, T Xu, M Wang, Q Qin, L Zhong, H Jliang, X Zhu, H Liu, J Shao, Z Zhu, Q Shi, X Bian y X You. 2019. Construction of a high-density linkage map and QTL fine mapping for growth and sex-related traits in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Frontiers in Genetics*, 10:1-14. DOI: [10.3389/fgene.2019.00251](https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00251)