



129
24

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**" POLIMORFISMOS CROMOSOMICOS Y SU
POSIBLE CORRELACION CON ABORTO
HABITUAL "**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA**

P R E S E N T A :

RICARDO MELENDEZ HERNANDEZ



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

| | |
|---|----|
| I. Introducción..... | 1 |
| II. Organización Molecular de la Cromatina..... | 3 |
| III. Bases Moleculares de la Heterocromatina..... | 15 |
| A. Antecedentes históricos..... | 15 |
| B. Heterocromatina facultativa: propiedades, función y origen..... | 16 |
| C. Propiedades de la heterocromatina constitutiva..... | 20 |
| 1. Rasgos particulares..... | 20 |
| a. Condensación..... | 20 |
| b. Distribución en el genoma (heterogeneidad)..... | 21 |
| c. Inactividad génica..... | 22 |
| d. Replicación tardía..... | 23 |
| e. Asociación..... | 23 |
| 2. Tipos de Secuencias en el genoma humano..... | 24 |
| a. Contenido y número de genes..... | 24 |
| b. Propiedades de reasociación..... | 26 |
| c. Fraccionamiento por gradiente de densidad..... | 27 |
| d. Secuencias repetitivas y DNA satélite..... | 29 |
| 3. Relación entre DNA repetitivo y heterocromatina constitutiva..... | 32 |
| a. Localización cromosómica (DNA sat)..... | 32 |
| b. Localización de otras secuencias repetitivas..... | 37 |
| c. Localización de las NOR..... | 40 |
| D. Aspectos evolutivos y funcionales del DNA repetitivo (DNA sat) y la heterocromatina constitutiva | 42 |
| 1. Homología de secuencias..... | 42 |
| a. Análisis en Primates..... | 42 |
| b. Homología entre los Primates..... | 44 |
| c. Asociación con los cromosomas sexuales..... | 52 |
| 2. Origen, evolución y funciones especulativas..... | 54 |
| a. Mecanismos de aparición..... | 54 |
| b. Evolución..... | 59 |
| c. Funciones especulativas..... | 62 |

| | |
|--|------------|
| IV. Polimorfismos Cromosómicos: Otro Enfoque de la Genética..... | 67 |
| A. Antecedentes..... | 67 |
| B. Variación estructural y asimetría lateral..... | 68 |
| 1. Variación estructural..... | 69 |
| 2. Asimetría lateral..... | 70 |
| C. Evaluación de los polimorfismos cromosómicos..... | 73 |
| D. Tipos, clasificación y frecuencias en relación a las técnicas de bandeado..... | 78 |
| 1. Heteromorfismos con bandas Q (QFQ)..... | 78 |
| a. Naturaleza y mecanismos de producción..... | 79 |
| b. Tipos, clasificación y frecuencias..... | 80 |
| 2. Heteromorfismos con bandas C (CBG)..... | 83 |
| a. Naturaleza y mecanismos de producción..... | 84 |
| b. Tipos, clasificación y frecuencias..... | 86 |
| c. Inversiones pericéntricas | 92 |
| 3. Heteromorfismos con bandas R (RFA)..... | 96 |
| a. Naturaleza y mecanismos de producción..... | 97 |
| b. Tipos, clasificación y frecuencias..... | 98 |
| 4. Heteromorfismos de las NOR..... | 100 |
| a. Naturaleza y mecanismos de producción..... | 100 |
| b. Tipos, clasificación y frecuencias..... | 102 |
| 5. Heteromorfismos usando biología molecular..... | 103 |
| a. Mecanismos de producción..... | 103 |
| b. Tipos y clasificación..... | 104 |
| 6. Heteromorfismos revelados por otras técnicas de bandeado..... | 106 |
| E. Estudios familiares y segregación de los polimorfismos..... | 111 |
| F. Distribución de los polimorfismos en poblaciones humanas..... | 114 |
| | |
| V. Polimorfismos Cromosómicos y su Relación con la Genética Clínica..... | 120 |
| A. Aplicaciones..... | 120 |
| B. Significado clínico..... | 121 |

| | |
|--|-----|
| VI. Polimorfismos Cromosómicos y Aborto Habitual..... | 130 |
| A. Regiones heteromórficas tradicionales..... | 131 |
| 1. Heteromorfismos de los cromosomas 1, 9 y 16..... | 131 |
| 2. Heteromorfismos del cromosoma Y..... | 133 |
| 3. Otros heteromorfismos..... | 135 |
| B. Regiones heteromórficas con inversión pericéntrica... | 136 |
| VII. Metodología..... | 138 |
| A. Muestra biológica..... | 138 |
| B. Obtención de las preparaciones cromosómicas..... | 138 |
| 1. Cariotipo de linfocitos de sangre periférica..... | 138 |
| 2. Técnica de bandas GTG..... | 139 |
| 3. Técnica de bandas CBG..... | 140 |
| C. Evaluación..... | 141 |
| VIII. Resultados y Discusión..... | 145 |
| Tablas y Figuras. | |
| IX. Conclusiones..... | 160 |
| X. Sumario..... | 165 |
| XI. Bibliografía..... | 166 |

ABREVIATURAS

- AE = Aborto espontáneo.
AH = Aborto habitual.
AT = Secuencias ricas en adenina y timina.
Bandas Ag-NOR = Bandas NOR empleando impregnación argéntica.
Bandas CBG = Bandas C con hidróxido de bario usando giemsa.
Bandas GTG = Bandas G con tripsina usando giemsa.
Bandas QPQ = Bandas Q con fluorescencia usando quinacrina.
Bandas RFA = Bandas R con fluorescencia usando acridina.
Bloque o segmento C = Región polimórfica.
BrdU = 5'-bromodesoxiuridina.
CC = Coeficiente de correlación.
CCP = Cromosomas de condensación prematura.
cen = Centrómero o región de constricción primaria.
CI = Coeficiente intelectual.
Cot = Cinética de reasociación.
CR = Coeficiente de regresión.
Cr = Cromatina.
cRNA = RNA complementario.
Cr S o X = Cromatina sexual o X.
CV = Coeficiente de variación.
DA/DAPI = Distamicina A/4'-6-diamidín-2-fenilindol.
DA/N = Distamicina A/Nitramicina.
DE = Desviación estándar.
DES = Diferencia estadísticamente significativa.
DNA = Acido desoxirribonucléico.
DNA sat = DNA satélite.
DNP = Desoxirribonucleoproteínas.
EC = Eucromatina.
EDTA = Etilendinitrilotetracetato disódico.
FFG = Combinación de colorantes fluorescentes y giemsa.
GC = Secuencias ricas en guanina y citosina.
GDC = Gemelos dicigotos.
GMC = Gemelos monocigotos.
G6PD = Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.
h o qh = Región de constricción secundaria (brazos largos).
HC (C) = Heterocromatina (constitutiva).
HC F = Heterocromatina facultativa.
HM (C) = Heteromorfismo (cromosómico).

HnRNA = RNA heteronuclear.
ICH = Intercambio de cromátidas hermanas.
Inv = Inversión.
IP = Inversión pericéntrica.
ISCN = Sistema internacional de nomenclatura en citogenética.
Kb = kilobases (mil pares de bases).
m.a. = Millones de años.
MNC = Mitomicina C.
NQ = Nostaza de quinacrina.
mRNA = RNA mensajero.
mtDNA = DNA mitocondrial.
M1 = Un ciclo de replicación.
M2 = Dos ciclos de replicación.
MA = Maranja de acridina.
NOR = Región (es) de organizadores nucleolares.
p = Brazo corto cromosómico.
PA = Parejas abortadoras.
pb = Pares de bases.
PF = Parejas fértiles.
PN (C) = Polimorfismo (cromosómico).
q = Brazo largo cromosómico.
rDNA = DNA ribosómico.
RM = Retraso mental.
rNA = Acido ribonucleico.
rNA^o = RNA marcado radioactivamente.
RNP = Ribonucleoproteínas.
rRNA = RNA ribosómico.
Tr = Tiempo de reasociación.
Var = Variante.

I. INTRODUCCION.

El hombre y todos los seres vivos estamos sujetos continuamente a cambios ambientales que a través del tiempo han modificado y originado las diferentes especies. La capacidad adaptativa conlleva a que cada una de ellas adquiera una morfología, una fisiología y un modo de sobrevivencia muy particular, todo esto a expensas del material hereditario.

En los últimos años se han tratado de dilucidar los mecanismos y las fuerzas que rigen la división celular, particularmente, durante los estadios de la recombinación cromosómica. Es más, procesos como la condensación, la amplificación y la organización de secuencias, a pesar de no intervenir directamente, tienen una función muy importante en la integridad celular. Dichos procesos se han correlacionado con los tipos de secuencias localizados en sitios específicos de los cromosomas humanos.

Con los adelantos citogenéticos empleando las diferentes técnicas de bandeado y los estudios de biología molecular, se ha venido vislumbrando una nueva etapa acerca del mecanismo por el cual los cromosomas adquieren una variación morfológica, aun entre individuos, en especial, en el cariotipo humano. Esas variantes o polimorfismos son relativamente frecuentes en nuestra población y en general se observa que no tienen repercusión alguna sobre el fenotipo. Sin embargo, se ha visto, en diferentes poblaciones humanas, que no son variaciones sin sentido y que pueden afectar el desarrollo normal.

Un gran número de trabajos postulan que existe una relación entre polimorfismos cromosómicos y enfermedad, especialmente, con el riesgo de abortos espontáneos consecutivos. La presencia de infertilidad en nuestro medio tiene una alta prioridad en su estudio, ya que alrededor de 15% de todas las gestaciones terminan en un aborto espontáneo. De estos abortos, la mayor parte son cromosómicamente anormales. Además, si la pérdida

repentina del embarazo constituye un problema muy perturbador, no sólo para la pareja, sino también para la permanencia de la especie humana, es importante conocer su etiología.

En diferentes trabajos de varias poblaciones, se ha tratado de establecer una correlación entre estos polimorfismos cromosómicos y el riesgo de pérdida fetal recurrente, en especial, con el tamaño del cromosoma Y. Pese a ello, los resultados son contradictorios, ya que cada población es evaluada con métodos arbitrarios y, al comparar pacientes con grupos de individuos normales, no siempre existe una diferencia significativa; más aún, el comportamiento de estas regiones ha sido poco estudiado.

En el Servicio de Genética del Hospital General de México SSA un gran porcentaje de los pacientes son remitidos por causas de infertilidad, por lo que es conveniente realizar estudios para tratar de determinar la etiología del aborto habitual. Por tal motivo, los objetivos de este trabajo fueron:

a) Establecer un método adecuado de cuantificación para las regiones polimórficas de heterocromatina constitutiva de los cromosomas humanos 1, 9, 16 e Y.

b) Determinar la frecuencia de los polimorfismos cromosómicos en una muestra de la población mestizo-mexicana de la ciudad de México.

c) Indagar si existe o no una correlación entre estos marcadores y parejas de aborto habitual, en comparación con un grupo testigo de parejas fértiles.

d) Contribuir a extender el conocimiento de la etiología de los polimorfismos cromosómicos a nivel citogenético y molecular, así como su repercusión sobre la capacidad reproductiva del individuo.

II. ORGANISACION MOLECULAR DE LA CROMATINA.

La estructura y función del genoma eucarionte se ha estudiado detalladamente en las últimas décadas. La observación al microscopio del contenido nuclear describe una trama reticular muy fina distribuida en forma heterogénea, lo que indica la existencia de regiones especializadas para realizar una función determinada. Espero, no significa que los núcleos de todas las líneas celulares y aún de cada especie presenten el mismo aspecto morfológico, por lo que se ha postulado una relación entre la visualización nuclear en interfase y la expresión genética.

El término "cromatina" fué introducido en 1882 para designar la porción teñible del núcleo, al describir la transformación del material nuclear en haces longitudinales. La cromatina (Cr) es un complejo de nucleoproteínas constituido por ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA) y proteínas. Las proteínas interactúan coordinada y sincrónicamente con los ácidos nucleicos y entre ellas para controlar y regular la actividad génica. Las proporciones relativas de las proteínas, DNA y RNA de la Cr varían de acuerdo al tejido, especie y método de preparación. Durante el ciclo celular, el DNA tiene que ser replicado, condensado y segregado a cada una de las células descendientes, con lo cual se perpetúa la especie (1).

La condensación del DNA depende de la presencia de proteínas básicas que neutralizan las cargas negativas (grupos fosfato) de los ácidos nucleicos. Así, la relación DNA/RNA-proteínas determina la estructura de la Cr. La masa de Cr contiene casi el doble de proteínas que de DNA. Las proteínas son de dos tipos: histonas, que son muy básicas y no histonas. Usualmente hay un poco más de histonas que de DNA por peso. La proporción de las no histonas, con respecto a las histonas, es ligeramente menor pero de mayor variabilidad. La cantidad de RNA es menor de 10% del DNA y tal vez comprende cadenas de novo que no han sido liberadas, sin descartar la posibilidad que existan moléculas con funciones estructurales. La interacción DNA-histonas está bien caracterizada, pero sigue en duda si las no histonas tienen una función estructural en la compactación de la Cr (1-3).

Por estudios en cromosomas politénicos de *Drosophila* sp. se estableció inicialmente que estaban formados por múltiples hebras duplex de DNA (Teoría polinémica). No obstante, experimentos por autorradiografía e intercambio de cromátidas hermanas (ICH) demostraron que cada cromátida comprende una sola molécula de DNA (Teoría uninémica) (1,3,4).

Si fuese posible medir la longitud del DNA del genoma humano, éste tendría aproximadamente dos metros. En interfase, un núcleo con un diámetro de 5 μm contiene esta extraordinaria cantidad de DNA. Si lo comparamos organizado en 46 cromosomas, cuya talla en metafase es de 2-10 μm , deberá contener -14,000 μm de DNA el cromosoma más pequeño y -73,000 μm el más grande. De esta manera el material genético, en su estado más condensado, tendrá una compactación de -10,000 veces (1,4).

Las histonas son proteínas básicas con carga positiva y presentes en todas las células eucariontes. Son ricas en arginina y lisina y por la cantidad relativa de cada uno de estos aminoácidos se clasifican en 5 tipos (1-5).

Las histonas H1 tienen un peso molecular de 23,000 daltones y son las más básicas (30% de lisina). Las H1 de mamíferos están muy relacionadas en secuencia. Además, existe una variante (H5) en aves, reptiles y ciertos anfibios y aparentemente está ausente en levaduras (1-5). Las otras histonas, H2A y H2B son ligeramente ricas en lisina, mientras que H3 y H4 son ricas en arginina. Tienen un peso molecular de 11-16,000 daltones y cerca de 25% de sus aminoácidos son básicos e interactúan con el DNA para formar el primer nivel de organización de la Cr (1-3).

Las histonas sufren modificaciones durante el ciclo celular, tales como acetilación, metilación, fosforilación y ADP-ribosilación. La selección de un pequeño número de residuos de cada histona indica que la reacción es específica, lo cual se relaciona con etapas de maduración (1).

La presencia de las cinco clases de histonas en los eucariontes sugiere un evento antiguo, que ha evolucionado por divergencia de secuencias duplicadas y representado inicialmente

por una sola proteína de unión al DNA. Su existencia implica una gran estabilidad estructural. Las histonas ricas en arginina son las más conservadas evolutivamente. Las ligeramente ricas en lisina parecen haber evolucionado más rápido que las anteriores y las ricas en lisina en un orden de magnitud aún más rápido (1-5).

Las proteínas no histonas comprenden una proporción ligeramente menor que la de histonas, con un peso molecular de 10-180,000 daltones. Muestran una tasa de recambio superior a la de las histonas; algunas persisten escasos minutos y otras son tan estables como el DNA. Participan activamente en funciones de síntesis y reparación del DNA, síntesis y degradación de RNA y proteínas y añadiendo o eliminando grupos acetato, metilo o fosfato. También, participan como componentes estructurales de la célula (actina, miosina, tubulina y tropomiosina) (1,6).

El contenido nuclear está organizado en una estructura llamada "fibra de cromatina". Al iniciarse la condensación cromosómica, cada cromátida constituye una fibra enrollada o cromosoma (1). Varios modelos han tratado de explicar como esta fibra (20-30 nm de diámetro), se organiza para formar un cromosoma. Las micrografías electrónicas la describen como nudosa, irregular, hinchada y abultada. Si la masa promedio de una fibra equivale a -5.95×10^{-16} g/ μ m \pm 29% y la masa seca de un linfocito humano a -45×10^{-12} g, entonces una fibra de Cr tendrá -7.6 cm por núcleo (4). El alto grado de empaquetamiento del DNA hace suponer que la fibra básica de 30 nm posee un nivel de organización supraestructural.

Estudios con difracción de rayos X y microscopía electrónica confirmaron la presencia de una estructura periódica en la Cr (cuerpos "nu"). Esta partícula fue llamada nucleosoma y contiene -200 pares de bases (pb) de DNA, con un diámetro de 6-8 nm y unidas por filamentos de DNA de 1.5 nm de diámetro. Pero al eliminar H1, la partícula central o "core" llega a contener -140-146 pb y el filamento que las une es el DNA de unión o "linker". Tal estructura se ha observado como "cuentas de un rosario" (1,2,5,7) (Figura 1). En cada partícula central el DNA adquiere una nueva conformación, que produce una inflexión cada 10 pb y una hiperhelicidad al interactuar con las histonas (3).

La estructura del nucleosoma fue inferida por Kornberg y Klug en 1974, a partir de las propiedades cromatográficas de las histonas. Esta se compone por un octámero de histonas, rodeado por -200 pb de DNA. El octámero consiste de dos moléculas de cada histona (excepto H1). Las histonas H2A y H2B forman dímeros y H3 y H4 forman tetrameros (7) (Figura 2). Algunos trabajos demuestran que H1 se localiza en el punto en donde entra y sale el DNA de la partícula central. La función de H1 es dar una estructura polar a la partícula, lo que permite la formación de estructuras de orden superior al condensar la fibra de Cr (Figura 3). El arreglo del DNA condiciona la estructura del nucleosoma al enrollarse cerca de dos vueltas sobre el octámero, con un diámetro de -110 Å y una altura de 55-60 Å (3,7) (Figura 4).

La H1 produce el superrenrollamiento de la fibra de 10 nm en una de 30 nm y un empaquetamiento de 40 veces su longitud. Se ha visto que existe un arreglo continuo de los nucleosomas llamado solenoide, con -6 nucleosomas por vuelta. Estos giran en forma helicoidal y forman un ángulo de -60° entre las caras de nucleosomas adyacentes (Figura 5) (2,3,5).

La fibra de Cr en los periodos G1 y G2 forma alternadamente asas pequeñas o "loops" y segmentos extendidos, los cuales ascienden a -8,000 por genoma haploide. Estos loops muestran una apariencia nudosa, con un diámetro de -20 nm y dado que 15-18% de la Cr es DNA, un nudo debe tener -2-2,500 pb (3). Se ha observado que al remover las proteínas de un cromosoma en metafase queda un armazón central o "scaffold" rodeado por un halo de DNA. El halo consiste de muchas asas, cada una (35-100 μ m) anclada a la base del armazón central. El análisis de la estructura central revela un predominio de dos proteínas de 135 y 170 (topoisomerasa II) kilodaltones, las cuales forman al parecer el eje central (2,5).

Ciertos hallazgos sugieren que la localización de las histonas es independiente de secuencia. No obstante, se ha observado en otras regiones que existe un fenómeno llamado "phasing", donde muestra que los nucleosomas no se ubican al azar. Este reconocimiento no sólo se da en secuencias altamente repetitivas o secuencias en "tandem", sino también en secuencias únicas. Quizá algunas de ellas se hallan preferentemente en

sitios donde las inflexiones del DNA rodean al octámero, mientras que otras son excluidas (2,5,8). El "phasing" se forma en sitios donde la unión DNA-octámero está impedido por la presencia de no histonas asociadas a una secuencia específica. Espero, no se conoce si el "phasing" es un evento fortuito producto de las propiedades conformacionales del nucleosoma o si expone ciertas secuencias para interactuar con factores de regulación (5).

El comportamiento y distribución de las histonas durante la replicación aún es oscuro. Espero, se han propuesto tres modelos que explican la segregación del octámero. Uno conservativo que establece que los octámeros preexistentes permanecen en una cadena y los de novo en la otra. Otro propone que el octámero se conserva parcialmente, segregándose tetrameros y reorganizándose al adicionar nuevas histonas. Y el último, menciona que el octámero se disgrega en histonas individuales, las cuales se integran al azar con las nuevas para formar el octámero (1,2).

La transcripción se localiza particularmente en la Cr dispersa y participan histonas modificadas, no histonas y RNA, con propiedades físicas diferentes a las regiones condensadas o inactivas. Tanto las secuencias activas como las inactivas (85%) están organizadas en nucleosomas y se postula que las histonas inactivaban las secuencias codificantes (3). Espero, las observaciones en genes ribosómicos de Drosophila sp y Xenopus sp. confirmaron que el DNA se encontraba completamente "desnudo". Sin embargo, cuando estos genes son transcritos, el número de nucleosomas es normal. De igual manera, en genes de globina y ovoalbúmina de pollo, tanto las secuencias activas como las inactivas poseen nucleosomas, lo que implica que estos últimos son desplazados al pasar la RNA polimerasa y reorganizados inmediatamente después (2,3).

También, se ha visto que existen "regiones hipersensibles" a DNasa I, localizadas en sitios donde la enzima tiene una alta probabilidad de corte (100-200 pb). Estas generalmente flanquean el extremo 5' (1,000 pb) de genes activos y pueden estar presentes más de un sitio por gen (2,5). Al parecer la metilación regula la expresión de los genes, ya que 5% de los residuos de citosina son metilados. Primero, por la adición de un grupo 5-metil a la

citosina que altera la interacción DNA-proteínas (represores o activadores) y segundo, porque las secuencias ricas en guanina y citosina (GC) modifican la conformación del DNA B (DNA Z) (5).

Por otro lado, al inicio de la división celular ciertos segmentos o cromosomas se tiñen más intensamente que otros, debido a que están relativamente más condensados. Este fenómeno de contracción diferencial fue definido como heteropicoeosis y éstos fueron llamados heterocromosomas. Mientras que a aquéllos que se tiñen uniformemente se les llamó eucromosomas (9).

Por lo anterior, la heterocromatina (HC) se designa como aquellas regiones del núcleo que muestran una mayor condensación y tinción (heteropicoeosis positiva), en interfase, pero no en telofase. La eucromatina (EC) se designa como las zonas de menor grado de condensación y carentes de heteropicoeosis. Además, la EC se condensa en metafase y anafase y la HC adquiere una menor condensación (10-13). Esta asincronía entre estos dos ciclos fue llamada alopicia (12,13). En interfase, ciertas zonas pueden formar agregados de material genético densamente teñidos llamados cromocentros, algunas veces asociados al nucléolo. Mientras que en metafase, es visible un gránulo muy teñido o cromómero como parte integral del cromosoma (1,2,13).

Los estudios de microscopía electrónica revelan que el contorno nucleolar es incoloro (nucleoplasma) y está constituido por fibrillas finas (EC) con agregados densos (cromocentros). La HC consiste de las mismas fibras de nucleoproteínas que la EC, organizadas de tal manera que permiten estados alternativos en el empaquetamiento de la Cr entre interfase y mitosis (1,2). Mucho se habla de que el núcleo durante la interfase se encuentra en reposo. Esto es erróneo, ya que es en ese momento cuando se realiza la principal actividad génica: la síntesis protéica.

Se ha confirmado que la Cr tiene un orden dentro del núcleo. En interfase, metafase y telofase está unida a los complejos de poro nucleares (laminilla anular). Paulatinamente la nueva envoltura nuclear forma una estrecha asociación con vesículas planas y cromosomas. Así, los cromosomas se condensan en la profase hacia el interior de la membrana nuclear por múltiples

sitios de unión a las laminillas anulares. Otras observaciones sugieren que estos sitios en los cromosomas son específicos y con unidades funcionales, cada una con un patrón de unión distinto. Una o dos laminillas anulares se han encontrado incorporadas a las asas de un cromómero. Por otra parte, se ha llegado a la conclusión de que cada cromómero participa en la distribución de la Cr de manera organizada después de la telofase. La membrana nuclear forma con las laminillas anulares puntos de iniciación de replicación y provee la orientación cromosómica de telofase a interfase. Además, la membrana nuclear puede proveer a los cromosomas de una unidad funcional, el cinetocoro (4,14).

La HC se adhiere a la membrana nuclear inerte o "lamina" y a las porciones intranucleares de la matriz nuclear. Esta unión parece exclusiva de las secuencias ricas en adenina y timina (AT) (cromómeros) para interactuar con una proteína no histona específica, la cual pudiera ser la responsable del superrenrollamiento. Actualmente se postula que el DNA de replicación tardía es genéticamente inactivo (HC) y que se condensa en la superficie interior de la membrana nuclear inerte, en la lamina y alrededor del nucléolo. El DNA genéticamente activo (EC) se localiza centralmente unido a la matriz intranuclear y asociado a un complejo de ribonucleoproteínas (RNP). Por ello, los cromosomas preferentemente heterocromáticos se ubican en la periferia (X inactivos y cromosoma Y) durante la metafase. Además, existe una asociación de la HC con los cromocentros y cromómeros. También la HC es importante para la atracción y alineamiento de centrómeros (cen) con cen y de telómeros con telómeros por las fibras del huso acromático (14).

La Cr sufre cambios en su empaquetamiento durante el ciclo celular al adoptar diferentes niveles de organización, con un grado de compactación de ~50 veces. Dado que el grado de empaquetamiento de un cromosoma es ~7,000, son necesarios por lo menos dos órdenes más de condensación de la fibra solenoidal (2).

Estudios con cromosomas de condensación prematura (CCP) evidencian la existencia de un ciclo de condensación cromosómica durante el ciclo celular. La estructura de los CCP revela que en la etapa de G1 se establecen los cambios conformacionales de la

Cr. Aun cuando la Cr no se condensa durante el período S, se han observado cromosomas pulverizados con regiones no condensadas correspondientes a sitios de replicación. Por lo tanto, hay diferentes tiempos de replicación cromosómica, siendo el cen el último sitio en replicarse. En G2 los CCP son largos, su condensación inicia poco después de la replicación y alcanzan su máximo en metafase. Esto demuestra que el tiempo de condensación de la Cr es dependiente de secuencia (15).

Diversos factores, como la actividad de la fosfocinasa de H1, se han atribuido que repercuten con el inicio de la condensación de la Cr. Otros, son por un cambio conformacional de la distribución de las histonas ricas en lisina, las cuales se unen a regiones AT. Estudios de la interacción entre DNA e histonas confirman que las colas ricas en lisina son las responsables de la formación de estructuras de orden superior. Asimismo, la proteína A24 (interfase) sufre una conversión a H2A (mitosis) durante la etapa G1. Otro factor atribuible es la transición reversible de grupos SH a puentes S-S que ayudan a la condensación de la Cr (3).

Se han propuesto varios modelos que explican la compactación de las fibras solenoidales a las dimensiones de un cromosoma. El modelo llamado de "la fibra doblada" (Du Praw, 1966) menciona que antes de la replicación, cada cromosoma conforma una larga fibra de desoxirribonucleoproteínas (DNP). Esta fibra se pliega al azar repetidamente sobre sí misma en forma longitudinal y transversal hasta conformar la cromátida. Esta última, replica durante el período S con uno o más replicones, lo que da lugar a dos cromátidas hermanas unidas por regiones no replicadas. En profase, ambas cromátidas se doblan para formar los cromosomas unidos por el cen. Los cen replican antes de la anafase y se produce la separación de las cromátidas. En profase y metafase las fibras hijas se doblan en forma reproducible de una generación a otra. Y en telofase, las cromátidas se desdoblan para adquirir su posición nativa en la interfase y unidas a la membrana nuclear (16). Este modelo ha servido de base para proponer nuevos modelos de la estructura cromosómica, a pesar de que erróneamente planteaba la replicación del cen en la anafase.

Stubblefield y Wrang (17) sugirieron que la constitución cromosómica estaba formada por múltiples moléculas de DNA y unidas por la parte centromérica; no obstante, éste y otros modelos polinémicos son ya obsoletos. Bak y cols. propusieron que las cromátidas tienen una organización muy sencilla. El doblado y enrollamiento en asas forma una estructura cilíndrica, hueca, regular y larga, con un diámetro de -400 nm llamado "supersolenoides" (18).

Otro modelo propone que en una cromátida la fibra de Cr se pliega en asas para formar los cromómeros (cromosomas "lambrush" de anfibios). En un cromosoma alargado, los cromómeros se hacen más pequeños y delgados. En cambio, cuando se contraen, aumentan de tamaño y se asocian entre sí hasta no distinguirse. Al parecer todas las conexiones entre cromátidas hermanas, incluyendo el cen, son asas mutuamente extendidas y ancladas en la cromátida hermana opuesta por uniones salinas, puentes S-S o enlaces modificados durante el ciclo celular (4).

Adolph y cols. (19) descubrieron que los cromosomas de células HeLa mantienen su estructura después de remover histonas y no histonas. Las proteínas remanentes (8%) representan un "armazón central", que conserva la morfología de los cromosomas, al cual se une el DNA. Al tratar con nucleasa micrococcal este armazón se separa del DNA, formando una estructura fibrosa con menos de 0.1% de DNA y aparentemente sin histonas.

Paulson y Laemmli demostraron que los cromosomas libres de histonas adquieren una forma expandida con asas de 10-30 μm a lo largo de un armazón central, los cuales forman un "halo" de fibras densas longitudinales (20). No obstante, Marsden y Laemmli propusieron un modelo llamado de "asas radiales", donde la fibra de DNP se dobla en asas y en forma radial con las bases nitrogenadas como eje central. Pero al tratar los cromosomas con hexilén glicol se observó una estructura radial y simétrica más compacta, con fibras de -50 nm de diámetro, las cuales continúan unidas al armazón central (21).

Sin embargo, Okada y Comings mencionaron que cuando los cromosomas se sujetan a cualquier manipulación, las fibras

centrales tienden a aglomerarse. Después de tratar con etilandinitrilotetracetato sodico (EDTA) cromosomas aislados y células mitóticas, las RNP se tiñen únicamente en la periferia de los cromosomas y sin observar ningún armazón protéico cuando se eliminan las histonas y se separa el DNA (18,22).

Conforme los cromosomas se condensan, las bases nitrogenadas de las asas quedan en el interior. A mayor distancia entre una y otra, se formarán cromómeros cada vez más grandes para producir el patrón de bandeo. La condensación final se da en el centro y en las asas periféricas (modelo de asas cromoméricas) (18,22).

Básicamente existen 3 tipos de modelos para la estructura cromosómica: 1) un armazón central protéico que mantiene la continuidad de los mismos, 2) cromosomas donde la continuidad es mantenida sólo por el DNA y 3) estructuras intermedias donde la asociación de ciertas proteínas (histonas o no histonas) ayudan a conformar al cromosoma (3). En algunos niveles de organización cromosómica, las estructuras dependientes de secuencia se manifiestan por los patrones de bandeo.

Los procedimientos de tinción para producir un patrón de bandeo cromosómico permiten su identificación individual. Estas bandas se originan por variaciones locales y reproducibles de la ultraestructura, ya que tratamientos con diferentes reactivos producen un mismo patrón de bandeo. Pese a que se conoce poco de la formación y origen evolutivo de las bandas cromosómicas, se han propuesto varios modelos: 1) una distribución diferencial del DNA y un mayor empaquetamiento de la Cr, 2) regiones que contienen o carecen de ciertas secuencias o concentraciones variables de regiones AT o GC y 3) producto de las variaciones en la asociación del DNA y las proteínas no histonas (1).

El mecanismo de bandeo está determinado por una composición diferencial de pb y una extracción preferencial de proteínas cromosómicas (23). Al parecer la naturaleza altamente hidratada de las fibras de Cr representa sólo un momento en el mecanismo de bandeo. De los cromosomas más compactos (metafase) hasta los más largos (profase tardía), existe una división de una banda en dos y la aparición de otras en regiones que carecían de ellas (18).

También se ha visto que cada cromosoma en metafase tiene una secuencia identificable de cromómeros grandes y pequeños. En los cromosomas humanos existe un total de 500 cromómeros y 320 bandas oscuras y claras por genoma haploide. Cada banda oscura/clara tendría un promedio de 200 genes estructurales, si asumimos que el hombre tiene ~30,000 genes estructurales. El análisis con mutaciones inducidas sugiere que el número total de genes es casi igual al número de cromómeros. Las bandas positivas (cromómeros) y negativas (espacios intercromoméricos) están en la misma proporción y se estima que 55% del volumen cromosómico es fibra. Puesto que los cromómeros son estructuras que se asocian fácilmente con los cromómeros vecinos, las agrupaciones entre éstos permiten la visualización de las bandas estructurales (4).

Quizá la visualización de algunas bandas sea producto de un arreglo oblicuo de cromómeros para formar fibras longitudinales en espiral. En base a la estructura fibrosa de los cromosomas, se han propuesto tres hipótesis para la producción de las bandas: a) distribución discontinua de la Cr en las cromátidas y regulación de cromómeros, b) afinidades químicas específicas distribuidas a lo largo de las cromátidas que pueden coincidir o no con la distribución de los cromómeros y c) regiones resistentes a la extracción por diferentes agentes que son responsables de la compactación diferencial (4).

Yunis y cols. propusieron un modelo que explica la estructura cromosómica basado en la distribución de la HC. La heterocromatina constitutiva (HC C), formada por grandes áreas oscuras, se compone de secuencias altamente repetitivas. Esta, se localiza en regiones de constricción primaria (cen), regiones de organizadores nucleolares (NOR), regiones de constricción secundaria (h) y posiblemente en regiones teloméricas o intercalada con la EC. Las NOR, secuencias duplicadas "en tandem" de los cistrones ribosómicos 18S y 28S, se evidencian como una h. Otras h se encuentran espaciadas por HC y tal vez representan el sitio de otros genes en tandem, tales como los del DNA ribosómico (rDNA) 5S o los de las histonas (11) (Figura 6).

Comings explica que la estructura cromosómica es una hebra duplex de DNA (20 Å de diámetro), la cual interacciona con las

histonas para producir la estructura básica de la Cr en interfase (100 Å de diámetro). La fibra se compacta hasta lograr una estructura solenoidal de 200-300 Å. Posteriormente, ésta se organiza en asas o cromómeros producto de la asociación entre regiones AT (replicación tardía) y proteínas no histonas de la matriz nuclear. El DNA que se encuentra entre las asas, está compuesto principalmente por regiones GC (replicación temprana). Es probable que cromómeros pequeños se asocien para formar cromómeros grandes (bandas G) en los cromosomas metafásicos (23).

A su vez, Yunis propuso que asas y fibras de Cr se pliegan para formar los cromosomas prometafásicos. En profase tardía, las fibras contiguas inter-asas tienen una o más bandas cromatídicas densas y forman de 8-13 para constituir una banda oscura. Estas bandas contienen un número similar de estructuras en asa que representan a las bandas G positivas (24). Debido a que estas últimas replican tardíamente y son ricas en DNA moderadamente repetitivo, es posible que la HC intercalar no posea una función génica (23,24). Por otro lado, las bandas claras (G negativas) son sitios preferentes de hibridación con RNA mensajero (mRNA) o con sus precursores, por lo que las fibras extendidas en interfase no están ordenadas al azar y representan las unidades informacionales (24).

III. BASES MOLECULARES DE LA HETEROCROMATINA.

A. ANTECEDENTES HISTORICOS.

Al principio, tanto en plantas como en animales, únicamente fueron observadas masas de Cr teñidas intensamente. Su naturaleza y función no fueron entendidos hasta que Heitz (25) elucidó que estas áreas eran regiones que permanecían condensadas durante mitosis (9). Más tarde, se vió que la HC duplica tardíamente y la EC no. Otros trabajos revelaron la presencia de dos tipos de HC: una localizada en posición idéntica en los cromosomas homólogos llamada "heterocromatina constitutiva" y otra que varía en su estado de condensación en diferentes tipos celulares y estadios de desarrollo llamada "heterocromatina facultativa" (HC F). Ambas son similares en estado condensado durante el ciclo celular y asincronía en la replicación. Empero, tienen muy poco en común y se consideran independientes (9,26).

La condensación y la aloclicia se manifiestan de diferente forma de acuerdo con el tejido o estado funcional del organismo. Por consiguiente, se especulaba que la HC es más que un estado una sustancia que podía potencialmente transformarse de EC a HC o viceversa. Además, se propuso que todas las zonas cromosómicas de duplicación tardía eran de HC. Empero, se observaron regiones con síntesis asincrónica de DNA que no eran heterocromáticas y, al contrario, había HC sin replicación tardía (12).

Sin embargo, no fue hasta que Brown propuso en definitiva dos tipos de HC: 1) la HC C que aparece desde las primeras divisiones del cigoto y se distribuye en forma equivalente en los cromosomas homólogos y 2) la HC F que se origina en estadios algo más avanzados de la embriogénesis y que resulta de la inactivación de uno de los dos cromosomas X en las hembras (10).

La localización de la HC es similar en los cromosomas de diferentes especies (cen, telómeros y adyacente a las NOR). Se encuentra también en los cromosomas sexuales y cromosomas supernumerarios. Entidades individuales de HC algunas veces se combinan unas con otras para formar aglomeraciones amorfas. En

cromosomas individuales, comúnmente comprende grandes bloques o segmentos espaciados por EC. Por el contrario, pequeños fragmentos de HC pueden hallarse en la EC (10).

El cromosoma Y y el cen de los demás cromosomas de Drosophila sp. están formados por HC. Estas regiones son innecesarias para su viabilidad, por lo que se supuso que la HC era genéticamente inactiva (10). Pero el hallazgo de genes intercalados en estas áreas y el reconocimiento del "efecto de posición o variegación", puso en duda la noción de la inactividad génica (10,12). No obstante, se definió a la HC C como un tipo distinto de Cr y se adjudicó el término estructural para evitar tal ambigüedad. Posteriormente, con los inicios de la biología molecular se elucidó que la HC C estaba formada por DNA altamente repetitivo, principalmente, DNA satélite (DNA sat). Estos resultados fueron corroborados más tarde por hibridación in situ en preparaciones de varias especies animales (11).

A partir de este momento un gran número de técnicas citogenéticas, autorradiográficas y, principalmente, moleculares han contribuido en descifrar el comportamiento y la composición de la HC. Los resultados indican que posee secuencias genéticamente inactivas y que no tiene un efecto directo sobre el fenotipo. Sin embargo, no sería sorprendente encontrar que pudiera tener una función muy importante en la regulación de la expresión génica varaus ambiente en todas las especies.

B. HETEROCROMATINA FACULTATIVA: PROPIEDADES, FUNCION Y ORIGEN.

El concepto de la HC F surgió de la necesidad de definir el comportamiento de uno de los cromosomas X de las hembras de mamíferos y de la inactivación del complemento haploide de origen paterno en algunos insectos (cócidos); en ambos casos, los procesos de heterocromatinización tienen grandes similitudes. Se manifiestan durante la embriogénesis, específicamente afectan a uno de los homólogos y están relacionados con la determinación sexual. Dadas estas analogías, los cromosomas condensados resultantes en ambos fenómenos se identifican como HC F (12).

Los primeros trabajos sobre la HC F se encaminaron a estudiar la constitución cromosómica de una sabandija macho. Luego introdujeron el concepto de "compensación de dosis" para explicar la expresión génica ligada al cromosoma X en Drosophila sp. Sin embargo, cuando la mayor atención estuvo enfocada al cromosoma X de mamíferos (10,26), condujo a la hipótesis de que, en células femeninas, uno de los cromosomas X se inactiva durante los primeros estadios embrionarios para compensar el dosaje de los cromosomas sexuales entre ambos sexos (Lyon, 1961) (27).

Uno de los fenómenos más conspicuos resultado de la heterocromatinización, es la condensación de la HC F. En las hembras de mamíferos, el cromosoma X es un acúmulo heteropicnótico positivo, el cual es llamado "cromatina sexual" (Cr S) o "cromatina X" (Cr X). Se identificó al observar un elemento densamente teñido en el núcleo de las células nerviosas de un gata. Esta Cr X o "corpúsculo de Barr" resultó ser un rasgo característico de las células femeninas de mamíferos y no del grado de actividad celular. En general, suele adherirse a la membrana nuclear, tener dimensiones de 0.8-1.1 μm y formar una estructura bipartida unida por una región central de EC. La frecuencia de Cr X en las células varía de acuerdo al tejido y estado funcional de la célula. El número de corpúsculos equivale al número de cromosomas X menos uno ($nX-1$), aunque también depende del nivel de ploidía. Por consiguiente, los machos normales (XY) de mamíferos que tienen un sólo cromosoma X carecen de cromatina sexual. En tanto que las hembras normales (XX) poseen sólo un corpúsculo (12).

En mamíferos, la inactivación de uno de los cromosomas X neutraliza la doble dosis de genes ligados al X de las hembras. Varios estudios comprueban su existencia; entre estos se menciona que los productos génicos de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), fosfogliceratocinasa, α -2-macroglobulina, factores antihemolíticos A y B y otros, ligados al cromosoma X, se hallan en cantidades similares en ambos sexos (12).

Varios modelos han tratado de explicar el proceso de inactivación del cromosoma X: a) la existencia de un factor episómico, b) la presencia de uno o más genes en el X que

controlan su actividad génica, c) la presencia de un gen autoédmico y d) la combinación de moléculas activadoras y un sitio receptor en el cromosoma X (12).

La aparición de la Cr X señala el proceso de heterocromatinización durante la embriogénesis. En el hombre, el corpúsculo aparece entre los 12-19 días, una vez que el huevo se ha implantado. Además, esta aparición no es simultánea en todos los tejidos, sino que en algunos (placentarios) es más precoz que en otros (hígado, intestino, músculo esquelético y cardíaco). La Cr X es cualidad de las células somáticas, pero no de las germinales, ya que los dos cromosomas X de la hembra están elongados, lo cual indica que ambos están activos (12).

Algunos estudios enzimáticos indican que la inactivación del X ocurre en los primeros estadios embrionarios antes de la diferenciación tisular (mórula). Los primeros eventos son en el trofoectodermo, seguido por el endodermo primitivo y, finalmente, por el ectodermo. Otros señalan que la inactivación en tejidos no embrionarios no es al azar y que el X paterno es el que está preferencialmente inactivo. Este último inicia la replicación más tempranamente que el X activo, lo cual es opuesto a lo encontrado en células somáticas. Al parecer este mecanismo varía de un tejido a otro. Algunos datos contradictorios en células germinales humanas (actividad de la G6PD) sugieren que éstas derivan de células embrionarias con X inactivo y que la reactivación se inicia al mismo tiempo que la meiosis (26).

Ciertos genes, tales como Xg y STS (5), utilizando la actividad de la esteroide sulfatasa y G6PD escapan de la inactivación total. Además, se ha demostrado en mujeres con Distrofia Muscular de Duchenne (ligada al X) que esta región no está sujeta a la completa inactivación. No obstante, se ha sugerido que el centro de inactivación está localizado entre las subbandas Xq11.2-q21.1 (26).

Comings sugiere la unión del cromosoma X a un sitio específico de la membrana nuclear como un factor regulador de la actividad génica. Este cromosoma se mantiene funcional, mientras que todos los demás X se transforman en heterocromáticos e

inactivos (23). Asimismo, la metilación acoplada a un sistema de retroalimentación se ha propuesto como un mecanismo regulatorio. Los modelos más recientes se basan en hechos complementarios tales como aberraciones cromosómicas, unión a membrana, proteínas no histonas, DNA X y metilación del DNA (26).

La mayoría de las hembras de mamíferos presentan un cromosoma X de replicación tardía, aspero en algunas especies (*Akodón*) puede haber condensación sin replicación tardía. En la embriogénesis (mórula) de conejo, el cromosoma X puede carecer de condensación y replicar tardíamente. Si bien la condensación y la replicación tardía son dos propiedades muy coincidentes, hay casos, como en los anteriores, en que suelen ser independientes (12). En muchos mamíferos, el cromosoma X representa cerca de 5% del complemento haploide y en algunos casos hasta un 10% (hamster dorado y chino), 15% (*Microtus oregonii*) y 20% (*Microtus agrestis*) del genoma. Estos han conservado el X original a partir de un ancestro común. Sus grandes dimensiones se explican por una serie de duplicaciones durante su evolución (28).

El inicio de la replicación del X inactivo se retrasa tanto que sus bandas R (replicación temprana) coinciden con las bandas G de otros cromosomas. Una vez iniciada, la tasa es mayor que el promedio en la célula. Reportes recientes evidencian que la secuencia de replicación, con respecto a las bandas, no siempre es la misma en los cromosomas X inactivos de las diferentes células de un mismo individuo. Algunos estudios sobre perfiles de replicación de cromosomas X anormales en diferentes tejidos también indican variaciones dependiendo del tipo celular (26).

Diversos estudios sobre la HC F demuestran que, a diferencia de la HC C, no está formada por secuencias altamente repetitivas. Esto no significa que la HC F excluya la existencia de HC C. Por el contrario, se sabe que los cromosomas X de la mayoría de los mamíferos poseen una pequeña región de HC C. Pero en otros, como *M. agrestis*, 5% del material del X es de HC C (12). Es posible que el proceso de heterocromatinización facultativa implique un cambio de tipo protéico y/o de RNA asociado al DNA (12).

Por otro lado, se ha visto en aves y serpientes que el sexo

masculino es homogamético (ZZ) y el femenino heterogamético (ZW). La única especie en aves que presenta Cr X es Gallus domesticus Empero, los resultados son contradictorios, puesto que el corpúsculo lo han identificado en hembras y no en machos. En algunas serpientes se ha observado que la Cr X es atribuida al cromosoma W. En anfibios y peces no se ha visto aún un rasgo similar a la Cr X. Pero en varias especies de insectos y crustáceos se ha postulado su existencia (12).

Finalmente, se asume que toda especie cuyas células presentan corpúsculos similares a la Cr X posean también HC F, aunque alguna de ellas no se ajuste a la definición clásica. Tanto en serpientes como en aves se ignora el momento de su aparición durante la evolución, así como su probable asociación con el fenómeno de compensación de dosis. Además, la probabilidad de que exista HC F en la mayoría de las especies es todavía una interrogante, ya que los resultados son confusos y se desconoce, en algunas de ellas, cual es el sexo heterogamético (12).

C. PROPIEDADES DE LA HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA.

1. Rasgos Particulares.

La HC C tiene una serie de propiedades tales como condensación, distribución particular, inactividad génica, duplicación tardía y tendencia a asociarse con otras regiones de HC. Estas se han empleado para definirla y diferenciarla de la HC F. Además, estudios bioquímicos y moleculares demuestran que está compuesta por secuencias cortas repetidas "en tandem" miles de veces (DNA sat). Por consiguiente, la HC C adquiere otras propiedades importantes que se discutirán más adelante.

a. Condensación.

Los cromosomas humanos parecen como fibras heterocromáticas que varían en grado de plegamiento y condensación dependiendo del tipo celular. Se especula que la HC es una sustancia y no un estado y que la fibrilla condensada de HC es la unidad citológica fundamental de la HC C y no el cromocentro (12,29).

Cultivos de tejidos muestran que sus células tienen muy pocos cromocentros, mientras que células no cultivadas poseen grandes bloques de HC. Por hibridación *in situ* se ha demostrado que el DNA sat se localiza en los cromocentros de las segundas y está diseminado en el núcleo de las células activas. No obstante, la distribución y la cantidad de DNA sat de ambos grupos es similar. Además, la mayoría de los subtipos de DNA sat aparecen en la Cr condensada de las primeras y en la no condensada de las segundas. Esto indica que la HC C pierde su identidad citológica, pero no su identidad química (12).

Por otro lado, en células de la glándula tiroides de M. agrestis, la HC C forma grandes bloques heteropicnóticos. Espero, después de estimularlas con tirotrófina hipofisiaria, la HC C pierde condensación y la heteropicnosis (12). También, por micrografías electrónicas muestran una asociación con nucléolos y una capa de Cr condensada que envuelve a la membrana interna nuclear, lo que pueda tratarse de la misma estructura (30).

b. Distribución en el Genoma (Heterogeneidad).

Se ha demostrado en diferentes especies vegetales y animales que la HC C posee una distribución heterogénea en el genoma. En algunas de ellas se localiza preferencialmente en los cen y telómeros. Inicialmente se determinó su ubicación en base a la distribución de las h, aunque pronto se observó que no todas las h correspondían a HC C y viceversa (12).

Pardue y Gall (31), al emplear por primera vez la técnica de hibridación *in situ*, registraron un patrón más exacto de la distribución cromosómica de la HC C. Sin embargo, sólo se estudiaron algunas especies debido a que las técnicas eran complejas y relativamente costosas. Al perfeccionarlas, se observó una coloración positiva en las regiones formadas por DNA sat. Estas, por el hecho de encontrarse preferentemente en los cen recibieron el nombre de bandas C (32). Esta última pronto se adoptó como rutina por su facilidad y bajo costo. La ubicación telomérica e intersticial es poco frecuente en muchas de estas especies y más que una regla, constituye una excepción (12).

Trabajos paralelos con otros métodos de tinción (bandas G-11) indicaron que la distribución heterogénea prevalece. Más tarde, se observó que la gran banda C del cromosoma 1 es citológicamente heterogénea y con dos entidades distintas: G-11 positiva y G-11 negativa. Aunque éstas son constantes, la distribución relativa y proporción varía en diferentes cromosomas 1. Tal heterogeneidad también se ha encontrado en la banda C del cromosoma 9, al compararse los patrones de las bandas G, G-11 y DA/DAPI (distamicina A/4'-6-diamidín-2-fenilindol) (26).

Es evidente que varios cromosomas exhiben heterogeneidad al emplear varios métodos de tinción. Por otro lado, con el uso de endonucleasas de restricción se ha corroborado también la gran heterogeneidad de la HC C. La correlación entre la localización citológica y los resultados moleculares establece que estas regiones poseen secuencias muy heterogéneas ubicadas en regiones particulares (centroméricas). El grado de variabilidad, por lo tanto, puede considerarse especie-específica (26).

c. Inactividad Génica.

En *D. melanogaster*, el análisis genético muestra que la HC C del X se halla casi libre de genes (sólo contienen un gen llamado "bobbed", el cual afecta el tamaño del vello de la mosca). En contraste, los dos tercios restantes contienen más de un centenar de genes que controlan los rasgos fenotípicos. Por otro lado, el maíz y otros vegetales poseen cromosomas supernumerarios: estos son pequeños, heterocromáticos y pueden variar en cantidad entre especies, sin cambios fenotípicos (12).

El efecto de posición, la indiscutible importancia del cromosoma Y para la fertilidad y el hallazgo de algunos genes activos insertados en regiones de HC, sugieren que estos sitios no están carentes por completo de actividad génica. Por consiguiente, este fenómeno puede ser resultado de cambios en la asociación de un gen con otros y no de la vecindad de dicho gen con la HC. Puesto que el cromosoma Y de *D. melanogaster* contiene pequeñas cantidades de DNA altamente repetitivo, es posible que el factor de fertilidad esté controlado por una región de EC intercalada en la HC C y con actividad génica (12).

Por otra parte, las variaciones en la cantidad de HC C sin efectos fenotípicos indican su escasa o nula actividad génica. Otros descubrimientos revelan que no sólo carece de genes, sino que, *in vivo*, el DNA altamente repetitivo no se transcribe (12).

d) Replicación Tardía.

Por autorradiografía se ha observado que la HC C en el saltamontes y en el centano es de replicación tardía, lo que demuestra que es un fenómeno general. No obstante, otros estudios en diferentes especies (mosco, rana y rata de laboratorio) han revelado que: a) existen áreas de replicación tardía que no corresponden a HC C, b) la HC C no siempre es de replicación tardía y c) existen h tanto de replicación temprana como tardía (éstas formadas o no por HC C) (12). En conclusión, se asume que la replicación tardía es una propiedad frecuente, pero no constante ni exclusiva de la HC C.

La replicación y la condensación no son estados fijos. Se ha visto que los cambios en el cromosoma X durante el desarrollo germinal son modificaciones de las histonas y no histonas. Así, cuando linfocitos humanos son estimulados 24 horas con fitohemaglutinina, la HC se descondensa y la EC se condensa considerablemente. Pero durante las primeras horas, la acetilación de las histonas sucede por un cambio en la expresión DNA/histonas y, por lo tanto, una modificación estructural de las DNP, es decir, el DNA comienza a transcribir (34).

e. Asociación.

En muchas especies, la HC se distribuye en los cen en forma de corpúsculos de tamaño variable. Empero, los núcleos interfásicos muestran masas de mayor tamaño y menor número. En fibroblatos de Mus musculus, los cromosomas presentan bloques de HC a nivel centromérico, pero en interfase, sólo se observan de 3-6 masas de HC de tamaño mayor. Esta propiedad permite suponer que los cromosomas se asocian durante interfase por zonas de HC. Dicha asociación permanece hasta profase y desaparece en metafase. No obstante, persiste la asociación entre cromátidas hermanas a nivel de los cen y hasta la anafase se produce la

disociación completa. Aunque no ha sido comprobado, en casos anormales persiste la asociación de la HC de algunos cromosomas durante metafase y anafase dando lugar a una no disyunción (12).

Se sabe que los cromosomas homólogos de dípteros se asocian durante toda la interfase y la profase y que este apareamiento entre homólogos se debe a la asociación de la HC centromérica. Algunos estudios asumen que este apareamiento no es al azar. Otras investigaciones en diferentes especies de roedores muestran patrones de asociación cromosómica tejido-específica (12).

Estudios actuales han comprobado que cromosomas dicéntricos y multicéntricos en células L y tumorales de ratón, exhiben sólo un sitio de formación del cinetocoro asociado al cen "activo". Los cen "inactivos" muestran separación prematura. Estas líneas celulares tratadas con 5'-bromodesoxiuridina (BrdU) y anticuerpos anti-BrdU demostraron que la HC pericéntrica inactiva replica más temprano que la asociada al cen activo. Al parecer existe una relación entre el tiempo de replicación de un cen y el tiempo de replicación de la HC pericéntrica. Por otro lado, la replicación de la HC asociada a un cen inactivo puede ser la causa de su separación prematura y, por lo tanto, de su inactividad (35).

2. Tipos de Secuencias en el Genoma Humano.

La mayor parte del genoma eucarionte está concentrado en el núcleo. En general, la cantidad de DNA varía enormemente entre especies, encontrándose diferencias en tipo de secuencias y en número cromosómico, el cual no siempre es proporcional. Una pequeña parte del genoma yace en los organelos (mitocondrias y cloroplastos) con variación en tamaño y tipo de secuencias.

a. Contenido y Número de Genes.

Uno de los principales obstáculos en el estudio del genoma eucarionte, es la manipulación de una gran cantidad de DNA. El genoma de un procarionte (*Escherichia coli*), tiene -3.2 millones de pb, el genoma de un eucarionte inferior (*D. melanogaster*) contiene -50 veces más DNA y el genoma humano contiene -1000 veces más DNA (-2.7×10^9 pb) que un procarionte. Si *E. coli*

posee cerca de 3000 genes informacionales, los genomas de *D. melanogaster* y de humano tendrían cerca de 1.5 y 3 millones de genes, respectivamente. Sin embargo, es probable que no se requiera tal cantidad de genes en estos sistemas. Por lo anterior, se ha encontrado que el genoma total de los eucariontes pueda ser excesivo, ya que existe una mayor cantidad de DNA del que se requiere para codificar los productos necesarios ("paradoja del valor C") (36).

Se ha comprobado que un pequeño porcentaje del genoma eucarionte representa genes estructurales y menos de 6% del genoma de mamíferos son genes informacionales. Asimismo, los mRNA citoplásmicos de muchos eucariontes se transcriben de solamente 2% del genoma total. Por otro lado, gran parte de los transcritos no son traducidos. En mamíferos el RNA heteronuclear (HnRNA), con una complejidad de 5-10 veces mayor que la del mRNA, hibrida 28.5% del DNA total de copia única. En células de ascitis de rata, los HnRNA son transcritos de ~12% del genoma, donde 25% son de DNA repetitivo y 75% de copia única (36).

En general, se considera que la cantidad de DNA de un organismo es proporcional a su complejidad. Esto implica que un incremento en el contenido de DNA debe corresponder a una escala filogenética superior y que el aumento de tamaño pudo originarse por la adición de nuevas secuencias. Posiblemente existe un tamaño mínimo de genoma especie-específico que cumpla las funciones esenciales. Empero, algunos organismos tienen un contenido de DNA mucho mayor que el mínimo de la especie. En aves, reptiles y mamíferos se tiene poca variación con respecto al phylum. En contraste, un extraordinario rango de variación se encuentra en anfibios y en plantas superiores, donde los genomas generalmente llegan a ser diez veces (10n) más grandes (1,2).

Es difícil calcular cuantos genes posee cada eucarionte. Para ello es necesario emplear métodos indirectos como son: la medición de sus productos génicos (HnRNA, mRNA y proteínas) y/o rangos de mutación. Además, es indispensable efectuarlo en todos los tipos celulares y ontogenia de un individuo (2). Las técnicas de biología molecular permitirán, en un futuro no muy lejano, secuenciar prácticamente todo el genoma humano, con lo que las

perspectivas para elucidar un gran número de interrogantes sobre la organización y funcionamiento del DNA son cada vez mayores.

b. Propiedades de Reasociación.

Britten y Kohne demostraron que en varios organismos eucariontes existen secuencias repetitivas (37). El hallazgo de estas secuencias se realizó a partir de análisis de desnaturalización-renaturalización. Se encontró que la cinética de reasociación del DNA refleja la variabilidad de sus secuencias y puede ser empleada para cuantificar genes y sus productos (RNA y proteínas). La renaturalización depende de la colisión aleatoria de las cadenas complementarias. Este análisis se efectúa bajo condiciones especiales de concentración salina y temperatura. El parámetro que la controla (análisis Cot) está en función del producto de la concentración inicial del DNA (moles/lit) y su tiempo de incubación (segundos). El valor requerido para la reasociación de la mitad del genoma es Cot_1 , en donde un valor Cot_1 mayor implica una reacción más lenta y directamente relacionado con la cantidad de DNA (1,2,9,37).

Por lo tanto, Cot_1 de una reacción indica la complejidad de un genoma, al mostrar la cantidad de las diferentes secuencias presentes. Así, cualquier genoma puede ser analizado al compararlo con un DNA de complejidad conocida (*E. coli*) (2):

$$\frac{Cot_1(\text{DNA desconocido})}{Cot_1(\text{E. coli})} = \frac{\text{Complejidad de cualquier genoma}}{3.2 \times 10^6 \text{ pb}}$$

La frecuencia de repetición de una secuencia específica determina su rango de reasociación. Secuencias de repetición relativamente alta reasocian rápidamente (valores Cot bajos). Mientras que secuencias únicas lo hacen lentamente (valores Cot elevados). Los experimentos de renaturalización del genoma eucarionte muestran que existen 3 componentes cinéticos básicos: 1) de renaturalización rápida, 2) de renaturalización intermedia y 3) de renaturalización lenta (1,2).

Los estudios realizados en un gran número de animales y vegetales han mostrado proporciones relativamente constantes de

secuencias repetitivas y secuencias únicas. En mamíferos, las primeras constituyen -30-40% y las segundas comprenden -60-70% del genoma total (29,37). En el genoma humano, las cantidades relativas son similares: 35% y 65%, respectivamente (38,39).

Las secuencias repetitivas se subdividen en dos clases: secuencias altamente repetitivas (DNA sat) que constituyen -10% y secuencias moderadamente repetitivas que comprenden -20%. Las primeras se encuentran de 500 mil a 1 millón de veces y las segundas se repiten de 100-100,000 veces. Estas se encuentran extensamente intercaladas con las secuencias únicas que están presentes de 1-20 veces por genoma haploide (38).

Otra clase de secuencias son las de repetición invertida o palindrómicas. En el hombre constituyen -6% (DNA de orden cero) y comprenden grupos o "clusters" de 2 a 4, dispersos no al azar en todo el genoma. Se encuentran intercaladas con las altamente repetitivas y las de copia única. Además, se localizan en el HnRNA, pero no en el mRNA. Los palíndromos cortos son sitios de reconocimiento para endonucleasas de restricción, útiles en el análisis secuencial del genoma (29,38,40).

El patrón de arreglo secuencial se describe en términos de longitudes aproximadas cinéticamente definidas, al examinar secuencias de diferente grado de repetición. El patrón de período corto comprende secuencias repetitivas cortas [0.2-0.4 Kilobases (Kb)] y no repetitivas (< 2 Kb) alternadas en el genoma (52%). También, se ha detectado (*Drosophila* sp.) un patrón de secuencias largas no repetitivas (> 20 Kb) intercaladas con repetitivas de largo indefinido (20%). El patrón de período corto fue estudiado en *Xenopus* sp. y en erizo de mar, aunque éstos también tienen secuencias no repetitivas largas alternadas con repetitivas de largo indefinido. En el hombre, se ha encontrado un patrón de interposición de secuencias repetitivas, no repetitivas y de repetición invertida en 50% del genoma. Los de período largo son del grupo de secuencias cortas o DNA sat y constituyen la parte principal de secuencias altamente repetitivas (38).

c. Fraccionamiento por Gradiente de Densidad.

El fraccionamiento del DNA nativo por gradiente de densidad en CsCl ha permitido una mejor caracterización del genoma eucarionte. Esta metodología surgió cuando se encontraron componentes menores que diferían en sus densidades de flotación con respecto a la del DNA total. Estos fueron llamados DNA sat y corresponden a secuencias cortas de 6-30 pb repetidas ininterrumpidamente miles de veces. Fueron observados por primera vez en el ratón, cuyo, ternera y cangrejo. Los valores Cot en mamíferos van de 10-5 a 10-2 (36).

En el genoma de *M. musculus*, en adición a la banda principal de 1.701 g/cm³ de sedimentación, se encuentra una banda adjunta o satélite (8%) con densidad de flotación de 1.690 g/cm³ (41). El gradiente de densidad en Ag⁺ Cs₂SO₄ revela una banda principal y varias bandas satélite. En el conejillo de indias una banda satélite pesada y dos ligeras se observan con respecto a la banda principal. La velocidad del DNA sat en ambos gradientes es distinto y la composición de sus secuencias raramente corresponde al valor esperado de densidad de flotación en CsCl (1).

Los gradientes de densidad en CsCl han demostrado que el DNA sat de ratón contiene regiones AT. Los trabajos de Filipski y cols. evidenciaron que el DNA de ternera se separa en tres bandas en CsCl (1.697, 1.704 y 1.709 g/cm³) que representan 50, 25 y 10%, respectivamente (36). Asimismo, Yunis y cols. identificaron las secuencias repetitivas del DNA nativo. La técnica comprende la hibridación de un RNA marcado radioactivamente (RNA³²) a partir de secuencias repetitivas a una sola cadena de DNA nativo y la determinación de las densidades de flotación de los híbridos por gradientes en CsCl neutro. El uso combinado de ésta y la separación en Ag⁺ Cs₂SO₄, ha permitido el fraccionamiento del DNA humano en siete componentes principales: 1.698, 1.700, 1.702, 1.705, 1.708, 1.711 y 1.715 g/cm³. Los componentes 4 y 5 comprenden, respectivamente, -25 y 10% del DNA total, mismos que se observan en otros mamíferos (29).

Marx y cols. encontraron que el DNA humano libre de secuencias de repetición invertida contiene secuencias moderada y altamente repetitivas, que sedimentan en 5 fracciones diferentes en CsCl (Cot 1). Tres de éstas (6% del genoma) poseen propiedades

semejantes al DNA sat, las restantes sedimentan a 1.703 y 1.714 g/cm³ (7 y 9% del genoma, respectivamente). Cada una consiste de una cuarta parte de secuencias altamente repetitivas y tres cuartas partes de secuencias que renaturalizan con Cot₁ de 14 y 7.2, respectivamente (29). Corneo y cols. reportaron 2 componentes con secuencias repetitivas de rapidez intermedia o intermedio-lento que difieren de los encontrados por Marx y cols. El primero consiste de fragmentos de 24 Kb (semejante a la fracción del DNA sat) y el segundo, tiene fragmentos de 600-1800 pb espaciados con secuencias más complejas. Este se encuentra disperso a lo largo del genoma (29).

Mediante la combinación de gradientes de Ag⁺ Cs₂SO₄ y CsCl es posible obtener 4 componentes mayores, 4 componentes menores y 3 satélites del DNA humano. La densidad de flotación y la cantidad relativa de los subcomponentes del componente principal del genoma de mamíferos muestra diferencias especie y tejido-específicas. En los componentes menores, es posible que uno de ellos corresponda al rDNA y otro al DNA mitocondrial (mtDNA) (29).

d. Secuencias Repetitivas y DNA Satélite.

La mayoría del DNA altamente repetitivo puede ser aislado en forma de DNA sat. En insectos y cangrejos cada DNA sat parece ser homogéneo. Usualmente, una unidad de secuencia corta corresponde casi siempre a DNA sat (90%). En *D. virilis* existen 3 diferentes tipos de DNA sat, así como un DNA sat críptico (DNA altamente repetitivo que no se separa como un DNA sat). Todos ellos poseen una longitud de 7 pb y representan ~40% del genoma. En *D. melanogaster* hay 4 diferentes DNA sat presentes en grandes bloques. No hay variación en la cantidad de los DNA sat I, II y IV, con un rango en el número de copias de 400 mil a 1 millón de veces (5.2, 2.6 y 3.8%, respectivamente). El DNA sat III tiene una secuencia compleja de 378 pb con una variación considerable (4%). En algunos cangrejos, el DNA sat tiene una longitud de sólo 2 pb (-AT-) y comprende ~30% del genoma (1,2,12).

En roedores, las secuencias que comprenden cada DNA sat muestran divergencias entre las unidades "en tandem". La digestión con enzimas de restricción muestra que el DNA sat del

conejiillo de indias posee tres secuencias diferentes. Dos de estas (II y III), difieren en proporción con sus componentes menores (42). Por otro lado, cuando el DNA sat de *M. musculus* es cortado con EcoRII, exhibe una serie de bandas que incluye una secuencia predominante de 234 pb (60-70% del DNA sat total). Este representa -10% del genoma y contiene secuencias de hasta 300 pb, en las que las hexaméricas son las más frecuentes (2,12,42). En el cobayo, por gradiente de densidad en CsCl, se han identificado 2 familias de DNA sat. El empleo de Ag^{++} y Hg^{++} ha permitido identificar 4 secuencias hexaméricas diferentes, con un bajo contenido de AT. En la rata canguro (*Dipodomys ordii*) existen 3 DNA sat diferentes con secuencias de 3, 6 o 10 pb (12).

Algunas fracciones de secuencias repetitivas no se separan por gradientes de densidad. Estas son similares al DNA sat, pero más complejas. En *Apodemus agrarius* el DNA sat tiene una longitud de 200 Kb y la unidad repetitiva identificada por reasociación (330 pb) es en realidad más corta, debido a los efectos de mal apareamiento. En el DNA de ternera, también se observa este fenómeno aún con una longitud mucho más corta (17 Kb). Estas secuencias son similares a las del DNA sat, con mayor divergencia e interdispersas con secuencias únicas (42).

En el genoma humano se han reportado 8 familias de DNA sat, cuatro de ellas fueron designadas cronológicamente como I, II, III y IV por Corneo y cols. (43) y otras cuatro nombradas A, B, C y D por Chuang, Saunders y cols. (9,40).

Cabe señalar que no todos los DNA sat reportados fueron aislados de muestras similares y por los mismos procedimientos. Usualmente 3 diferentes gradientes de densidad fueron utilizados: CsCl, Ag^{+} Cs_2SO_4 y Hg^{++} Cs_2SO_4 con DNA total o previamente fraccionado. Además, se emplearon fracciones de Cr obtenidas por cromatografía MAK o por análisis Cot (40).

Básicamente el DNA sat se caracteriza de acuerdo a su comportamiento en gradientes de CsCl neutro, en CsCl alcalino, donde puede analizarse cada hélice por separado, y en CsCl neutro después de reasociar bajo condiciones definidas (40) (Tabla 1).

Tabla 1. Densidades en CsCl del DNA Sat Humano (g/ml) (43).

| Características | DNA sat I | DNA sat II | DNA sat III | DNA sat IV |
|---|--------------|---------------|----------------|---------------|
| Nativo en CsCl neutro | 1.687 | 1.693 | 1.696 | 1.700 |
| Denaturado por T 1xSSC | 1.703 | 1.704 | 1.715 | 1.716 |
| Renaturado a Cot = 0.1 | 1.694 | 1.696 | 1.703 | 1.706 |
| Cadenas separadas en CsCl alcalino | 1.707 | 1.740 | 1.740 | 1.730 |
| Cadenas separadas en CsCl neutro | 1.649 | 1.750 | 1.754 | 1.742 |
| Diferencia de densidad entre cadenas separadas | 0.031 | 0.010 | 0.014 | 0.012 |
| Cantidad relativa (%) | 0.500 | 2.000 | 1.500 | 2.000 |
| Posición en $Ag^+ Cs_2SO_4$ | ligero | pesado | ligero | pesado |
| Elusión en columnas MAK | tardía | temprana | tardía | temprana |

Al analizar la banda principal del DNA de reasociación rápida, se han observado dos fracciones diferentes llamadas α y β . El componente α tiene una densidad de 1.703 g/ml (7% del genoma), se obtiene del DNA de bajo peso molecular y se encuentra interdisperso entre las secuencias únicas. El componente β tiene una densidad de 1.707 g/ml (10% del genoma), se obtiene del DNA de alto peso molecular, al parecer es rico en HC C y se localiza en grandes bloques a lo largo del genoma (43).

Las fracciones A, B, C y D aún no están bien caracterizadas. No se ha observado una adecuada desnaturalización y sus proporciones, en el DNA total, no están bien definidas. El DNA sat A tiene una densidad de 1.712 g/ml. Las cadenas no desnaturalizan en CsCl alcalino (1.775 g/ml) y es rico en GC (53.8%). El DNA sat B tiene una densidad en $Ag^+ Cs_2SO_4$ y en CsCl neutro de 1.726 g/ml. Al parecer tiene propiedades de rDNA y espaciadores. El DNA sat C se observa, en $Ag^+ Cs_2SO_4$ como una banda ligera con una densidad de 1.703 g/ml. El DNA sat D posee una densidad de 1.72 g/ml en CsCl neutro y de 1.782 g/ml en CsCl alcalino (40).

3. Relación entre DNA Repetitivo y Heterocromatina Constitutiva.

En núcleos interfásicos, es posible separar la HC de la EC por métodos físicos. La extracción de la fracción heterocromática muestra una gran cantidad de DNA sat. Sin embargo, el DNA aislado aún requiere purificación y la HC no siempre equivale a la HC C.

Los métodos moleculares, como los de hibridación *in situ*, se pueden aplicar en los cromosomas metafásicos para localizar secuencias alta y moderadamente repetitivas, así como transcritos (mRNA) de repetitividad intermedia y de copia múltiple. La técnica consiste en hibridar moléculas de RNA^{*} con el DNA de los cromosomas en metafase. Inicialmente, las preparaciones se someten a diversos tratamientos y condiciones específicas (tiempo, concentración y temperatura) para desnaturalizar el DNA. Luego, se producen los híbridos con el RNA^{*}, los cuales tendrán una localización específica para cada marcador empleado (44). Esta metodología ha permitido el estudio de la HC C en numerosos grupos de organismos, tales como insectos, anfibios, aves y mamíferos, lo que sugiere que esta última posee una gran cantidad de DNA altamente repetitivo, en especial, DNA sat (12).

a. Localización Cromosómica (DNA Sat).

Los primeros estudios para elucidar el tipo de secuencias en el DNA se realizaron al purificar y fraccionar, por gradiente de densidad en CsCl, núcleos de ratón, encontrándose una elevada cantidad de DNA sat. Más tarde, Yasmineh y Yunis observaron que la HC de las células de hígado y cerebro de ratón están asociadas a nucléolos y contiene 70% de DNA sat (11,29).

Pardue y Gall mostraron, por hibridación *in situ*, que las secuencias satélite del ratón están confinadas a la HC C (cen) de todos los cromosomas, a excepción de una cantidad mínima en el Y (31). En interfase, estas secuencias se asocian a los cromocentros (HC perinucleolar) que parecen formarse por agregación de la HC centromérica. Resultados similares se obtuvieron en el DNA del conejillo de indias, ternera, *M. musculus*, rata canguro, cangrejo y hombre. Se concluye que el DNA

sat generalmente corresponde a -10% del genoma y que existen diferentes tipos, dada su cinética de reasociación (11,29).

Algunos trabajos con el genoma de M. agrestis, se encontró que 2% es DNA sat I y 6% es DNA sat II, pero sin correspondencia con la cantidad de HC C (-20%). Al caracterizar las secuencias repetitivas de la HC C se observó que no sólo contenía DNA sat, sino también secuencias moderadamente repetitivas (15%) (11). En otras especies (M. pennsylvanicus y Ellobius lutescens), la cantidad de HC C es menor y estas variaciones son a expensas del DNA alta (2 y 1.5%, respectivamente) y moderadamente repetitivo (8% en las dos especies). Por lo tanto, la HC C también contiene otros componentes además de DNA sat (11). En vacunos, se han identificado 4 DNA sat. Uno parece ubicarse en los cen de todos los autosomas; los otros en algunos cen. El cromosoma Y, al igual que el del ratón, carece de DNA sat en la HC centromérica (2).

En las regiones teloméricas e intersticiales de los cromosomas, frecuentemente se hallan cantidades mínimas de HC C. Empero, en algunos mamíferos (hamster chino y sirio, M. agrestis, etc.), brazos cromosómicos completos pueden ser de HC C, principalmente los de los sexuales. En otras especies (ratón silvestre), la HC se encuentra en algunos autosomas. Algunas excepciones se observan en hamster chino, donde la HC de Xq y de los cromosomas 10 e Y, no contiene DNA altamente repetitivo. La distribución de las secuencias satélite en aves y serpientes parece ser de varios tipos y en ambos hibrida en la región heterocromática del cromosoma W. En algunas aves de corral, la HC C se halla en los microcromosomas y en el gorrión (Passer domesticus) en los cen de los macrocromosomas (2,9).

La hibridación in situ en insectos (Diptera) muestra que el DNA sat se localiza en las regiones centroméricas, NOR, teloméricas e intercalares de los cromosomas. En D. melanogaster, los 4 DNA sat tienen una distribución específica: el DNA sat I en el cromosoma 4 e Y, el II en el 2, 3 e Y, el III en el X e Y y el IV en el 2 e Y. Las regiones α y β de la HC C hibridan, cada una, con secuencias de diferente grado de repetitividad (2,29,45). La mayoría de las secuencias moderadamente repetitivas se localizan en la HC β y algunas están distribuidas en los cromómeros de

todos los cromosomas, principalmente en el X. En el erizo argeliano, el DNA moderadamente repetitivo posee 23% del genoma y está ubicado en la HC intercalar y bandas Q positivas (36).

En el hombre, el DNA sat de los cromosomas metafásicos se localiza esencialmente en la HC C (cen), en las h y cercano a las NOR. Aun cuando los resultados son confusos, existe gran concordancia en la localización de los DNA sat I-IV de las regiones pericentroméricas de varios cromosomas y región distal de los brazos largos del cromosoma Y (Yq distal). No obstante, por hibridación *in situ* de varias fracciones cromosómicas, el DNA altamente repetitivo no está restringido a cromosomas específicos. Estas parecen localizarse en los cen y telómeros y regiones intersticiales. Esto demuestra que el DNA repetitivo no es exclusivo de las regiones de HC C (46). El DNA sat B está en las NOR de los acrocéntricos y la localización de los restantes (DNA sat A, C y D) ha sido poco estudiada (36).

El DNA sat I tiene una distribución cromosómica dispersa. El DNA sat II está concentrado en las regiones pericentricas de los cromosomas 1 y 16 (hibridación de período corto). Por exposición a períodos más largos, la HC del cromosoma 9 se observa notablemente. Esto podría interpretarse como un indicador del número relativo de secuencias presentes en la HC C, ya que los cromosomas 1 y 16 poseen más de estas secuencias que el 9 (47). Espero, existe una gran afinidad de estas secuencias por la HC del cromosoma 9 y prácticamente ninguna hibridación con los cromosomas 1 y 16. Además, la HC de los cromosomas acrocéntricos exhiben una cantidad considerable de secuencias satélite. En conclusión, la HC de los cromosomas 1 y 16 contiene muy poco DNA sat y de un sólo tipo de secuencia (48).

Hsu y cols. fraccionaron el genoma humano por cromatografía de elusión térmica y las secuencias repetitivas encontradas se emplearon para hibridación *in situ*; las siguientes conclusiones fueron: a) la HC C se compone de varios tipos de secuencias donde casi toda es centromérica y de un sólo tipo, b) algunos segmentos de HC (cromosoma 9) parecen tener una composición más heterogénea en secuencias que otros (cromosoma 1), c) las fracciones del DNA repetitivo se localizan en los cen, telómeros y regiones

intersticiales, d) las secuencias moderadamente repetitivas se distribuyen en todos los cromosomas, siendo ligeramente mayores en los telómeros y e) las fracciones repetitivas con mayor contenido de GC tienen menor afinidad por los cen (49).

Por hibridación in situ, 7 autosomas con bandas C no parecen tener ninguno de los 4 DNA sat convencionales (cromosomas 2, 3, 4, 6, 8, 11 y 12). Pero existen cromosomas como 1, 9, 13, 14, 15, 20, 21, 22 e Y, que posean grandes cantidades de uno o más tipos de secuencias. Los cromosomas 9 e Y contienen los niveles más elevados, mientras que los restantes contienen cantidades intermedias. Es interesante señalar que el cromosoma 16, a pesar de tener un gran segmento C, solo contiene una pequeña cantidad de DNA sat II. Esto permite suponer que el DNA sat total (6-10%) representa sólo una porción de la HC C total (~20%) en el genoma humano (26,45,50).

Los resultados de hibridación in situ con HC C en diversos laboratorios muestran contradicción. Por ejemplo, Jones y cols. reportaron que el DNA sat III se encuentra principalmente en el cromosoma 9 y, en menor cantidad en los cromosomas 1, 16 y acrocéntricos. Mientras que Noar y cols. además lo reportaron en los cromosomas 7, 8, 10, 11, 17-20 e Y. Por otra parte, los cromosomas 9 y 15 exhiben marca con RNA complementario (cRNA) de 6 de los 8 DNA sat y en el Y se marcan 4 de ellos (40) (Tabla 2).

La localización de los diferentes DNA sat en los cromosomas acrocéntricos se ha establecido por medio de translocaciones familiares, encontrándose en brazos cortos, cen, NOR y satélites citológicos. Cabe señalar que la cantidad de secuencias satélite presenta un amplio rango de variación en los cromosomas de cada individuo. Los satélites citológicos son muy heterogéneos en su contenido de DNA sat. Algunos los poseen, otros no y son independientes del tamaño e intensidad de fluorescencia (51,52).

Noar y cols. (1975) observaron por autorradiografía que la marca del cariotipo humano en la hibridación in situ es dependiente de la temperatura de incubación. Ello demuestra que los resultados para del DNA sat humano no son definitivos (57).

Tabla 2. Localización Cromosómica del DNA Sat Humano por Hibridación *in situ* (36,40).

| DNA sat | Cromosomas Principales | Otros | Referencias |
|---------|--------------------------|--------------------------------|-------------|
| I | Y | | 53 |
| | Y | 1,3,13,14,16,21 | 54 |
| | 9,Y | 14,15,21,22 | 55 |
| II | 1 | 9,16 | 47 |
| | Y | 9 | 53 |
| | 9,Y | 1,15-17,21,22 | 55 |
| III | 9 | 1,16,grupos D y G | 56 |
| | Y | | 53 |
| | 9,15,Y | 13,14,20-22 | 55 |
| | | 1,7-11,13-22,Y | 57 |
| | | 1,3-5,7,9,10, 13-18,20-22,Y | 52 |
| IV | Y | | 53 |
| | 9,15,Y | 13,14,20-22 | 55 |
| A | No localizado | | 58 |
| B | Nucléolo (acrocéntricos) | | 59 |
| C | 9 | grupos D y G | 48 |
| D | 9 | | 60 |

La localización *in situ* de las secuencias moderadamente repetitivas se ha establecido en *D. melanogaster*, *M. agrasti* y erizo de mar, encontrándose en este último en la HC intercalar (11,36). En el hombre, se localiza en las bandas Q positivas. Aun cuando no se han encontrado en la HC intercalar, los cromosomas 13 y 18 poseen grandes bandas G positivas y cantidades interdispersas de DNA repetitivo. Las secuencias palindrómicas se distribuyen por todos los cromosomas. La hibridación *in situ* usando transcritos de repetición intermedia marcados con 125 I, indica que este DNA nuclear de bajo peso molecular se evidencia en las regiones C de los brazos cortos de los acrocéntricos (36).

Evidentemente, la HC C contiene mucho más DNA que DNA sat. Algunas de estas secuencias también se han localizado al utilizar endonucleasas de restricción en el genoma humano y son similares

a algunas fracciones satélite, pero difieren en el sitio de corte de la enzima o en sus densidades de flotación. En conclusión, la HC C consiste de secuencias satélite simples y complejas, así como de otras secuencias tipo satélite (26).

Frommer y cols. emplearon sondas marcadas con Brdu para localizar el DNA sat III humano. La sensibilidad y exactitud de la técnica se comprobó usando como sonda un segmento de 2.5 Kb del cromosoma Y. Este procedimiento es rápido y reproducible con una sensibilidad similar a la de hibridación *in situ*. El marcado se observó en dos regiones C del cromosoma 9, en dos cen y brazos cortos de los acrocéntricos y en el cen y región distal de Yq, así como en el cen de los cromosomas 1, 16, 17 y 20. Estas sondas pueden ser útiles para detectar transcritos y localizar DNA de copia única sobre los cromosomas humanos (61).

Ultimamente, empleando DNA biotinilado de 2 DNA sat, clonas de DNA repetitivo, clonas pHuR 98 y 195 (específicas para los cromosomas 9 y 16, respectivamente) y clonas Y-específicas (pY-3.4A), se ha caracterizado a los cromosomas humanos. Estos fueron simultáneamente teñidos con DA/DAPI para identificar la HC C de los cromosomas 1, 9, 15, 16 e Y. Se observó que la clona pHuR 195 hibrida en la HC de los cromosomas 1 y 16, la clona pHuR 98 en la del cromosoma 9 y la clona pY-3.4A en los cromosomas 9, 15 e Y. La distribución de las 3 clonas corresponde con los diferentes tipos de secuencias de la HC. Más aún, las clonas pHuR 98 y 195 pueden explicar las propiedades fluorescentes sobre la cual se basa la clasificación citogenética de la HC (62).

b. Localización de otras Secuencias Repetitivas.

Las secuencias del DNA sat no son simplemente secuencias repetitivas, sino que cada una contiene una mezcla de secuencias. Algunas de ellas pertenecen a una sola familia, mientras otras son diversas y dan una reacción cruzada. Diferentes DNA sat también tienen secuencias similares y reacción cruzada (26).

El estudio de las secuencias repetitivas ha permitido determinar su gran complejidad (26). Cooke (63) y Schmidtke y Schmid (64) con HaemIII aislaron dos secuencias diferentes y

específicas del cromosoma Y. Ambas comprenden ~70% de la región C. Una es un fragmento de 3.4 Kb y se localiza en toda la HC C y la otra es de 2.1 Kb que se ubica en la parte terminal de la región C. McKay y cols. encontraron que: a) en la fracción de 3.4 Kb (Fr Y 1), la cantidad es proporcional a la longitud del segmento fluorescente de Yq, b) la cantidad de la secuencia varía sin cambios en la misma, c) el DNA femenino contiene secuencias de tamaño variable y similares a las del cromosoma Y y d) el fragmento de 2.1 Kb (Fr Y 2), puede ser independiente de la secuencia anterior, aún en el cromosoma Y de tamaño normal (65).

Bostock y cols. identificaron otra secuencia específica del cromosoma Y en la fracción satélite III y digerida con HaeIII. Los resultados sugieren que el fragmento de 3.5 Kb, incluido en la HC C, comprende cerca de 15% del DNA del cromosoma Y. Se localiza en la banda q12 y en la porción no fluorescente adyacente a ella. Espero, existe un incremento desproporcional y menor de este fragmento en individuos con Y largos (66).

Cantù y cols. (1989) analizaron por hibridación *in situ* secuencias repetitivas derivadas del cromosoma Y (sondas DY21 y DY22). La autorradiografía en metafases con bandas G mostró que ambas sondas hibridan en Yq. Con álcali, el marcado con DY22 se redujo bastante (58-82%). Estos hallazgos demuestran que la HC C de Yq contiene, por lo menos, dos fracciones repetitivas con diferentes sensibilidades al álcali y que DY22 mapea en Yq distal y puede ser no heterocromático (67). Una localización muy particular de fragmentos clonados de DNA alfoide (pHS05) a partir de Pat I, muestra una hibridación pericentromérica en todos los cromosomas. Diferencias significativas intercromosómicas entre individuos se detectan con respecto al número de copias. La mayor parte del marcado (~27%) se observa sobre la región pericentromérica del cromosoma 3 (68).

El análisis del DNA humano con endonucleasas de restricción ha revelado varias familias de DNA repetitivo. Una de ellas (DNA sat cc) comprende fragmentos repetitivos en tandem de 340 o 680 pb. Las sondas de un fragmento a clonado de 340 pb (EcoRI) y de uno de 2 Kb (BamHI) de la región pericéntrica del cromosoma X muestran, en algunos cromosomas (3, 4, 21, X e Y), que este DNA

sat α se organiza en un número limitado de dominios. Además, subtipos de éste sobre cromosomas individuales difieren entre sí con respecto al sitio de corte y grado de secuencias relacionadas, organizándose específicamente en el cen de cada cromosoma (69). Asimismo, Delattre y cols. al aislar una secuencia satélite específica de 635 pb, hallaron que consiste de 3.7 monómeros de DNA sat α de 170-171 pb cada uno e hibrida en 3cen de una región de 2,750 pb en tandem (HindIII y TaqI). Esta secuencia ha divergido y sufrido una amplificación después de la especiación humana. La amplificación permite un fácil monitoreo al hibridar la región 3cen con una sonda no radiactiva (70).

Greig y cols. caracterizaron un miembro de la familia del DNA sat α . La sonda es específica para células somáticas híbridas y permite la detección de dominios en núcleos interfásicos. La hibridación *in situ* indica que esta clase de DNA sat α (D16Z2) es exclusiva del cromosoma 16 y está organizado en una serie de dímeros (340 pb) en tandem de 1.7 Kb de unidades repetitivas. El D16Z2 total comprende -1,400-2,000 Kb del DNA centromérico y sus secuencias son altamente variables (71).

La hibridación del DNA humano con tres monómeros de 68 pb de la familia Sau3A, indica la coexistencia con un bloque Sau3A de unidades divergentes de secuencias no relacionadas. El análisis de estos fragmentos (con una longitud total de 1900 pb), muestra la presencia de "clusters" Sau3A con diferentes grados de divergencia y dos regiones de -100 y 291 pb, no relacionadas a la familia. Una secuencia constante deriva de los 24 monómeros Sau3A identificados entre las regiones altamente variables y dos variantes de 8 y 10 pb, respectivamente. El fragmento de 291 pb no relacionado a Sau3A, utilizado como sonda y digerido con una batería de enzimas de restricción, define una "nueva" familia de DNA repetitivo. Esta, tiene periodicidad con HaeIII (familia HaeIII) y una estrecha relación en sus secuencias con Sau3A (72).

Algunos acrocéntricos con brazos cortos grandes (Dp+), contienen secuencias Y-específicas que probablemente son producto de translocaciones. La relación de éstas con el DNA sat es incierta, pero tal vez pueden encontrarse en los DNA sat I, III y IV. Se ha encontrado otra secuencia (HS3) derivada del DNA sat

III (EcoRI) y clonada en XgtWES. Estudios de hibridación *in situ* usando cDNA, revelan que se localiza en la región lqh. El marcado en otros cromosomas (9, 15 y 16), es aún desproporcional a la cantidad de DNA sat e inconstante en diferentes sujetos (26).

Reportes de otras secuencias particulares han mostrado también cierta homología con las secuencias satélite. Por ejemplo, se ha demostrado que existe una estrecha relación entre la hibridación y el tamaño del segmento lqh. Las secuencias, aisladas de DNA masculino y HS1, son específicas del Y y del 1, respectivamente. Otra secuencia de 340 pb de la fracción satélite (EcoRI), se localiza en la HC C de los cromosomas que no tienen DNAs sat convencionales. Dos fragmentos adicionales (EcoRI) de 176 y 352 pb, muestran una densidad de flotación similar al DNA sat IV, pero difieren entre ellos. Una secuencia más de 2 Kb de DNA humano digerida con BamHI (clonado en pBR322) se localiza en el cen del cromosoma X (26,45).

Otras secuencias repetitivas que han despertado mucha polémica en la última década son las secuencias Bkm. Fueron identificadas inicialmente en las serpientes (*Bungarus fasciatus*) como un DNA sat menor. Estas, junto con el DNA sat IV, se identifican en el cromosoma W. Posteriormente, algunos hallazgos revelaron que las secuencias Bkm están en ambos sexos. En aves, aunque el cromosoma W contiene la familia Bkm, su contribución parece ser menor. En mamíferos, las secuencias Bkm al parecer se localizan en la región eucromática del cromosoma Y y pudieran ser indispensables para la determinación del sexo (73).

c. Localización de las NOR.

Las NOR son los sitios morfológicos de los nucléolos que se forman al final de la división celular. Fueron identificadas como h no teñidas de los cromosomas acrocéntricos a partir de su asociación en metafase (rosetas) (74). Comprenden copias múltiples de los genes ribosómicos mayores y se han encontrado en plantas y animales. Así por ejemplo, las NOR de 506 especies diferentes fueron identificadas de un total de 717 cromosomas a partir de 34 familias de entre monocotiledóneas, dicotiledóneas y organismos que van desde las algas hasta el hombre. En 86%, la h

se encontró en los brazos cortos y la localización de estos genes en relación al cinetocoro y a los telómeros es la misma, independientemente de la escala filogenética eucarionte (75).

La hibridación *in situ* se ha empleado también para localizar los genes ribosómicos que codifican para los rRNA 5S, 18S y 28S en *D. melanogaster* y *Xenopus laevis* (74). Se encontró que los genes para los rRNA 5S de *D. melanogaster* son "clusters" en una sola banda del brazo derecho del cromosoma 2. En contraste, los rDNA 5S de *X. laevis* se localizaron en las regiones teloméricas de los brazos largos de casi todos los cromosomas. Su localización es diferente a la de las NOR, pero en una línea cultivada, la hibridación es detectada cercana a éstas (76).

Los eucariontes muestran una estrecha homología en la distribución de los cistrones 18S y 28S, mientras que los genes para el rDNA 5S se distribuyen en diversos sitios del genoma. El número y la posición de las NOR varía entre especies y la clasificación de los cariotipos depende de su patrón de distribución. *Corollia perspicillata* tiene una sola NOR en el cromosoma X, mientras que en *M. agrestis* se distribuye en varios autosomas. Aunque las h en general son sitios NOR, otras NOR no comunes son terminales (*Cricetulus griseus* y *Corollia castanea*) o centroméricas (*M. musculus* y *M. agrestis*) (74).

Los cistrones ribosómicos en el humano (de 50-300) se han localizado por hibridación *in situ* con un promedio de 213 por genoma haploide. Los genes que codifican para los ribosómicos mayores también se hallan en las NOR. Así, los genes que codifican para los rRNA 18S y 28S fueron asignados a los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos (grupos D y G) (36,74). Además, se conoce que en las NOR las secuencias de rDNA están espaciadas por HC (36). Los genes rDNA 5S, que constan de -2,000 copias por genoma haploide, están amplia pero no exclusivamente localizados en tandem en el extremo distal de los brazos largos del cromosoma 1 (banda 1q43). En interfase, están frecuentemente asociados al nucléolo (36,44). Al hibridar estas secuencias con H³-cRNA en una columna de hidroxapatita, se observa una unión preferencial con la HC de los cromosomas 1, 2, 3, 9 y 16 (44).

D. ASPECTOS EVOLUTIVOS Y FUNCIONALES DEL DNA REPETITIVO (DNA SAT) Y LA HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA.

El problema de establecer como dos especies pueden estar relacionadas filogenéticamente es todavía discutido. Espero, las diferencias existentes entre el genoma de uno y otro organismo, es posible entenderlas si conocemos a fondo la organización y función de cada una de las diversas secuencias implicadas en la especiación. El significado del DNA altamente repetitivo es oscuro y su función aún es desconocida. No obstante, nuevas perspectivas son propuestas para descubrir la naturaleza intrínseca de los genomas eucariontes. Una manera de abordar este problema es comparar por análisis Cot el DNA de especies relacionadas. Así, se observa como las secuencias han cambiado, el DNA se ha diversificado o se ha mantenido en cantidades similares y las proporciones de las secuencias repetitivas y no repetitivas se han alterado durante la evolución.

1. Homología de Secuencias.

a. Análisis en Primates.

En la actualidad, algunas aseveraciones se han hecho acerca de los orígenes del DNA sat humano, el curso de la evolución de los primates y la naturaleza misma de la HC C. La evolución del DNA sat humano es atribuible en gran parte a las diferencias que existen con los genomas de primates.

Gunnerson encontró en las superfamilias de primates Cercopithecoidea y Anthropoidea que la mayoría de los cambios han ocurrido en la composición de las secuencias repetitivas (77). En la primera, el baboon o gran simio de Africa y Asia (*Papio papio*) (PPA) y el mono verde de Africa (*Cercopithecus aethiops*) (CAE) tienen -50% más DNA repetitivo que el mono rhesus o pardo de la India (*Macaca mulatta*) (MOU). Estas diferencias probablemente ocurrieron hace 15 millones de años (m.a.) por adición de nuevas secuencias, ya que el DNA es poco divergente. Primates superiores, como el gibbon (*Hyllobates lar*) (HLA), el chimpancé (*Pan troglodytes*) (PTR) y el hombre (*Homo sapiens*) (HSA), han presentado menos modificaciones en su genoma (50,78). El mono

verde tiene un DNA sat (1.699 gr/ml) que comprende ~20% del genoma. Además, posee otros dos DNA sat que varían en cantidades considerables (1.711 y 1.718 g/ml) y representan ~11% del DNA total. El baboon tiene dos DNA sat (1.700 y 1.714 g/ml) que constituyen ~5-10% del genoma. Estos se localizan en la HC centromérica de la mayoría de los cromosomas (50).

El DNA de reasociación lenta (Cot 1 a 100) contiene familias de secuencias de 10-1000 miembros. Los Hominidae tienen la tercera parte de sus secuencias repetitivas en este rango, mientras que los Cercopithecoidea tienen más de 1000 copias. Los Lorisidae, como *Loris lorix* (LLO), también tienen familias de secuencias y unas cuantas reasocian con Cot 1 y 10 (50).

Ciertas secuencias altamente repetitivas de primates están muy conservadas y se alteran más rápidamente en la evolución que las de copia única, tal vez por tener menos funciones dependientes de secuencia y tolerar cambios. Empero, una fracción (30%) del DNA repetitivo humano que reasocia con la del gibbon, se comporta como un DNA no repetitivo, por lo que ha cambiado a una tasa similar a la del DNA humano (77). Las secuencias de diferentes especies si son similares forman heteroduplex con una estabilidad térmica semejante a la de las homoduplex. En primates, estas últimas revelan una sorprendente cantidad de DNA repetitivo conservada en forma no divergente durante un gran periodo de la evolución. En el mono *rhesus* (5.65% de DNA repetitivo), una proporción no divergente exhibe, en el heteroduplex con el DNA de baboon y de humano, la misma estabilidad que el homoduplex. Esta fracción decrece con respecto a la distancia filogenética. Así, 80% de la fracción es común entre *rhesus* y baboon y sólo 50% entre *rhesus* y el hombre (50).

También, la conservación de las secuencias moderadamente repetitivas (rDNA) es bien conocida. Por ejemplo, los genes rDNA de insectos forman heteroduplex con los de anfibios y estos con los del hombre. La calidad de los heteroduplex formados usando rRNA, muestra una reducción gradual que va desde las bacterias hasta organismos superiores y un incremento en el ratio GC/AU desde los hongos hasta las fanerógamas (50).

La relación entre la estabilidad térmica del DNA y la existencia de un mal apareamiento ha sido ampliamente estudiada. En primates, existe divergencia del rDNA 28S en algunas especies (Tabla 3). Esto fue demostrado, al comparar los tiempos de reasociación (Tr), al hibridar los rDNA 28S de diferentes especies. Hubo un incremento proporcional de los Tr con respecto a la distancia filogenética. La reducción en la estabilidad de los heteroduplex refleja claramente la divergencia de las especies, semejante a la determinada paleontológicamente. Cuando se ajustan a los años de la divergencia evolutiva, se establece un valor casi constante, lo que sugieren que los cistrones 28S de los primates divergen con la misma tasa esperada. Así, la divergencia de los cistrones rDNA permite calcular la tasa evolutiva entre los grupos (50).

Tabla 3. Evolución de los rDNA 28S en Primates (50).

| Especies Comparadas | Tr (°c) | Diferencia de Tr (°c) | % Divergencia | Divergencia (m.a.) | % Divergencia (m.a.) |
|---------------------|---------|-----------------------|---------------|--------------------|----------------------|
| HSA-HSA | 85.5 | 0.0 | 0.00 | 0 | 0.000 |
| HSA-PTR | 83.5 | 2.0 | 1.33 | 30 | 0.044 |
| HSA-PPA | 82.0 | 3.5 | 2.33 | 60 | 0.039 |
| HSA-ASP* | 80.0 | 5.5 | 3.66 | 90 | 0.040 |

* Mono araña o arbustero de América (*Ateles species*).

b. Homología entre los Primates.

La presencia de varios tipos de DNA sat en el genoma humano hace suponer una relación con los de los primates superiores. Esto también se corrobora con la técnica de hibridación cruzada empleando cRNA sat humano. Los cambios del DNA sat con respecto a la tasa del DNA no repetitivo, han sido estimados en el ratón, originándose hace -4 m.a. Los valores estimados de la edad del DNA sat son diversos y están dados por un factor de tres, asumiendo que la mayoría de los cambios en las secuencias únicas corresponden a la tercera base de los codones codificantes (79).

Usando un factor de mal apareamiento ($1.6^{\circ}\text{c} = 1\%$) es posible obtener grandes diferencias en la divergencia de 3 de los 4 DNAs sat humanos convencionales. Esto indica que su orden de aparición (edad progresiva) es DNA sat II, I y III. Asignando un valor para la tasa de sustitución de las bases en el DNA sat, es posible estimar las edades absolutas representadas por estas divergencias. Empero, sólo se han estimado los valores derivados de las divergencias del DNA de copia única durante la evolución de los primates (79) (Tabla 4). Kohne obtuvo estos datos usando un factor de mal apareamiento de $1^{\circ}\text{c} = 1.5\%$, los cuales se modificaron después al utilizar un factor de $1.6^{\circ}\text{c} = 1\%$ (80).

Tabla 4. Análisis Comparativo de la Divergencia del DNA Sat en los Primates (79).

| DNA Comparado | % de Cambios (Divergencia) | Tiempo Total de Divergencia (m.a.) | % Divergencia del DNA Sat Hum. |
|---------------|----------------------------|------------------------------------|--------------------------------|
| HSA-PTR | 1.00 | 30 | |
| HSA-HLA | 2.48 | 60 | 1.2 (II) |
| HSA-CAE | 4.10 | 90 | 3.7 (I) |
| HSA-MNU | 4.00 | 90 | |
| HSA-CCA | 6.96 | 130 | 6.2 (III) |
| HSA-Gálago | 21.60 | 160 | |

La divergencia del DNA sat III de Cebus capusinus (CCA) ha sido similar que la del hombre, con un tiempo de divergencia paleontológicamente estimado de 130 m.a., por lo que el valor máximo para la edad del DNA sat III humano es de 100 m.a. Empero, suponiendo que la tasa actual de divergencia de una secuencia satélite es 3-4 veces más rápida, se esperaría una edad de 25-30 m.a. para este satélite (Oligoceno). Cálculos similares estiman una edad de 20-25 m.a. para el DNA sat I (Mioceno Temprano) y de 9-12 m.a. para el DNA sat II (Plioceno). De acuerdo a esto, el chimpancé y el hombre divergieron hace 4-30 m.a. (79).

Los métodos de secuenciación de aminoácidos, han supuesto edades más recientes. Es interesante referir que si el DNA de copia única del hombre y chimpancé divergen en sólo 1% , el DNA

sat III debió originarse antes de la divergencia entre ellos. Lo que sugiere que el DNA sat de primates no es especie-específico. Algunas comparaciones muestran que existe una distribución más amplia de esta secuencia en el chimpancé que en el hombre. Además, el chimpancé contiene otro DNA sat en una proporción mayor que la de DNA sat III humano, pero con propiedades similares. En el DNA de hepatocitos de chimpancé, en un gradiente de densidad de CsCl, pueden observarse dos picos satélites, llamados A y B. El componente A es similar al DNA sat III humano, difiriendo por sólo un grado, lo que apoya fuertemente un ancestro común entre el hombre y el chimpancé (79) (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis Comparativo entre el DNA Sat III Humano y el DNA Sat A de Chimpancé (79).

| Propiedades | DNA Sat III | DNA Sat A |
|-----------------|-------------|------------|
| Nativo | 1.696 g/ml | 1.696 g/ml |
| Desnaturalizado | 1.713 " | 1.715 " |
| Renaturalizado | 1.706 " | 1.703 " |
| Tr (0.1 SSC) | 69°C | 69°C |
| Temperatura Tr | 9°C | 10°C |

A pesar de que existe una relación más estrecha entre chimpancé y gorila que entre chimpancé y hombre, algunos trabajos revelan lo contrario. Por hibridación cruzada del cRNA^o del DNA sat III humano sobre cromosomas de primates, se observó que éste reacciona con las regiones de bandas C del chimpancé, gorila (*Gorilla gorilla*) (GGO) y orangután (*Pongo pygmaeus*) (PFM) (78) y correlaciona con las regiones G-11 positivas. En las dos últimas especies, muestra una reacción cruzada preferencial sobre los cromosomas acrocéntricos, mientras que en el chimpancé, sobre los metacéntricos. Por otra parte, los cromosomas de gibbon no parecen mostrar homología con el resto del grupo (50,79).

Los resultados de hibridación en filtro muestran que aún existe 22-28% de homología entre las secuencias satélite del hombre y chimpancé. Las reacciones homoduplex y heteroduplex no difieren mucho. Los heteroduplex del DNA sat III humano/chimpancé

y orangután decrecen en su estabilidad térmica en relación a la distancia evolutiva. No obstante, la combinación cRNA humano/DNA chimpancé es menos estable que la fracción homoduplex humana. Esto indica que las secuencias no son idénticas. Los heteroduplex entre el cRNA del DNA sat III y los DNA de primates inferiores (baboon) no difieren de los del DNA de ratón o bacteria. Esto significa que las secuencias no están presentes en grandes cantidades en especies más lejanas que el orangután (50,79).

Por la existencia del DNA sat I y II humano en chimpancé, se asume la posibilidad de que estas secuencias aparecieran a partir de una secuencia común, vía similar a la del DNA sat III. Tal vez se originaron por un mecanismo fortuito, en el cual los DNA sat surgieron por ciclos de selección, amplificación y divergencia de secuencias satélite preexistentes. De acuerdo a la edad del DNA sat III y A, los Cercopithecidae divergieron de la misma rama que guía a los Homínidae y Pongidae durante el Eoceno (36 ± 2 m.a.). No es común que los satélite III y A estén presentes en miembros del grupo de los simios del nuevo mundo (Cercopithecidae y Cebidae), si los datos estimados son correctos (50,79).

El DNA sat I reacciona ligeramente con núcleos interfásicos de chimpancé, pero localizaciones cromosómicas no han sido aún observadas, incluyendo al cromosoma Y. El DNA sat B de chimpancé (1.683 g/ml) representa teóricamente el DNA sat I, aunque su cRNA no hibrida en sitios definidos del cariotipo humano. Tampoco hay una hibridación del cRNA del DNA sat II sobre los cromosomas de chimpancé o de otros primates, pero a bajas temperaturas, si la hay. Por lo que descarta la posibilidad de una secuencia satélite del chimpancé semejante al DNA sat II del hombre. El cRNA del DNA sat IV humano no hibrida sobre los cromosomas de chimpancé, lo cual parece ser específico del hombre y de un origen más tardío. También, el DNA repetitivo cortado con HaeIII y asociado al cromosoma Y, no es visible en el del chimpancé. Es intrigante que el Y del gorila muestre una HC C similar a la del Y humano y es posible, por tanto, que todos los DNA sat de los primates superiores sean secuencias relacionadas y originadas por separado a partir de mecanismos saltatorios. Además, los componentes tipo satélite, aislados del DNA moderadamente repetitivo, hibridan en los cromosomas humanos y regiones de HC C del chimpancé (50).

Por cinética de reasociación se sabe que los DNA sat I, II y III representan ~1.54% y el DNA sat IV ~2%, lo que hace un total de 3.54% de secuencias altamente repetitivas adquiridas en un período de 30-40 m.a. en el genoma humano. Las tasas de adición de DNA no divergente a los genomas de primates expresan valores similares. Kohne empleó estos datos para calcular la tasa promedio de evolución en primates y es en el genoma humano de 0.07-0.09%/m.a. a partir de la aparición de los Anthropoidea (80). Gummerson obtuvo resultados similares al usar cromatografía térmica, con una tasa promedio de 0.075-0.15%/m.a. (77). La coincidencia entre los valores calculados y los estimados, con respecto a la tasa de adición del DNA sat en un período similar, sugiere que estos bloques son adicionados por un mecanismo que reside en la EC centromérica (50,79,80) (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis Comparativo sobre la Tasa de Adición de DNA a los Genomas de Primates (50).

| Especies Comparadas | % Secuencias No Divergentes (m.a.) | Tiempo de Divergencia (m.a.) | % Adición de Secuencias/m.a. | % Adición de DNA Repetitivo/m.a. |
|---------------------|------------------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------------------|
| HSA-PTR | 2.25 | 15-30 | 0.075-0.15 | 0.07-0.09 |
| HSA-HLA | 2.35 | 30 | 0.078 | 0.07 |
| HSA-CAE | 4.60 | 34 | 0.102 | 0.09 |
| HSA-PPA | 3.75 | 45 | 0.084 | 0.09 |
| HSA-MNU | 5.17 | 45 | 0.115 | 0.09 |
| HSA-LLO | 7.18 | 75 | 0.104 | 0.28 |

Los cariotipos de más de 60 especies diferentes de primates fueron comparados por Dutrillaux, al emplear las principales técnicas de bandeo. Los resultados revelaron una estrecha homología en el bandeo cromosómico entre los simios y el hombre. Es común que la EC sea idéntica en todas las especies. Cerca de 70% de las bandas son similares entre simios y lemúridos (prosimios). En el resto, dificultades técnicas impidieron una buena valoración sin poder excluir una completa analogía (81).

Aproximadamente, 150 rearrreglos fueron identificados y

relacionados con los cromosomas humanos. Estos varían de un grupo a otro; así por ejemplo, las translocaciones robertsonianas son preponderantes entre los Lemuridae, pero no entre los Pongidae. Las Fisiones céntricas son frecuentes entre los Cercopithecoidea, pero no en otros grupos y las inversiones pericéntricas (IP) en la evolución de los Pongidae y el hombre (81).

Todas las variaciones cuantitativas y cualitativas del cariotipo siempre implicaron la HC C. Si la HC pericentromérica es excluida, su cantidad varía menos de 18 (en PPA y MMU, donde está limitada a los cromosomas equivalentes de HSA 15 y 22) hasta más de 108 en CCA o más de 208 en Lemur coronatus (LCO). Tal variación puede presentarse en los homólogos y encontrarse en diferentes individuos de la misma población. También, puede caracterizar diferentes subespecies como Haplorhina griseus occidentalis (HGO) y H. griseus griseus (HGG), especies como C. aethiops y C. sabaeus (CSA) y géneros como GGO y PTR versus PPM y HSA. Su apreciación citológica parece ser tan variable que puede teñir positiva o negativamente por casi todas las técnicas de bandeado (C, Q, R y T). El único parámetro estable para estas regiones C es su replicación tardía (81).

Existen algunos sitios cromosómicos conservados en distintas especies que han sido afectados al mismo tiempo. Estos han perdurado por varios m.a. y se han detectado en grupos que están alejados filogenéticamente. Por ejemplo, existe una distribución similar de la HC C en Erythrocebus patas (EPA) y en CCA, pero la potencialidad de la HC presente no es constante. En CCA, se observa una fuerte tinción centromérica, pero no en la de HSA 12, Pongidae y Cercopithecoidea, o está completamente ausente como en C. nigrivittatus (CNI). En Cercopithecus torquatus (CTL) y C. galeritus (CGA), se evidencia también la HC en este sitio, pero con propiedades de tinción diferentes. Así, la HC C puede tener la misma localización cromosómica en especies muy alejadas evolutivamente y estar ausente en otras o, por lo menos, no ser evidenciada por la misma técnica (81).

La localización de los rDNA (NOR) también fue realizada en este estudio. Los Lemuridae no se incluyeron en el análisis comparativo, ya que sus NOR se localizan en los microcromosomas,

y es imposible proponer alguna analogía con los simios. En todas las especies, las NOR no tiñen con Giemsa. Varían en número, desde uno (géneros *Papio*, *Macaca*, *Cercocebus*, *Ateles*) hasta 8 pares (orangután), e intensidad de tinción. Exhiben una clara tendencia a ubicarse en las regiones h, pero con ciertas excepciones (*Aotus trivirgatus*) (ATR). La mayoría de las NOR se localizan en cromosomas acrocéntricos, en brazos cortos o largos. En el cromosoma HSA 22 y sus equivalentes en Primates es donde se encuentran con mayor frecuencia (81) (Tabla 7).

Tabla 7. Localización de las NOR en Primates (81).

| Cromosoma Equivalente al del Hombre | HSA | PTR | GGO | PPY | MDU PPA CGA CYN* | CAE CMI* EPA NTA* | CCA CMI |
|--|-----|-----|-----|-----|---------------------------|----------------------------|------------|
| 1 | | | + | | | | |
| 2 | | | | 2q+ | | | |
| 9 | | | | + | | | |
| 13 | + | + | | + | | | |
| 14 | + | + | | + | | | |
| 15 | + | | | + | + | | |
| 18 | | + | | + | | | |
| 21 | + | + | + | + | | | |
| 22 | + | + | + | + | + | + | + |

- * CYN = *Cynopithecus niger*.
- * CMI = *Cercopithecus mitis*.
- * NTA = *Nyopithecus talapoin*.

Existe una estrecha relación, primero, entre bandas G-11 y la presencia de los DNA sat I, II, III y IV y, segundo, entre estas localizaciones sobre los cromosomas humanos y sus equivalentes en los Pongidae (Tabla 8). Estas correspondencias son tanto cuantitativas como cualitativas. El área de tinción más evidente con G-11 se localiza en el cromosoma HSA 9 y sus equivalentes en los Pongidae, siendo los principales sitios para relacionar los DNA sat de todas las especies emparentadas. Una excepción es el equivalente del DNA sat II humano, el cual no

está presente en el chimpancé. Otras diferencias conciernen a los acrocéntricos en ciertas especies y a los submetacéntricos en otras. Así, los equivalentes al HSA 2 y 18 corresponden a acrocéntricos en el orangután (2p, 2q y 18). Estos poseen bandas G-11 y DNA sat, pero no los correspondientes humanos (81).

Tabla 8. Localización de las Bandas G-11 (*) y de los DNA Sat I, II, III y IV Humanos en Primates (81).

| Cromosoma | HSA | PTR | GGO | PPY |
|-----------|-----------------|--------------|-------------------|-------------------|
| 1 | I, II, III, IV* | III * | III * | |
| 2 | | 2p * | 2pI, II, III, IV* | 2pI, II, III, IV* |
| 3 | | 2qI, III, IV | | 2qI, II, III, IV* |
| 4 | | | | |
| 5 | I, III, IV * | | I, III | |
| 6 | | | | |
| 7 | I, IV * | I, III, IV* | | * |
| 8 | | | | |
| 9 | I, II, III, IV* | I, III, IV* | I, II, III, IV* | * |
| 10 | IV * | * | * | II * |
| 11 | | | | I |
| 12 | I | | | IV |
| 13 | I, III, IV * | I, III, IV* | I, II, III, IV* | II, III, IV * |
| 14 | I, II, III, IV* | I, III, IV* | I, II, III, IV* | I, II, III * |
| 15 | I, II, III, IV* | I, III, IV* | I, II, III, IV* | I, II, III, IV* |
| 16 | II | I, III, IV* | I, II, III, IV* | |
| 17 | II, IV * | I, III, IV* | | * |
| 18 | | I, III * | I, II, III, IV* | I, II, III * |
| 19 | IV | | | |
| 20 | I, III, IV * | I, III, IV* | | |
| 21 | I, II, III, IV* | I, III, IV* | | I, II * |
| 22 | I, II, III, IV* | I, III, IV* | I, II, III, IV* | I, II * |
| X | II | | | |
| Y | I, II, III, IV* | I, III, IV* | I, II, III, IV | I, II, III, IV |

Por lo tanto, se concluye que han ocurrido pérdidas o rearrreglos del segmento heterocromático o, al menos, un cambio en sus propiedades bioquímicas y moleculares durante la evolución.

Las regiones positivas con bandas G-11 presentan una clara evidencia de conservación, ya que la composición de su DNA sat ha sufrido pocos cambios en más de 20 m.a. Sin embargo, cuando se consideran familias más alejadas filogenéticamente (Hylobatydae o Cercopithecidae), existen divergencias significativas reveladas por la ausencia de bandas G-11 en ellas (81).

Los cariotipos del hombre y Pongidae difieren por un número pequeño de rearrreglos cromosómicos y los puntos de ruptura no se distribuyen al azar (inversiones y fusiones). Al descender en la escala filogenética, es posible señalar los rearrreglos que ocurrieron en cada *phylum* y quizá encontrar alguno que guíe al origen del hombre. La filogenia es compatible con el proceso evolutivo, especialmente, en la adición o pérdida de HC (79,82).

Se estudiaron cromosomas mitóticos, núcleos interfásicos y meiosis masculina de 41 especies de los 5 grupos de vertebrados. La técnica de tinción Distanicina A/Mitramicina (DA/M) exhibe los patrones de bandas R. Esta tinción reveló las regiones GC de la HC C en todos las especies. En la mayoría, la HC C tiene propiedades de tinción opuestas con mitramicina y quinacrina. La mitramicina, marca intensamente las NOR en los cariotipos de peces, anfibios, reptiles y aves, pero no en los de mamíferos. La falta de tinción en las NOR de mamíferos es atribuida a un mayor número de secuencias de rDNA en sus genomas. Estudios en varios estados meióticos de los vertebrados de sangre fría (peces, anfibios y reptiles) muestran que la presencia de DA/M en las NOR es independiente de su estado de actividad (83).

Las translocaciones de DNA sat a otras regiones de HC en cromosomas no homólogos, parecen no ocurrir al azar. Esto es apoyado por la presencia de un DNA sat particular en regiones específicas de un solo cromosoma sexual. Así, se ha facilitado el entendimiento de la evolución de los sexocromosomas en base al DNA repetitivo, principalmente en el hombre (50).

c. Asociación con los Cromosomas Sexuales.

Estudios realizados en serpientes y aves, han establecido una asociación entre DNA repetitivo y cromosomas sexuales. Por

otro lado, los sexocromosomas de mamíferos se caracterizan por la conservación de los patrones de bandeado cromosómico, en relación con ciertos grupos de vertebrados (50).

Las serpientes primitivas (Boidae), como las pitones y constrictor conservan aún los sexocromosomas homomórficos. En algunas especies (Colubridae), el par sexual femenino (homomórfico) puede ser diferenciado, ya que el cromosoma W está compuesto totalmente de HC C y es alocíclico, aunque morfológicamente es indistinguible del Z. Esto hace suponer que existe un paso transitorio en la evolución hacia el par heteromórfico, propio de las serpientes más avanzadas (Elapidae, Viperidae e Hydrophiidae) y donde el W es más pequeño (28).

El análisis de los DNA sat en algunas serpientes muestra que los sexocromosomas femeninos heteromórficos exhiben grandes cambios, pero los DNA sat masculinos están en menor proporción o ausentes. Por ejemplo, *Elaphe radiata* (Colubridae), presenta un DNA sat tipo III conspicuo en el femenino y se haya fragmentado en dos partes, uno de los cuales es tipo IV. Ambos hibridan con el W, empero este último parece estar ausente en el masculino. Otro DNA sat semejante al IV (Bkm) se encuentra en una especie no relacionada (*B. fasciatus*). Junto con el DNA sat IV, es posible identificar el cromosoma W y determinar el grado de conservación de la secuencia de muchas especies del suborden Ophidia. La cantidad relativa de las Bkm permite asumir que los DNA sat están interdispersos con otras secuencias en el cromosoma W y presentes en ambos sexos de otras serpientes en cantidades elevadas (28).

La hibridación con cRNA del DNA sat W de serpientes sobre el DNA de aves muestra doble saturación con el DNA femenino, comparado con el del masculino. La presencia de la familia Bkm en el DNA de aves se explica por un ancestro común (Archosauria) de reptiles y aves, no hace más de 200 m.a., lo que demuestra la conservación de esta secuencia y de los sexocromosomas (28,50). Además, en varias especies con cromosomas homomórficos la participación de estas secuencias es importante en la evolución del dimorfismo sexual. Cromosomas homomórficos intermedios, sólo muestran hibridación en el W, por lo que la composición del DNA sat de éste precede a la evolución del dimorfismo sexual (50).

Las secuencias Bkm también están presentes en roedores y en el hombre. Cuantitativamente no hay diferencias entre sexos, lo que indica que la contribución del cromosoma Y es pequeña. No obstante, parecen haber grandes diferencias entre sexos al utilizar varias enzimas de restricción (Southern blot). El DNA masculino digerido con HaeIII hibrida preferentemente con la sonda Bkm^o, mientras que el DNA femenino lo hace débilmente. Esta diferencia es evidente al digerir con AluI (28).

Un posible mecanismo que explica estas diferencias es que el DNA sat frecuentemente tiene un patrón de replicación más tardío que el resto del genoma, asociado con supresión e interferencia durante el entrecruzamiento. Este, podría ser influenciado por la proximidad del DNA sat a través de un efecto directo en la síntesis del DNA o por una asincronía de la replicación durante el apareamiento cromosómico. La IP del cromosoma W y, por lo tanto, del DNA sat durante la evolución, guiarían a una completa supresión del entrecruzamiento. Por lo que sería menos común que se intercalaran los DNA sat de tales cromosomas, y otras secuencias repetitivas, durante la meiosis y se conservaran por mucho tiempo. Los homólogos, entonces, se mantendrían separados y llegarían a ser heteromórficos (50).

2. Origen, Evolución y Funciones Especulativas.

La presencia de unidades repetitivas en tandem en el genoma eucarionte plantea varias interrogantes, tales como el porqué de la existencia de tantas secuencias para realizar una función determinada. La información acerca del DNA sat y de la HC C, en cuanto al origen, evolución y funciones, es escasa.

a. Mecanismos de Aparición.

No cabe duda que las secuencias altamente repetitivas en cada una de las especies han conferido ventajas selectivas. Su gran diversidad implica que han evolucionado rápidamente (84). Es difícil interpretar cómo la selección natural ha influido sobre los miembros individuales de este tipo de secuencias. Es probable que ésta actúe una vez que se hayan acumulado mutaciones, pero antes de que su cantidad sea insuficiente para realizar su

aparente función. La naturaleza repetitiva del DNA sat pudo haber surgido por mecanismos que amplificaron el número de copias a partir de secuencias cortas ancestrales, algunas veces con la adquisición de periodos más largos. Dos tipos de procesos se han propuesto para explicar esta amplificación: la replicación saltatoria y la recombinación desigual (1).

El concepto de la replicación saltatoria fue introducido inicialmente por Britten y Kohne para explicar cómo una secuencia particular, por un evento repentino de replicación, produce un gran número de copias. La sustitución de bases de la secuencia ancestral (por mutación) no parece haber ocurrido con la misma frecuencia en todas las posiciones (1). Posteriormente, se propuso la existencia de una serie de replications sucesivas y diversificadas a través del tiempo. La presencia de secuencias periódicas, en las que cada una consiste de un número de unidades más pequeñas (variantes), señala que cada evento puede originar una unidad de tamaño mayor (1,26,42).

El modelo asume una secuencia corta ancestral "a" que es replicada súbitamente varias veces hasta producir una unidad repetitiva en tandem. Después, durante algunas generaciones ocurren mutaciones que producen variantes "b", "c", etc., muy relacionadas a la secuencia original. Esta divergencia puede originarse por una simple sustitución, deleción y/o inserción de bases. Luego por otras replications saltatorias se amplifica una de las secuencias, incluyendo más de una variante. Más tarde, por otra replicación saltatoria se amplifica parte de la secuencia con mutaciones acumuladas. El tiempo transcurrido entre una amplificación y otra puede asumirse por el grado de divergencia encontrado entre estas secuencias. Los componentes más cortos, deben corresponder a la secuencia ancestral, siendo además la más común. Variantes generadas, previas a la primera replicación, son posteriormente las más comunes y así sucesivamente. La naturaleza del evento es inespecifica y varios mecanismos son posibles, aunque ninguno ha sido comprobado (1) (Figura 7).

Por otro lado, las variaciones cuantitativas posiblemente ocurren durante la división de las células somáticas (1,12,26). Esto se produce por un entrecruzamiento desigual en el DNA sat

cuando las dos cadenas se desalinean. En el DNA sat de ratón, la frecuencia de entrecruzamiento desigual es cercano a 1 por cada 15 unidades repetitivas de 240 pb (1).

La recombinación desigual provee un mecanismo alternativo para la evolución del DNA sat. El modelo propuesto por Smith asume que un entrecruzamiento desigual ocurre con gran frecuencia entre cromátidas hermanas. Se ha visto que durante el ICH se producen translocaciones de segmentos equivalentes de DNA que están en replicación. Cuando ciertas secuencias se repiten en alguna otra región del cromosoma, es factible que ocurra un desplazamiento en el apareamiento y que los intercambios queden reducidos a las secuencias repetitivas, por ser las únicas regiones homólogas. El resultado final es la aparición de cromosomas desiguales, uno con un segmento repetitivo extra y el otro carente de él. El tamaño de la región depende de la posición del entrecruzamiento y eventualmente consiste de una sola secuencia repetitiva. El cromosoma con mayor número de bases tendrá más posibilidades de un intercambio desigual en la siguiente generación que su homólogo (1,12).

Este proceso, llamado fijación por entrecruzamiento, se caracteriza por el número de generaciones requeridas para la uniformidad. El modelo además predice que secuencias cortas en tandem pueden ocupar cualquier región del DNA que no esté sujeto a una presión de selección. También, cualquier mutante nueva será eliminada o diversificada para ocupar un sitio definido. Eventualmente, su recombinación resulta en duplicaciones, donde la secuencia predominante ocupará un sitio en la población, o en deleciones, que reducen el tamaño del orden y paulatinamente llegan a eliminarse por selección natural (1) (Figura 8).

Esto demostraría que el DNA sat consta de unidades repetitivas uniformes sin una tendencia de la selección por secuencias particulares. Tal vez un balance entre la divergencia por mutación y la uniformidad por fijación del entrecruzamiento determina la velocidad relativa de los dos procesos. Empero, cuantitativamente es difícil determinar si este modelo se acopla a la evolución del DNA sat. No obstante, cualitativamente, parece que si ocurrieran mutaciones y entrecruzamientos desiguales con

relativa frecuencia, podrían generarse primero y luego mantenerse ordenados en tandem. En algunos DNA sat de mamíferos, al parecer existe una relación entre la longitud repetitiva de los fragmentos y la longitud del DNA presente en el nucleosoma (1).

Este modelo se apoya en un gran número de estudios de plantas e invertebrados, donde las variaciones cuantitativas son significativas. La recombinación meiótica como mecanismo de origen es excluida, ya que las regiones de HC usualmente permanecen dispersas sin formación de quiasmas. Por otra parte, los eventos somáticos resultantes en la "disminución cromatínica" en varios invertebrados, megacromosomas de híbridos del tabaco y en mamíferos (*in vitro*), proporcionan evidencias plausibles. Es más, sitios de reconocimiento por endonucleasas de restricción podrían mediar un entrecruzamiento desigual que origine variaciones cuantitativas. Otros posibles mecanismos se explican por la existencia de secuencias palindrómicas, puesto que en condiciones naturales es posible incrementar con agentes alcalinos el entrecruzamiento desigual (26).

Otro modelo, llamado "círculo rotatorio", que explica la aparición de secuencias repetitivas asume que éstas se hallan unidas, por sus dos extremos, formando un círculo. Una de las cadenas de DNA se abre y comienza a desenrollarse, sirviendo de templado para la síntesis de una nueva cadena. A su vez, la cadena complementaria se mantiene unida en círculo y actúa como molde para una segunda molécula de DNA. Por varios ciclos, puede producirse un número indefinido de secuencias repetitivas. Estas, pueden insertarse en regiones bien definidas dentro de los cromosomas o eliminarse por simple presión de selección (12).

El modelo anterior se basa en la existencia de una secuencia parcialmente multiplicada, el DNA espaciador, que separa los cistrones ribosómicos 18S y 28S en los ovocitos de *X. laevis* durante la amplificación de los rDNA. Una amplificación aberrante de ésta pudo ocurrir y translocarse a la HC centromérica. Alternativamente, una secuencia preexistente en la HC pudo ser amplificada, tal y como sucede en los cromosomas B del saltamontes. Esto infiere que un incremento en la cantidad de DNA sat de la HC centromérica confiere una ventaja selectiva, no al

individuo, sino al cromosoma que la contiene. Así, en *Drosophila* sp., un cen tiene diferente "fortaleza" durante la primera anafase. Un cen "fuerte" desplazará a un "débil" tras competir por el huso de su polo correspondiente. Al parecer no es el cen mismo, sino la cantidad y tipo de HC la que alterará la firmeza de unión a las proteínas del huso acromático, reduciendo la probabilidad de una no disyunción y pérdida cromosómica (84).

Yunis y Yasmineh propusieron un mecanismo que pudo originar el DNA sat. Un pequeño segmento pericéntrico o perinucleolar es amplificado o copiado durante meiosis en un cromosoma y distribuido a otros, dada la proximidad entre los cen y las NOR. Aunque el mecanismo de distribución se desconoce, en el ratón el DNA sat está distribuido en la HC centromérica de todos los autosomas, incluyendo el cromosoma X (29). Ohno postuló que los sexocromosomas de mamíferos se originaron a partir de un par ancestral común y que el cromosoma X se ha conservado en su totalidad, mientras que el Y sufrió cambios drásticos. Al parecer el DNA sat se originó con o después del surgimiento del ratón como una nueva especie y el del X probablemente se originó en un autosoma, a partir del cual se disgregó a los otros cromosomas, exceptuando al Y. Este mecanismo, se simplificaría si algún tipo de interconexión se estableciera entre los cen, lo cual es consistente con la tendencia a asociarse en meiosis (28).

Kurnit analizó profundamente la variabilidad que existe en la HC C y el DNA sat. El se apoya en un amplio número de estudios citogenéticos y moleculares de diversos grupos tales como protistas, invertebrados (vermes e insectos), plantas y animales superiores. Tal variabilidad implica que la HC C sufre un intercambio desigual durante la replicación mitótica (85).

Las siguientes aseveraciones argumentan esta hipótesis (85):

1. En la HC C las secuencias satélite son a menudo coincidentes. Estas entidades aparentemente no son transcritas.
2. La HC C muestra un amplio rango de variación, usualmente sin efecto fenotípico, entre los miembros de una especie dada.
3. El entrecruzamiento meiótico en la HC es raro o ausente.
4. Los rearrreglos de novo de la HC C son raros en células meióticas y están bien documentados en células mitóticas.

5. La mitomicina C (MMC), un alquilante bifuncional, induce un alto grado de variabilidad en la HC C de células somáticas.

6. La MMC induce rearrreglos somáticos del tipo ICH.

7. Los estudios inter e intraespecies indican una alta variabilidad somática del DNA sat.

8. La evolución de periodicidades cortas y largas de las secuencias del DNA sat es explicada por un entrecruzamiento desigual. El análisis de las segundas sugiere un modelo en que el evento de recombinación está asociado al proceso de replicación. Este último puede comprender unidades repetitivas interdispersas que regulen intervalos correspondientes a las longitudes del nucleosoma o aún múltiplos de dichas longitudes (85).

b. Evolución.

Durante la evolución de los protistas superiores, el tamaño del material genético se incrementó y probablemente fue necesario su distribución en uno o varios fragmentos (cromosomas). Para realizar las funciones de organización, mantenimiento y regulación, el genoma tuvo que recurrir a la aparición de múltiples sistemas, tales como sitios de inicio de la replicación, desarrollo de un nucléolo, etc. y de estructuras tales como cen, télómeros y HC, así como de un DNA repetitivo.

Un nucléolo rudimentario y algunas secuencias repetitivas posiblemente aparecieron antes que el cen y la HC C, ya que ciertos eucariontes primitivos (*Chlamydomonas reinhardtii*) poseen un solo nucléolo y DNA repetitivo, pero sus cromosomas están desprovistos de cinetocoros y de HC C. Al parecer los primeros DNA sat se originaron de protistas superiores, aunque no existe una relación con la presencia de HC C. En un principio, el DNA altamente repetitivo se produjo quizá por amplificación, pero éstas pudieron codificar para un producto. Posiblemente se mantuvieron durante la evolución por selección natural y por su utilidad como componentes estructurales (espaciadores) (29).

Si se considera que el DNA sat es especie-específico y con una tasa mutacional relativamente alta, uno se preguntaría cómo éste es capaz de proteger regiones informacionales que sufren pocas o ninguna mutación. Esto podría entenderse si el DNA sat

fuera funcionalmente alterado, eliminado o intercalado en el genoma, pero no si uno nuevo surgiera en especies relacionadas. Esta especificidad pudo darse simplemente por una selección aleatoria del segmento duplicado. La distribución de las secuencias se limita a un corto segmento, lo que justificaría la diferencia en la composición entre cromosomas homólogos (11,29).

Por otro lado, asumiendo el surgimiento de nuevas secuencias satélite, es posible que las secuencias "viejas" se perdieran por acumulación de un gran número de mutaciones, rupturas o rearrreglos cromosómicos. Mientras otras, llegarían a intercalarse en el genoma y formarían una gran porción de secuencias moderadamente repetitivas. Así, la especificidad del DNA sat y el hecho de que la unidad duplicada siempre sea más pequeña que la nativa, hace casi imposible la probabilidad de que estas secuencias puedan ser traducidas (29,84).

Es posible que las secuencias satélite hayan tolerado mejor las mutaciones que la EC, aún cuando pudieran dañar su aparente función. Otras sufrieron pocas mutaciones y llegaron a intercalarse en pequeños bloques de EC o se alojaron en la HC C (29). No sería sorprendente que originalmente una gran porción de DNA moderadamente repetitivo derivara del DNA sat y se distribuyera en la EC. Este tal vez tenga funciones estructurales tales como sitios de reconocimiento de las polimerasas, de terminación de la transcripción, de unión a membrana nuclear, de apareamiento y entrecruzamiento o de plegamiento para mantener la estructura cromosómica durante la división celular (11).

El DNA sat de *M. MUSCULUS* parece haber derivado de secuencias cortas. La mitad de ellas son ricas en AT y quizá derivaron de una secuencia ancestral (GA₅TGA). Existen 4 secuencias principales muy relacionadas y cada una se encuentra a -100 pb. La segunda y la tercera pudieron derivar de la primera por sustitución de A por C o deleción de A₅ por A₄. Así, un buen candidato para la primera unidad de replicación saltatoria sería una secuencia de 4 o más unidades ancestrales. Sus componentes mostrarían -12% de divergencia. Esta, se observa claramente en las secuencias satélite de las diferentes especies de *Mus* (1,42). Por hibridación cruzada se sugiere que dicha amplificación

ocurrió simultáneamente con la divergencia de las especies y su complejidad pudo ser de -120 pb (-10% de divergencia). Si no se produjera una selección natural y si las mutaciones se acumularan con la misma tasa que en otras secuencias, la tasa de divergencia sería de -1 m.a. Entonces, los eventos de replicación saltatoria habrían ocurrido hace 3, 5, 10 y 20 m.a., respectivamente. Estos cálculos son aproximados, ya que las secuencias satélite de cada especie poseen su propia presión de selección (1).

Existen, por lo menos, dos niveles de organización de las secuencias repetitivas: uno constituido por una secuencia repetitiva más larga, donde los elementos más cortos se relacionan unos con otros. Y otro, puede ser simplemente el resultado de un proceso que genere múltiples copias de una secuencia en estadios discretos (42).

El origen y distribución de diversas secuencias satélite en la población confiere una ventaja directa sobre los cromosomas que las contienen, ya que "sobreviven" mejor a los procesos mecánicos de la meiosis. Esta hipótesis se apoya en la presencia de DNA sat en regiones de HC C y de DNA sat a del conejillo de indias, donde la secuencia es simple y se ha multiplicado durante la evolución. Se propuso que no todo el DNA sat α deriva del tetrámero CCCT, el cual está presente con la misma frecuencia y que TCCT, por ejemplo, es 10 veces más frecuente que CCCC (84). El conejillo de indias posee 3 DNA sat. El II (que reasocia más rápido) y el III tienen una secuencia similar. Se asume que este último es el más antiguo y el que ha sufrido más cambios. Al igual que en el hombre, las secuencias tienen un ancestro común y han divergido durante su evolución (42).

Al hibridar cRNA de una especie con células de otra, se ha podido estimar el grado de homología. El DNA repetitivo de M. agrestis hibridado con el del hamster chino, el del ratón de laboratorio y el del hombre, muestra una amplia diferencia. Esta especiación al parecer ha sido rápida y radical (9).

M. musculus tiene una dotación diploide de 40 cromosomas, todos acrocéntricos. Mientras que M. poschiavinus (ratón del tabaco), una especie relacionada, tiene un número diploide de 26

cromosomas. La reducción del número diploide es, al parecer, producto de fusiones robertsonianas comprobadas por bandas G y Q. Ya que estas dos especies producen híbridos con algún grado de fertilidad, su relación se esperaría fuera cercana, a pesar de la drástica diferencia en su contenido y morfología cromosómicos. Los puntos de ruptura fueron cercanos a los cen, debiendo ocurrir en regiones de HC C y, por lo tanto, en el DNA sat. Los resultados por gradiente de densidad muestran que las dos especies poseen la misma fracción satélite y que la cantidad perdida en *M. roschiavinus* fue mínima. Probablemente el surgimiento de esta especie sea un evento reciente (9).

Cuando las células de *M. MUSCULUS CASTANEUS* fueron hibridadas con cRNA^o del DNA sat del ratón de laboratorio, el cen fue evidente, lo que indica una estrecha homología entre ellas. De igual manera, *M. cervicolor* y *M. caroli*, poseen una dotación cromosómica idéntica que *M. MUSCULUS*, pero una fracción satélite diferente. Hibridaciones *in situ* al usar el DNA sat de *M. MUSCULUS* no mostraron marcaje sobre los cromosomas de *M. cervicolor*. Otras observaciones con bandas G de *M. caroli*, tampoco mostraron diferencias con las de *M. MUSCULUS*, aunque las familias de DNA repetitivo sean completamente diferentes (9).

c. Funciones Especulativas.

Existen grandes especulaciones sobre las posibles funciones de la HC C y el DNA sat (9,12,26,29,30,45,85), pero ninguna ha sido comprobada experimentalmente.

Es posible que algunas de las secuencias moderadamente repetitivas formen HC intercalar y estén distribuidas, junto con las satélite, en la periferia del núcleo. Por conveniencia, se hace referencia únicamente a las secuencias altamente repetitivas, las cuales forman las bandas C (30). Algunas de sus probables funciones se mencionan a continuación:

1. Inservible. Algunos investigadores consideran al DNA sat como el equivalente de los "apéndices" de la evolución genética, y de alguna manera, lo refieren como "basura o chatarra", ya que al parecer es completamente inútil ("Doing Nothing") (9,30,86).

2. **Mantenimiento cromosómico (housekeeping).** Esta asignación ha estado sujeta a polémicas. Aparentemente, cubre una multitud de funciones estructurales tales como organización de los microtúbulos del huso acromático (HC centromérica), estabilizar las regiones terminales del cromosoma (HC telomérica) y dirección de los patrones específicos de plegamiento cromosómico. Dado que los rearrreglos cromosómicos más comunes para la especiación son los robertsonianos, la gran tendencia a asociarse por secuencias satélite podría facilitar las fusiones céntricas. Su ordenamiento es fijo y trascendental en el funcionamiento celular. La arquitectura nuclear se establece mediante la asociación de cromosomas y organelos (nucléolo y membrana nuclear). En estas interconexiones, la presencia constante de la HC C es importante en el mantenimiento de la estructura nuclear (9,12,26,30).

3. **Atracción de los cromosomas homólogos durante meiosis.** Al parecer, no es una función común. La HC C puede atraer cromosomas homólogos para iniciar el alineamiento durante meiosis y no homólogos para establecer la proximidad entre regiones o cromosomas completos funcionalmente relacionados. Empero, en las células de ratón, por ejemplo, todos los cromosomas poseen el mismo tipo de DNA sat en su cen. Si estas secuencias son las responsables de la sinápsis meiótica, la iniciación de un apareamiento entre cromosomas no homólogos debería ser tan factible como el apareamiento entre homólogos. Así, la identidad de las secuencias heterocromáticas debe ser una obligación más que una propiedad (26,29,30).

4. **Barreras de fertilidad.** Es posible que la HC C pueda establecer "barreras de fertilidad" que provean de medios para la diversidad y especiación de los organismos. Además, crean sitios genéticamente no esenciales para los rearrreglos cromosómicos (12,26,29,30). Así, ciertas especies o subespecies que tienen descendientes híbridos, presentan un fenómeno de infertilidad. Pese al contenido similar en sus secuencias satélite, durante la recombinación genética e independientemente de su dotación cromosómica, un mal apareamiento heteroduplex persiste. Esto impide el establecimiento de nuevas especies que puedan ser, quizá, eliminadas fácilmente por la selección natural.

5. **Especiación.** Otra función importante, y que de alguna manera es la contra parte de la anterior, es la de participar en la especiación. Se ha observado que la HC pericéntrica de los acrocéntricos "facilita" la evolución de los cariotipos, en la cual se generan fusiones céntricas para dar cromosomas "viables". Así, "una cierta cantidad de HC es evolutivamente deseable como un factor de seguridad, con un mayor grado de variabilidad que el que daría un sistema inflexible compuesto solamente de EC". Esto se ha observado al seguir la evolución de algunos mamíferos. Así, las familias del orden Rodentia (Muridae, Cricetidae y Microtidae), que tienen una gran cantidad de HC centromérica, muestran una amplia diversidad de cariotipos y de especies. En cambio en la familia Felidae, que tiene cantidades relativamente pequeñas de HC, existen solamente unas cuantas especies y sus cariotipos son similares (29). Esto también es apoyado por Dutrillaux, en donde analiza 150 rearrreglos cromosómicos de diferentes primates y encuentra que la HC C siempre ha estado presente a lo largo de la evolución (81).

6. **Materia prima para la creación de nuevos genes.** Es casi imposible argumentar en contra de esta hipótesis, pero tampoco es posible encontrar un soporte para ella. En ausencia de selección natural, las mutaciones pueden afectar la secuencia activa y acumular copias redundantes. Así, se crearían nuevos genes con una función previamente inexistente y que sólo podría adquirirse a partir de una nueva secuencia activa. Empero, las oportunidades de una copia redundante que surge triunfantemente como un nuevo gen son mínimas, ya que comúnmente le esperaría la degeneración. Para evitarlo, una secuencia debe adquirir una nueva función que beneficie al organismo en un periodo relativamente corto y así, quedar bajo la protección de la selección natural. Esta última, protege las nuevas secuencias para evitar la acumulación de más mutaciones aleatorias. En este momento, la selección natural llega a ser un contribuyente activo de la evolución, más que una fuerza conservadora. Puesto que una copia redundante no puede ser ignorada por ella, los genes participantes como ancestros comunes tienen un grado limitado de divergencia funcional (30,86).

7. **Fuerza centromérica.** La HC pericentromérica puede proveer de una fuerza centromérica que asegure una adecuada separación de

los cromosomas durante la división celular (29). Brown asume que la HC contribuye directamente en la orientación centromérica. Sin embargo, su efecto es tardío en el ciclo celular y puede de alguna manera reflejar el estado físico de las regiones adyacentes al cen. Se supone que un incremento en el número de secuencias de la HC centromérica puede mantener la estructura de los cromosomas. Esto es, protegerlos durante el proceso de división (no disyunción) o, directamente, de algún mecanismo semejante a la variegación, tal y como ocurre en el maíz (84).

8. Protección de regiones genéticamente activas. La HC C es muy sensible a la acción de mutágenos, carcinógenos y clastógenos. Por tal motivo, se sugiere que la HC C puede proteger (hipótesis "salvavidas" o bodyguard) las regiones genéticamente activas. Esto es, suele recubrir, en interfase, la superficie interna de la membrana nuclear y el nucleolo, para proteger las regiones dispersas centrales (EC). Alrededor de las NOR, la HC C puede servir como un espaciador para preservar los citrones ribosómicos 18S y 28S de mutaciones y entrecruzamientos desiguales. Tal función es esencial en la conservación de estas secuencias a través de la evolución. Ya que estos citrones son secuencias moderadamente repetitivas, la pérdida o mutación de ellos, no debería alterar la maquinaria celular. Si los genes ribosómicos necesitan protección, genes de copia única la necesitan aún más. Probablemente la HC es inefectiva en contra de la penetración de radiaciones ionizantes, pero ante la presencia de agentes químicos y virus es una excelente barrera. De igual manera, protegen el cen, el cual provee el sitio de unión al huso acromático. Sin embargo, todavía no se ha propuesto algún mecanismo para esta función protectora (9,12,26,29,30).

9. Apareamiento cromosómico. La hipótesis más aceptada es la relación de la HC (DNA sat) con el apareamiento cromosómico (12,26,29,30,45). Esto se basa en estudios realizados en *D. melanogaster* y *M. musculus*, aunque los mecanismos meióticos del primero difieren entre sexos. En el macho, la recombinación no se lleva a cabo ya que no hay formación de quiasmas, mientras que en la hembra si. Por manipulación de la HC se demuestra que el DNA sat per se no repercute en el reconocimiento entre homólogos durante la meiosis (45). Sin embargo, dos subespecies del ratón

(*M. musculus musculus* y *M. musculus molossinus*), contienen la misma fracción satélite, pero difieren en cantidad. Los heteroduplex entre estas dos subespecies tienen cromosomas homólogos con un complemento genético comparable. Los resultados muestran que no solo hay apareamiento y meiosis normal, sino que los híbridos son fértiles. Por lo tanto, la HC no es un factor fundamental para el apareamiento de homólogos. Esto es un poderoso argumento en contra de quienes aclaman que una de las funciones del DNA sat es actuar como barrera de fertilidad entre organismos muy relacionados filogenéticamente (45).

10. Entrecruzamiento cromosómico. Otra aparente función de la HC C es su relación con la recombinación genética (26,29,30,45). Algunas evidencias indican que el entrecruzamiento de plantas y animales es menos frecuente en la HC que la EC. Regiones condensadas pueden atraer cromosomas homólogos al inicio de la meiosis y éstas probablemente aseguren el apareamiento íntimo que es necesario para el entrecruzamiento (29). Observaciones en cromosomas bivalentes de varias especies de mamíferos indican que la HC está virtualmente libre de quiasmas (26). Otros trabajos realizados en saltamontes y *D. melanogaster* muestran que, con respecto al tamaño del bloque de HC, hay una sinapsis regular a pesar de las asimetrías marcadas en la mayoría de los bivalentes en las poblaciones híbridas estudiadas (45).

En algunas especies de erizo de mar, el patrón de entrecruzamiento puede modificarse radicalmente por la presencia de grandes bloques homocigotos de HC terminal. En especies relacionadas, en donde los bloques C no son homocigotos, este efecto está ausente y rara vez ocurre entrecruzamiento. En *D. melanogaster* las alteraciones en la cantidad de HC de un cromosoma no solamente son capaces de influir sobre las propiedades de este cromosoma, sino también de alterar el potencial de entrecruzamiento de otros miembros. En conclusión, estos descubrimientos sugieren que, a pesar de que la existencia de arreglos secuenciales dentro de la HC son variables, esta última es capaz de reducir la recombinación de la EC adyacente (26,45). Aunque existen evidencias circunstanciales, de alguna manera estas hipótesis explican el porqué los genomas eucariontes contienen cantidades tan elevadas de DNA repetitivo (30).

IV. POLIMORFISMOS CROMOSÓMICOS: OTRO ESPOQUE DE LA GENÉTICA.

A. ANTECEDENTES.

El hombre siempre se ha preocupado por establecer sus diferencias y caracterizar sus virtudes con respecto a otras especies. Para ello, se ha valido de estudiar y analizar, por diferentes métodos, su evolución a partir del DNA. No obstante, la caracterización de cada grupo (taxón) y aún de cada individuo, se basa en múltiples marcadores o sistemas polimórficos que le confieren una identidad dentro de la especie misma.

Ford (1940) introdujo por primera vez el concepto de "Polimorfismo" (PM), refiriéndose a una variante genética que ocurre dentro de una población con una frecuencia mayor que la producida por mutación recurrente. Así, el término PM se ha empleado comunmente para definir las variaciones morfológicas de un cromosoma. Estos son fácilmente reconocibles, observándose con frecuencia en la población, por lo que se ha recomendado el término "Variante" (Var) (32). Recientemente, se ha adjudicado el término "Heteromorfismo" (HM) para describir las desviaciones de la morfología de un cromosoma normal (78). Antes del advenimiento de las técnicas de bandeado se reconocieron, entre los cromosomas humanos, algunos homólogos que exhibían diferencias morfológicas consistentes. Con la ventaja de las técnicas de tinción, se ha incrementando el número de sitios heteromórficos y se reconocerán aún más, dado los últimos adelantos en biología molecular al emplear, principalmente, enzimas de restricción.

Los sistemas polimórficos deben presentar las siguientes propiedades para validar dicha identidad (87):

1. Poseer un patrón hereditario bien definido.
2. Ser estudiados con facilidad y utilizar una cantidad mínima de muestra.
3. No ser afectados por agentes externos.
4. Presentar variaciones significativas, en frecuencia, entre grupos raciales y aún entre poblaciones.
5. El locus o región estudiada debe contener alelos o secuencias alternativas.

6. Detectarse desde el nacimiento, sin presentar variaciones durante la ontogenia.

7. El polimorfismo debe ser selectivamente neutro.

Dentro del cariotipo humano, la presencia de alteraciones cromosómicas, tanto estructurales como numéricas, es bien conocida. Sin embargo, a partir de la segunda mitad de este siglo, los adelantos citogenéticos y moleculares han permitido reconocer variaciones morfológicas, expresadas de manera diferencial aún entre cromosomas homólogos.

Los Polimorfismos Cromosómicos (PM C) corresponden en esencia a la HC C, por lo que se localizan en las regiones de constricción primaria (cen) de todos los cromosomas humanos, regiones pericentroméricas (h) de algunos cromosomas meta y submetacéntricos, satélites, brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos y parte distal de los brazos largos del cromosoma Y. Son tan variables de un individuo a otro que pueden ser caracterizados y empleados como una tarjeta de identidad exclusiva, ya que son consistentes dentro de él (excepto cuando se presentan en forma de mosaico). Su existencia es continua, no discreta. Su modo de herencia es Mendeliana, aún cuando puedan presentarse como Var de novo. Se distribuyen en la población normal de acuerdo a la ley de Hardy-Weinberg. A menudo, no hay una relación directa entre un Heteromorfismo Cromosómico (HM C) identificado por una técnica y el mismo identificado por otra. Todos contienen cantidades variables de diferentes tipos de DNA altamente repetitivo (DNA sat). Se ha observado también que no tienen repercusión alguna sobre el fenotipo; sin embargo, datos en la literatura han reportado ampliamente que pueden tener un importante significado clínico (26,87-92).

B. VARIACION ESTRUCTURAL Y ASIMETRIA LATERAL.

El empleo de técnicas de bandeado, tales como Q, C, G-11, NOR y R, contribuye a una mejor elucidación morfológica de los cromosomas. La característica principal de los PM C es su amplio rango de variación estructural. De hecho, estos sitios variables se han subdividido en regiones o unidades específicas, cada una

mostrando una variación independiente, como la asimetría lateral, lo que aumenta el número de PM posibles (\$9,90).

1. Variación Estructural.

Se ha observado que la longitud de la HC C es afectada por el grado de contracción cromosómica dependiente del ciclo celular. Madan y Bobrow encontraron que la región de HC C del cromosoma 9 permanece relativamente constante, a expensas de la región de EC (93). Resultados similares se han reportado al estudiar la HC C de la parte distal de los brazos largos del cromosoma Y (94). De igual manera, Schmiady y Sperling confirmaron que los segmentos C del cromosoma 1 se contraen casi 50%, mientras que el material cromosómico restante solo 25% (95).

Balicek y cols. emplearon un método de medición lineal para estudiar el tamaño de los bloques C en relación al grado de contracción cromosómica. Los resultados mostraron que, al aumentar el grado de contracción, la HC C decrece en menor grado que las regiones de EC. Espero, por la existencia de diferentes métodos de evaluación hace difícil comparar los resultados con los de los otros laboratorios. Así, para caracterizar a la HC C, el efecto de la contracción debe ser eliminado (96).

Schmiady y Sperling sugieren que la longitud de los segmentos C varía considerablemente dentro de una población, por lo que un conocimiento detallado de su grado relativo de contracción es un prerequisite para su clasificación exacta (95). Esto ha sido un problema, puesto que los diferentes estudios no pueden ser comparados mientras no exista una definición uniforme. Por ello, es necesario utilizar los mismos métodos de tinción, corrección y análisis estadísticos para valorar y cuantificar las regiones de HC C, así como de EC.

Moehn y cols. en diferentes tejidos y tiempos de cultivo, encontraron que el promedio de las variaciones C no muestra cambios significativos en todos los cultivos. Sin embargo, la desviación estándar (DE) exhibe un incremento en su longitud con la edad del cultivo. En la EC y la HC C, se especula que una frecuencia elevada de entrecruzamientos desiguales ocurrieron en

la HC. Al parecer cambios en el patrón de bandas C no es una regla general en los diferentes tejidos de un mismo sujeto (97).

Erdtaann y cols. mostraron que el coeficiente de regresión (CR) entre la región C y la de EC (1q-h) del cromosoma 1 no siempre presenta el mismo grado de contracción. La tasa de contracción de la HC y de la EC varía de 21% y 42%, respectivamente. Al emplear un análisis de regresión lineal computarizado para corregir el error, sugiere que los datos son muy heterogéneos debido a la muestra y es necesario un mejor método de corrección para la variación (90).

Friedrich y Therkelsen afirman que el radio de HC y de EC de los cromosomas no puede ser utilizado para corregir la variación en longitud de la h, debido a la diferencia en el grado de condensación. Las h de los cromosomas 1, 9 y 16 se contraen en menor grado que las regiones eucromáticas y su condensación diferencial varía con el tamaño de la h. Además, existe una correlación lineal entre las longitudes de HC (qh) y de EC (p+q). También, los CR de qh/p+q son mayores para las h más grandes que para las más pequeñas. Por lo tanto, al emplear un buen método de corrección de las longitudes de las h, es posible aproximarse a una definición objetiva para evaluar las regiones de HC C (98).

2. Asimetría Lateral.

La incorporación de Brdu a los cromosomas metafásicos modifica las propiedades de tinción. En células que han completado dos ciclos de replicación (M2), una cromátida tiñe menos intensamente con Giemsa que la otra. Lin y cols. demostraron una tinción diferencial en los cromosomas de ratón con sólo un ciclo de replicación (M1). Asimismo, encontraron que la HC centromérica muestra una asimetría lateral con el colorante fluorescente Hoechst 33258 (99). Puesto que el DNA sat de ratón (rico en AT) está confinado a esta región y las cadenas contienen diferencias en cantidad de timina (45% y 22%), se sugiere una distribución desigual de residuos de timina en ambas cromátidas. Esto mismo se ha postulado para explicar una elevada frecuencia de asimetría lateral en las regiones 1qh y Yqh humanas al teñir con la técnica Brdu-DA/DAPI (89,90).

La técnica de colorantes fluorescentes y giensa (FPG) permite revelar una asimetría lateral de algunas regiones C. Por ejemplo, el cromosoma 1 exhibe una frecuencia reducida, lo cual puede ser un nuevo FM. La banda C del cromosoma 9 rara vez muestra asimetría. En contraste, 100% de asimetría lateral es observada en el cromosoma 16, una clara diferencia de tinción entre las cromátidas de Yq, las regiones C de los acrocéntricos (grupo D) y los cen de los cromosomas del grupo B (100).

A pesar de que existe una relación entre las bandas C, las bandas G-11, la asimetría lateral FPG y el DNA sat, no es posible explicar algunos eventos. Así el cromosoma 9 que contiene grandes cantidades de los 4 DNA sat y es G-11 positivo, no muestra tinción diferencial significativa. Mientras que el cromosoma 16 pese a contener un sólo tipo de DNA sat (II), tiene una marcada asimetría. Ya que sólo hay una pequeña diferencia en el contenido de timina total en ambas cromátidas del cromosoma 16, es probable que ésta altere las propiedades de tinción. Sin embargo, esto no acontece para la HC C de los cromosomas 1 y 9 (100).

Angel y Jacobs al estudiar la HC C (M1 con Brdu), encontraron que las cromátidas se tiñen simétricamente en el cromosoma 9, pero en los cromosomas 1, 15, 16 e Y, es notoria una asimetría lateral. Además, algunos cromosomas 1 mostraron asimetría lateral compuesta, con material densamente teñido en ambas cromátidas. Este patrón constante revela un nuevo tipo de FM (101). Observaciones posteriores sugieren que probablemente exista asimetría compuesta en el cromosoma 9 no detectable por las técnicas empleadas (102).

Se ha observado que la polaridad de las secuencias satélite no se conserva siempre. Esto es, la expresión de la asimetría lateral refleja la existencia de dos o más secuencias diferentes en la HC C de los cromosomas 1 y 9. Probablemente, los FM C de asimetría lateral del cromosoma 1 se deben a un entrecruzamiento desigual y por la frecuencia con la que ocurre en la evolución y el grado de variabilidad, no sería sorprendente que hubiesen eventos de NOVO en las diferentes familias (102). Asimismo, se ha visto asimetría lateral en la banda 6q12. Aunque su presencia implica DNA sat, es interesante señalar que la región 6q12 no

solamente no hibrida con algún DNA sat convencional, sino que puede contener un componente menor diferente. Por eso, la correspondencia del DNA sat y bandas C negativa, es una nueva categoría expresada en este cromosoma (103).

Por la técnica FPG, se detectaron dos regiones diferentes, así como las detectadas por DA/DAPI (90), de asimetría lateral en los brazos largos del cromosoma Y. La primera corresponde a la banda Yq12 y la segunda adyacente a las bandas q11 y q12. En los cromosomas Yq no fluorescentes, sólo se detectó una región de asimetría lateral en la parte distal. Esto sugiere que el DNA sat es diferente al de las bandas q11-q12 y al de otras regiones C. Empero, es posible que otros factores sean responsables de la tinción diferencial FPG y de la asimetría lateral (104).

Una asimetría lateral simple y compuesta es poco común en la región C del cromosoma 1. La mayoría de los cromosomas 9, 15 y 16 muestran tinción pálida y algunos con una asimetría simple. En las regiones 3cen y 4cen (regiones AT) se observa 50% de asimetría lateral simple, aunque sin detectar alguno de los cuatro DNA sat convencionales (105). También, una fracción satélite aislada y el empleo de Hoechst 33258 y EcoRI se observa un marcaje en el cromosoma 3, pero sin evidencia en el cromosoma 4; es posible que contenga otras secuencias repetitivas (45). Además, en ocasiones es notoria la asimetría lateral en los cen de los cromosomas 2, 5, 7, 13, 14, 17, 20, 21 y 22 (105).

La asimetría lateral simple del cromosoma 9 evidencia una marcada diferencia entre la HC con las bandas G y aquella con G-11. Aunque ésta se observó sólo en cromosomas con bloques grandes, ocasionalmente mostró asimetría lateral compuesta. Se especula que el cromosoma 9 está compuesto de 5 bloques separados de HC con diferentes concentraciones de timina, evidenciados por 3 bloques teñidos en una cromátida y 2 en la otra. Estos hallazgos pueden representar la naturaleza general de este cromosoma y no un artificio de las técnicas empleadas (106).

En conclusión, la longitud de cada región de HC varía continua e independientemente. La presencia de asimetría lateral, evidenciada con bandas G-11, hace posible la detección de un HM C

equivalente: simple y compuesto. La asimetría simple no se presenta en cualquier cromosoma con HC C y la frecuencia de asimetría compuesta no se correlaciona con el tamaño de la banda. Cada patrón es estable y heredado, aunque con algunas modificaciones metodológicas se pueden detectar estos HM (90).

C. EVALUACION DE LOS HETEROMORFISMOS CROMOSOMICOS.

La HC C quizá representa el sistema polimórfico más notable en los organismos eucariontes, debido a su amplio rango de variación. Los HM pueden ser evaluados de diferentes formas, con una amplia gama de clasificaciones e influenciadas por factores subjetivos que sólo son aceptables si se comparan con un grupo control adecuado. Muchos métodos de medición son sencillos y, para una presentación cuantitativa de los datos, es necesario hacer una corrección dado el grado de contracción cromosómica, el cual resulta un método más eficiente para evaluar los HM C.

La determinación de una Var representa un gran problema. Múltiples sistemas de evaluación han puesto de manifiesto la gran heterogeneidad de los datos. El tipo de análisis para definir que tan variable es un segmento heterocromático debe incluir un grupo testigo de la misma población. Esto conlleva a la subdivisión de las Var en clases, sin haber una identificación objetiva. Cuando diferentes formas subjetivas o arbitrarias de clasificación son empleadas, los datos tienen algunos puntos de comparabilidad (90).

Para evaluar la variabilidad de las regiones C se ha recurrido principalmente a dos sistemas: uno cualitativo y otro cuantitativo.

Cualitativo: Incluye la determinación de Var del tipo + (más) N (normal) y - (menos). La clasificación subjetiva, es la de mayor especificación [muy largo (ML), largo (L), medio (M) y corto (C)] y las clases normales incluyen más de 90% de las bandas. La clasificación relativa, emplea las regiones 1q, 16p, 21q, 22q, promedio del grupo P, etc., como estándar intracelular para eliminar el grado de contracción. También hay subdivisiones que reflejan elevaciones de los segmentos C (bandas Ce) (90).

Cuantitativo: Las regiones polimórficas son evaluadas por su longitud relativa, absoluta o medición de su área. Un análisis cuantitativo resulta ser más eficiente para evaluar una variabilidad continua. Empero, algunas variaciones pueden deberse a factores metodológicos, tales como técnicas de cultivo, desnaturalización, edad de las laminillas, tinción y estado de contracción cromosómica (90). Podugolnikova y cols. encontraron una gran variación inter-cultivo, pero no intra-laminilla, que pudiera ser responsable de estas diferencias (107). Mason y cols. notaron que la intensidad de tinción influencia grandemente la medición del área del segmento C, así como un efecto de la edad de las laminillas y diferencias entre los métodos de tinción (90).

De localización: excluyendo la región Yq distal, la HC C de todos los demás cromosomas tiene una localización pericéntrica. La detección de HC C en "p" o "q" es independiente de factores subjetivos, pero los resultados reportan grandes diferencias. Estas divergencias se explican por variaciones poblacionales, y, principalmente, por factores metodológicos (90).

Los métodos de tinción diferencial para la identificación de HC C son muy variados. La mayoría de los laboratorios, por razones prácticas y bajo costo, utilizan las técnicas de bandeado convencionales tales como Q, C, R, NOR, G-11, DA/DAPI, etc. y otros fluorocromos como distamicina A o mitramicina D. Todas ellas permiten localizar y medir la longitud de los FM C de cada cromosoma. Empero, la variabilidad de algunas regiones, tales como brazos cortos de acrocéntricos, es mejor identificada por otros métodos, dado el tipo de secuencias que contiene. También, el uso de técnicas de tinción al combinar varias de ellas, permite obtener otra expresión de las mismas Var, así como diferenciar homólogos (cromosoma 1) (90).

A pesar de las diferencias metodológicas es posible reducir el error a un nivel cercano al obtenido entre células de la misma laminilla en un análisis bien establecido y controlado. El empleo de métodos computarizados ha favorecido el manejo adecuado y rápido de los datos por medio de regresiones lineales para corregir el error de contracción cromosómica (90).

Es difícil establecer una definición para el tamaño de la h de un cromosoma particular. No es recomendable medir la longitud relativa, tal como $9qh/9p$, $9qh/21q$ o $9qh/16p$, ya que no puede ser usada objetivamente (90). Varios investigadores han intentado resolver este problema. Lelikova y cols. proponen una corrección de la longitud de acuerdo con la fórmula: $Lc^* = Lc + p(Lchr^* - Lchr)$. Los resultados muestran una clara regresión lineal con respecto al tamaño del segmento C (108).

Balick y cols. encontraron una correlación lineal entre la longitud de la EC y la de la HC de los cromosomas 1, 9, 16 e Y (96). Podugolnikova y cols. realizaron un análisis cuantitativo de los segmentos C tradicionales por 3 métodos: A) longitud absoluta, B) longitud relativa, como un porcentaje de la longitud total de todas las regiones C y C) longitud absoluta con corrección en el grado de condensación (108). Concluyeron que el método B es el más reproducible (107). Friedrich y Therkelsen emplearon otro método de correlación para corregir las longitudes h con respecto a las esperadas cuando la contracción se promedia. Los resultados exhibieron una definición de los límites normales para las regiones qh de los cromosomas humanos 1, 9 y 16 (98).

Stallard y cols. notaron que los homólogos de algunos cromosomas pueden diferenciarse por el tamaño del segmento C o por la presencia de IP. Homólogos morfológicamente diferentes muestran CR distintos. Los bloques C más grandes corresponden a los valores mayores de los CR y viceversa. Este sistema permite una definición objetiva del tamaño del bloque C de los cromosomas 1, 9, 16 e Y, ya que los CR describen una heredabilidad y un tamaño dependiente durante la contracción (109).

Patil y Lubs han establecido, por bandas C, un sistema de clasificación para las regiones qh de los cromosomas humanos 1, 9 y 16. Este utiliza 5 niveles diferentes y emplea a 16p para corregir el grado de condensación. Esta clasificación deriva de un análisis computarizado; sin embargo, los 5 niveles definidos no intentan representar clases discretas, sino describir únicamente un espectro continuo de variaciones en términos semicuantitativos (110).

Una medición relativa (longitud del segmento C/suma de los segmentos C de los cromosomas 1, 9 y 16 de la misma célula) del segmento C, generalmente muestra una variación mínima intraindividual. Por otro lado, los estudios poblacionales que usan los métodos cuantitativos, sin una metodología uniforme, muestran poca similitud. Esto implica que se requiere una uniformidad para que el análisis sea más confiable (90).

La medición del área de los segmentos C no es tan utilizado como el de longitud, ya que es más laboriosa y se necesita de un equipo más sofisticado (90). Sofuni y cols. realizaron un análisis (110) del área qh de los cromosomas 1, 9 y 16. Los resultados indicaron una variación considerable en la distribución de estas regiones cercana a la normalidad, aunque la media y la DE para cada una fue diferente (111). Azumi y cols. al comparar diferentes métodos de clasificación de las áreas C, propusieron el uso de la DE como parámetro para la delimitación de clases. Sin embargo, no es un método de rutina conveniente, ya que la frecuencia de los segmentos C de los cromosomas 1, 9 y 16 muestra una distribución normal y en todas las poblaciones habrá datos similares a los de las clases, aún cuando los promedios de los segmentos C sean diferentes (112).

Staessen y cols. evaluaron los bloques C de los cromosomas 1, 9, 16 e Y por los métodos de longitud y área. En la comparación, se tomaron en cuenta: la longitud y la superficie relativa de cada cromosoma, la media de cada individuo, la DE y el coeficiente de variación (CV). Los resultados indicaron que el valor relativo es mejor parámetro para cuantificar los PM C que el valor absoluto. Además, la mejor evaluación se obtiene al medir su longitud y dividirla entre la longitud total del cromosoma, requiriéndose analizar como mínimo 20 metafases (113).

También se ha recurrido al uso de análisis computarizados para cuantificar el contenido de DNA de los cromosomas humanos. Skavinski y Parcheta utilizando tinción con Feulgen, evaluaron si existe relación entre el contenido de DNA y los tamaños de la HC y EC del cromosoma Y. Ellos reportaron que un PM del Y implica un cambio en el contenido de DNA en relación a la longitud de HC y de EC (114). Wall y Butler también midieron el contenido de DNA

del cromosoma Y y usaron un fotomicroscopio computarizado y tinción con Feulgen. Después de corregir los errores sistemáticos y estadísticos, los valores medidos se consideraron altamente reproducibles y con un mayor grado de exactitud (115).

Otro método alternativo es el uso en relieve que exhiben las regiones de HC C, al utilizar iluminación invertida y oblicua. El empleo de bandas Ce (= elevaciones de la HC C) revela 5 clases discretas para la HC C del cromosoma 1 y presenta ventajas al compararlo con las bandas C (116). Al analizar el cromosoma 9 (incluyendo 9qh+, inversiones y translocaciones) se encontraron de 0-5 bandas Ce en 9q y de 0-4 en 9p. Por lo menos 19 patrones polimórficos teóricamente diferentes pueden observarse; empero, sólo se observaron 15 de ellos. En ambos homólogos, pueden existir $5^2=25$ cromosomas 9 cuantitativamente diferentes (117).

También, por análisis densitométricos se pueden estudiar los PM C. La intensidad de fluorescencia del cromosoma 13 por bandas Q han mostrado 5 clases diferentes: 1:1.5%, 2:24.0%, 3:45.5%, 4:23.5% y 5:5.5% (118). Y por microdensitometría, el área de una Var sugiere también la asignación de 5 clases diferentes para los cromosomas del grupo D y G (119).

Estudios preliminares indican que la cuantificación de los HM C por análisis fotométricos computarizados resulta excelente (89). Caspersson y cols. emplearon mostaza de quinacrina (MQ) sobre metafases y el patrón de distribución fluorescente fue evaluado por métodos fotoeléctricos. Los datos mostraron que los brazos cortos de algunos cromosomas (13, 15 y algunas veces 14 y 22) varían, considerablemente, en especial, Yq distal (120). Por mediciones citofotométricas, el grado de absorbancia (UV) de los cromosomas polimórficos 1 e Y y normales fue comparada. La microfotometría empleada a 265 nm en cromosomas sin teñir y a 546 nm en cromosomas teñidos con Feulgen muestra que la longitud de los cromosomas polimórficos está determinada por un incremento en el contenido de DNA y no por un desenrollamiento de la HC (121).

También por mediciones fotométricas sobre fotomicrografías, cromosomas teñidos con MQ y procedimientos reversibles es posible obtener datos cuantitativos de los PM C de acrocéntricos (122).

En conclusión, el empleo de las técnicas de bandeo contribuye a una mejor elucidación de estructura de los HM C. Cada región posee diferentes tipos y cantidades de DNA altamente repetitivo, por lo que la clasificación de un HM C debe basarse en su localización, tipo e intensidad de tinción y contenido de DNA repetitivo, más que por una simple medición de su tamaño. Debido a la existencia de diferentes parámetros, cada laboratorio utiliza un criterio propio de evaluación (cuantitativa y/o cualitativa), lo que no ha permitido establecer una clasificación definitiva. En ocasiones se obtienen tasas elevadas de HM por una evaluación errónea. Además, es importante considerar que la subdivisión de un parámetro continuo en clases reduce su capacidad informativa (90,91).

D. TIPOS, CLASIFICACION Y FRECUENCIAS EN RELACION A LAS TECNICAS DE BANDEO.

Aunque las técnicas de bandeo cromosómico se han empleado como rutina en los diferentes laboratorios, es conveniente conocer a fondo su naturaleza, nivel de organización y los mecanismos por los cuales son revelados. Estas incluyen métodos de tinción con Giemsa o colorantes fluorescentes (fluorocromos) que inducen la producción de bandas claras y oscuras. También, se han desarrollado técnicas de tinción selectivas y de conteo de gránulos de tinción para evidenciar HM específicos. Actualmente, el empleo de anticuerpos monoclonales y endonucleasas de restricción, ha permitido llegar hasta los límites moleculares, conociendo la naturaleza química y biológica de los HM C (89,123). Puesto que las técnicas de bandeo proporcionan un tipo característico de HM, cada una será descrita separadamente.

1. Heteromorfismos con Bandas Q (QPQ).

La primera técnica de tinción diferencial sobre cromosomas metafásicos fue implementada por Caspersson y cols. al revelar con MQ (Bandas Q). Se observó un patrón de bandas fluorescentes transversas de intensidad variable y así, diferentes HM en cada uno de ellos (124). Esta técnica se conoce actualmente como Bandas QPQ (bandas Q con fluorescencia y MQ) (125).

a. Naturaleza y Mecanismos de Producción.

Las bandas QPQ se clasifican dentro de un gran grupo llamado "bandas fluctuantes". Esta técnica, al igual que la de bandas G, forma un patrón de bandas teñidas positiva y negativamente, siendo opuesto al de bandas R. Son constantes de un tejido a otro y no cambian durante la ontogenia. En cromosomas profásicos aparecen numerosas bandas finas, las cuales se fusionan una con otra para formar un número menor (prometafásicos) hasta conformar una sola (metafásicos). Es posible encontrarlas en todos los mamíferos y otros vertebrados, pero raras veces en organismos inferiores (insectos) (126).

Aunque el mecanismo implicado en la fluorescencia se conoce poco, se acepta que las bandas Q positivas son regiones que replican tardíamente (AT), mientras que las Q negativas son de replicación temprana (GC) (123). Trabajos de inmunofluorescencia y de autorradiografía apoyan lo anterior, pese a que el método usado para desnaturalizar el DNA puede afectar su distribución. Existen algunas variaciones en el patrón de replicación de un tipo celular o de un individuo a otro. Se ha sugerido que las bandas Q negativas ocupan una porción relativamente pequeña de los cromosomas. Trabajos por hibridación *in situ* demuestran que los genes informacionales están localizados predominantemente en ellas. El patrón de bandas Q se relaciona muy estrechamente con el patrón de cromómeros encontrados en cromosomas de paquíteno. Ya que los cromómeros son las primeras subestructuras condensadas en profase meiótica, se especula que las Q positivas representan los centros de condensación de los cromosomas mitóticos (126).

Al parecer las bandas fluctuantes se correlacionan con la composición diferencial del DNA. Trabajos recientes indican que el DNA rico en AT tiende a aumentar la fluorescencia de la quinacrina, mientras que las regiones ricas en GC a disminuirla. Más aún, la variación en la composición del DNA prácticamente puede ser la base para la producción de las bandas Q (123). Como otros fluorocromos, la quinacrina actúa con el DNA por dos mecanismos: intercalación entre las pb adyacentes con uno de los grupos básicos activos y unión superficial por interacciones electrostáticas con grupos fosfatos (126).

Por otra parte, es posible que las proteínas tengan alguna influencia. Espero, se ha demostrado que la distribución de las histonas y de las no histonas es uniforme a lo largo de los cromosomas, aunque existe una heterogeneidad de ciertas glicoproteínas en relación a las bandas Q. Es probable que la mayoría de los métodos no tengan la suficiente especificidad para una proteína conocida que muestre una clara heterogeneidad. Algunos autores asumen que las bandas están asociadas con la condensación cromosómica más que con las proteínas mismas (126).

b. Tipos, Clasificación y Frecuencias.

Los HN revelados por esta técnica están restringidos a los cen de los cromosomas 3 y 4, los brazos cortos (bandas p11 y p13) de los cromosomas acrocéntricos (13, 14, 15, 21 y 22) y la parte distal de los brazos largos del cromosoma Y (88,89,91,123).

Los FM C con bandas QFQ se clasifican de acuerdo a su tamaño e intensidad de fluorescencia. En un principio, estas Var se dividían en 3 categorías: a) fluorescencia intensa, como la de Yq distal, b) fluorescencia normal, como en algunos satélites y c) fluorescencia negativa, como en la b de los cromosomas 1, 9 y 16 (88). Actualmente, los HN C se clasifican en 5 niveles por su intensidad de fluorescencia, la cual se asigna la clave 5 al nivel brillante y la clave 1 al menos fluorescente (32) (Tabla 9).

Tabla 9. Criterio para los Niveles de Intensidad QFQ (32).

| Clave | Descripción | Comparación |
|-------|-------------|---------------------------------------|
| 1 | Negativo | No fluorescente |
| 2 | Pálido | Como en 1p distal |
| 3 | Medio | Como en la banda principal 9q |
| 4 | Intenso | Como en la banda principal 13q distal |
| 5 | Brillante | Como en Yq distal |

Se ha sugerido una relación entre los pb y la estructura secundaria del DNA. Esta fluorescencia cambia con la energía de las 4 bases del DNA, lo que explicaría el grado de fluorescencia

en todo el cromosoma, la mayor brillantez de las bandas Q y, además, el efecto de las proteínas en el acceso de la quinacrina al DNA. Estudios con MQ tritizada sugieren que no hay más colorante unido al cromosoma Y que a los otros cromosomas (3).

En los cromosomas 3 y 4, las bandas intensamente fluorescentes están adyacentes a los cen de ambos brazos. Los HM del cromosoma 3 son más comunes en la banda 3q11, seguido de una en brazos cortos y luego en ambos brazos, con una frecuencia que va de 41.0 hasta 68.4% en poblaciones normales (88,89,91). Estas discrepancias tal vez son por diferencias raciales o el uso de distintos sistemas de clasificación. Petrovic reportó un nuevo FM con propiedades de tinción no usuales, que es variable en tamaño, posición con respecto a la banda de HC y no es brillante con bandas QFQ (127). También, se han reportado IP del cromosoma 3, una de ellas implica las bandas inv(3)(p15q12) y sin efectos fenotípicos (88,89).

Existe una mayor incidencia en el grado de HM del cromosoma 4 (4cen) que en la del cromosoma 3 y va de 2.7-48.3% (89,91,128). Verma y Dosik reportaron una frecuencia de 8.5% en individuos normales (129). Bardhan y cols. notaron dos tipos de HM para el cromosoma 4: una de fluorescencia media en el cen (8%) y otra, intensamente fluorescente, en la región p proximal. En este estudio ninguno de los individuos analizados presentó ambos tipos de FM o en ambos homólogos (130). No se han registrado HM con IP para el cromosoma 4 (89).

Pese a que con la técnica de bandas QFQ no se observa una fluorescencia positiva para las h de los cromosomas 1, 9 y 16, Spedicato y cols. reportaron una Var no usual en la región 9qh. Este material extra exhibe una intensidad similar a la banda 9q21 (131). Un caso similar fue reportado por Thompson y Roberts para una nueva Var del cromosoma 16, la cual contenía un segmento extra en la región proximal de los brazos cortos (16p+) (132).

Los cromosomas acrocéntricos presentan la mayor diversidad de HM. Los brazos cortos (p11), satélites (p13) o ambos pueden presentar fluorescencia normal o intensa. Aunque todas las combinaciones se han encontrado en cada uno, el cromosoma 13 es

el más heteromórfico, mientras que el cromosoma 21 lo es menos (88,89,91). Las bandas intensamente fluorescentes son siempre C positivas y las normalmente fluorescentes pueden ser C positiva o negativa. Esto hace suponer que no todos los PM posean DNA altamente repetitivo. Las variaciones de los tallos de los satélites parecen ser C negativas, lo cual se debe a que son regiones moderadamente repetitivas codificantes para los rRNA 18S y 28S intercaladas con secuencias repetitivas (88).

Por fotometría, Schnedl y cols. hallaron que, por lo menos, 12 de 23 pares cromosómicos contienen un HM. El 13cen es brillante y de tamaño variable, similar al de los cromosomas 3 y 4; espero, sus brazos cortos no muestran la intensidad reportada en la literatura (121). Wachtler y Musil encontraron en la región 15p un área distal del cen (p1.1.1-p1.1.3). Se dedujo que la banda es parte del tallo satélite, con una frecuencia de aparición de 87% (133). De igual manera, Chen y cols. encontraron 8 Var del cromosoma 15 con 3 grupos diferentes de ellas: 1) fluorescencia diferencial del cen y satélites, 2) fluorescencia brillante de satélites gigantes (15s++) y 3) aumento intersticial del segmento heterocromático entre el cen y satélites (ph+) (134).

Bernstein y cols. encontraron una Var extrema (22p+) del cromosoma 22 que en ocasiones presenta un material no identificado (fluorescencia negativa). Además, el DNA en esta región se encontraba altamente metilado y su asociación (t) no fue mayor a la de los otros acrocéntricos, pese a un número presumiblemente excesivo de genes ribosomales (135).

Al investigar la frecuencia de los PM QFQ en líquido amniótico, Barker y cols. encontraron 12 Var; las más frecuentes fueron la banda brillante 13p (45.8%) y 3cen (42.6%). Sin embargo, en un estudio adicional se halló un patrón polimórfico diferente entre los cariotipos materno y fetal (136).

Finalmente, la técnica de bandas QFQ que revela el HM C más brillante (nivel 5), virtualmente único en el cariotipo humano y vagamente expresado en otras variantes, corresponde a las dos terceras partes distales de los brazos largos del cromosoma Y (34,88,89,91). Se ha sugerido que el material genéticamente

activo se localiza en el segmento no fluorescente, considerado invariable en su tamaño. Mientras que el segmento genéticamente inactivo o brillante es variable en tamaño (32). También se ha visto que la intensidad de tinción de la región Yq distal con Hoechst 33258 es menor que con quinacrina (34). Todas las variaciones en longitud son atribuidas a un incremento o decremento en el contenido de DNA sat (88).

Wahlström llegó a la conclusión de que cromosomas Y extremadamente largos o cortos son el resultado de cambios estructurales. Si cromosomas cortos fuesen debidos a un estado de contracción, el cromosoma debería mostrar fluorescencia (137). Soudek y Laraya hallaron un cromosoma Yq- (índice promedio Y/F=0.85 en 60 individuos normales) no fluorescente. Sin embargo, por bandas C, observaron una región C positiva. Asumen que se trata de dos regiones distintas, ya que ambas técnicas no reaccionan sobre el mismo segmento heterocromático (138).

Algunas evidencias asumen que la longitud del segmento no fluorescente del cromosoma Y también es variable; por ello, futuras investigaciones deberán definir si las variaciones son por uno o varios tipos de arreglos secuenciales de la HC C (89).

2. Heteromorfismos con Bandas C (CBG).

Pardue y Gall, al hibridar *in situ* cromosomas de ratón, notaron que la HC centromérica teñía más intensamente con Giemsa que el resto de los cromosomas (31). Estas observaciones fueron similares a las de los cromosomas humanos (29,139). En el método utilizado originalmente, las preparaciones cromosómicas eran tratadas con HCl, RNasa e NaOH para desnaturalizar el DNA e incubadas en solución salina citratada (2xSSC). Métodos subsiguientes fueron desarrollados al tratar las laminillas con soluciones alcalinas moderadas [Ba(OH)₂] (140). Aunque estos métodos tienen un patrón similar de bandeado, tienen la ventaja de controlar mejor el proceso de renaturalización. El método fue adjudicado como Bandas C (32). Más tarde, un término más específico fue asignado como Bandas CBG (bandas C con hidróxido de bario y Giemsa) (125).

a. Naturaleza y Mecanismos de Producción.

La técnica de bandas CBG se clasifica como "bandas constantes". La composición de la HC C ha sido poco estudiada. Métodos específicos de tinción de proteínas no diferencian las regiones heterocromáticas, aunque pueden visualizarse con un tratamiento previo. Esto sugiere que las proteínas presentes deben ser más resistentes a la extracción. Por otro lado, la tinción con Giemsa es positiva debido a la extracción del DNA en estas regiones. Se sugiere que el mecanismo de producción de bandas C incluye: 1) un tratamiento ácido que despurina al DNA sin ruptura del mismo, 2) una incubación en solución salina que rompe al DNA y permite que los fragmentos queden en la solución y 3) un tratamiento con álcali que produce un alto grado de desnaturalización, lo que facilita la disolución del DNA (126).

Esto sólo refleja los diferentes grados de despurinación o desnaturalización, empero interacciones entre DNA y proteínas, comparadas a las presentes en brazos cromosómicos, pueden afectar la extracción. También, una digestión con DNasa apoya que el DNA esté fuertemente asociado a proteínas (126). Es de suponer que las regiones altamente repetitivas desnaturalizan más rápidamente que el DNA menos repetitivo. Esto puede comprobarse cuando se tinte con naranja de acridina (NA) después de un tratamiento con álcali. Empero, las bandas C se producen en DNA renaturalizado o en DNA de una sola hélice fijado en formalina, lo que descarta un mecanismo de producción por rápida renaturalización (3).

Al parecer algunas bandas C no poseen DNA sat, sin existir una correlación entre bandas C positivas y DNA de doble cadena. Este último no une más colorante que el de cadena sencilla. Por otro lado, más de 80% del DNA aislado de cromosomas o núcleos interfásicos permanece de doble hélice durante la fijación y más de 70% de hebra sencilla después del tratamiento con álcali y 2xSSC. Además, el DNA sat centromérico es más resistente a la extracción debido a un mayor grado de compactación (3,141).

Observaciones más detalladas concernientes al mecanismo de producción de las bandas C fueron realizadas por Comings y cols., y llegaron a las siguientes conclusiones (141):

1. En promedio, la técnica completa de bandas C remueve cerca de 60% del DNA.

2. Este DNA es preferencialmente extraído de regiones C-negativas.

3. La tinción con Feulgen indica que las bandas C pueden explicarse por las diferentes concentraciones de DNA a lo largo de los cromosomas.

4. Tratamientos con álcali o tratamientos prolongados con tripsina no influyen en la permanencia de las bandas C.

5. El uso combinado de NA y Giemsa indica que: a) el DNA repetitivo renaturaliza en segundos *in situ*, mientras que el no repetitivo en minutos y b) las bandas C no dependen de la renaturalización diferencial.

6. Para obtener bandas C, los cromosomas deben tratarse más drásticamente que para obtener bandas G y eliminar éstas.

7. Las interacciones DNA-no histonas probablemente son parte importante en la producción de las bandas C.

A este respecto, es difícil que el RNA o las histonas participen en la producción de bandas C, ya que en los cromosomas tratados con RNasa o ácidos no afectan su producción (141).

Fundamentalmente, la producción de bandas C es por una extracción selectiva del DNA de las regiones C negativas y por permanencia de una mayor cantidad de DNA en las regiones de HC C (123,141,142). Se sugieren dos etapas sucesivas para la pérdida del DNA: 1) despurinación y desnaturalización simultánea durante el tratamiento con HCl y álcali [NaOH o Ba(OH)₂] y 2) el DNA desnaturalizado es cortado en fragmentos más pequeños que se pierden durante la incubación en 2xSSC. Los factores que influyen en la pérdida selectiva del DNA de las regiones de HC C aún no se han establecido. Pero se ha observado que ciertas proteínas no histonas unidas a la HC C resisten a estos tratamientos (123).

Existe una nueva técnica de bandas CBG de alta resolución que ha sido aplicada a las regiones C de los cromosomas humanos 1, 9, 16 e Y. Los cen tiñen fuertemente al igual que algunos satélites y la morfología es bien preservada. La técnica es altamente reproducible y simple, la cual se puede aplicar a cromosomas en profase tardía y metafase temprana (143). Se

observa que las h están compuestas de áreas oscuras (HC) y de áreas claras (EC), indicando la presencia de diferentes tipos de DNA. En suma, aunque la región completa replica tardíamente no lo hace al mismo tiempo (144).

b. Tipos, Clasificación y Frecuencias.

Los HN C evidenciados por la técnica de bandas CBG están confinados a los cen de todos los cromosomas, a los satélites y a los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos (13, 14, 15, 21 y 22), a las h de los cromosomas 1, 9, 16 y a la parte distal de los brazos largos del cromosoma Y (88-92,123).

Estos FN C se clasifican de acuerdo a su tamaño (longitud y/o área). Las primeras descripciones de estos FN en cariotipos normales se realizaron por tinciones convencionales de -2-3% en poblaciones de recién nacidos vivos. Se reportaron FN tales como $1qh+$ (0.62%), $3cent+$ (0.29%), $Dp+$ (2.3%), $16qh+$ (4.0%), $Gp+$ (3.5%) y $Gs+$ (2.5%) (145). Nikelsaar y cols. y Friedrich y Nielsen reportaron un marcador $1qh+$ (0.9%) y $9qh+$ (5.7%) en una población normal y un $1qh+$ (4.12%) en 5,043 recién nacidos vivos, respectivamente (146,147). Asimismo, Ferguson-Smith detectaron Var del tipo $1qh+$ (0.5%), $9qh+$ (1.2%), $16qh+$ (0.88%), $17ph+$ (0.75%) y del grupo G (1.6%) en otra población (148).

También, en dos poblaciones hindúes, Ghosh y Sing detectaron FN de los cromosomas del grupo D (9.0%), del grupo G (5%) y $16qh+$ (4%) con frecuencias de 10, 6 y 3%, respectivamente (149). Cabe señalar que aquellas descripciones eran meramente apreciativas y sólo se reportaban los más evidentes. Además, no contaban con un método de medición adecuado para evaluar dichos FN, ni con un grupo comparativo apropiado para cada población.

Con el advenimiento de las nuevas técnicas de tinción, diferentes estudios han reportado un elevado índice de HN C en casi todos los autosomas, principalmente en las regiones qh de los cromosomas 1, 9, 16 e Y (Tabla 10). Es importante que para definir a un FN es necesario contar con un entrenamiento adecuado para sensibilizar al observador en tener un criterio lo más objetivo posible.

Tabla 10. PM C de Bandas C Reportados por Diferentes Estudios (157, modificada).

| lqh | 9qh | 16qh | Otros | (A) | (B) | (C) | (D) | Referencia |
|-----|-----|------|-------|-------|-----|-------|-----|------------|
| 1 | 1 | 1 | 4 | 5 | 4 | 1 | 7 | 150 (1971) |
| 5 | 6 | 7 | 13 | 20 | 17 | 3 | 31 | 151 (1973) |
| 9 | 10 | 1 | - | 19 | - | - | 20 | 152 (1973) |
| 19 | 8 | 8 | 12 | 216 | - | - | 47 | 148 (1974) |
| 1 | - | 4 | 34 | 2500 | 38 | 2462 | 39 | 153 (1974) |
| 20 | 26 | 24 | 11 | 49 | 42 | 7 | 81 | 154 (1974) |
| 5 | 1 | 13 | 202 | 13939 | 215 | 13724 | 221 | 155 (1975) |
| 6 | 4 | 10 | 172 | 11148 | 187 | 10961 | 192 | 156 (1975) |
| 7 | 11 | 8 | 16 | 30 | 26 | 4 | 42 | 157 (1976) |

A = Número de individuos estudiados.

B = Número de individuos con PM C.

C = Número de individuos sin PM C.

D = Número de PM C observados.

Para los cromosomas humanos del grupo A se han reportado diferentes Var. Kim (158) encontró tres tipos de h para el cromosoma 1; la Var más frecuente (tipo III) estuvo presente en 4 miembros de una misma familia y concluyó que estas regiones constituyen los cromocentros de células interfásicas y de cromosomas profásicos. De igual manera, Túur y cols. (159) hallaron una Var lq+, cuya frecuencia (1.9%) es mucho mayor que la reportada en la literatura (0.3%). Petrovic (127) encontró una variante no usual (3cen+) con una tinción positiva con bandas CBG y GTG, pero variable con bandas QFQ.

En los cromosomas del grupo B, también se han reportado Var raras. Babu y Verma (128) encontraron un PM en el cromosoma 4 (4ph+). En el cromosoma 5 (5qh+) se halló una Var similar en 2 familias diferentes, que posiblemente provengan de un ancestro común y corresponda a una amplificación del material G-11 positivo o a una inserción del segmento C del cromosoma 9 (160).

Entre los PM del grupo C, Sofuni y cols. hallaron una nueva Var en dos mujeres japonesas (6ph+), que por sus cualidades de

tinción parece similar a 9qh. Otra fue identificada como 12ph+ y posteriormente confirmada en dos varones de otra población japonesa (161). Madan y Bruinsma refieren que la Var del cromosoma 6 está en la banda 6p11 y muestra un incremento de -9% del contenido total cromosómico (162). Empero, Callen y cols. sugieren que esta PM (6ph+) es más bien una duplicación del cen, adyacente a las secuencias alfoideas y que corresponde a una banda G-negativa (163). Otra Var rara fue reportada en 3 generaciones de un misma familia como 11q23.2, la cual es no-centromérica y CBG, GTG y QFQ positiva (164).

La región polimórfica 9qh ha sido ampliamente examinada. Madan y Bobrov evaluaron el tamaño de esta región y encontraron un tamaño promedio entre homólogos de 1:2 a 2:3. Al comparar el tamaño con sus brazos cortos, 6% de estas, son casi tan o más grandes que 9p, lo que demuestra un menor grado de compactación (165). Hansmann propone que esta PM puede producirse por dos mecanismos distintos: un entrecruzamiento desigual o un evento de doble ruptura que lleve a una inserción o una delección. Empero, se observa una mayor frecuencia de 9qh+ (8.2%) que de 9qh-, probablemente por una mayor eliminación de este último. Los mecanismos que alteran la cantidad de HC C deben ser frecuentes y siempre en los mismos puntos de ruptura y reunión (q11 a q13) (166). Spedicato y cols. describieron un PM C no usual y sin efectos fenotípicos en 9p proximal que corresponde a una banda extra G-positiva, C y G-11 negativa (131).

Se ha reportado que la mayor frecuencia de los PM del cromosoma 16 corresponde a 16qh-, aunque también se han visto HM 16qh+. Además, Thompson y Roberts (132) y Pinel y cols. (167) han reportado un nuevo HM (16p+). En ambos trabajos, los portadores son fenotípicamente normales y muestran una banda extra G-positiva, C y DA/DAPI negativa, lo que indica que no consiste de HC C demostrable por estas técnicas.

Por otro lado, Crossen observó 4 formas distintas de HM en el cromosoma 19: 1) HC confinada al área centromérica, 2) HC que se extiende del cen hacia los brazos cortos, 3) HC que se extiende del cen hacia los brazos largos y 4) HC que se extiende hacia ambos brazos. La mayor frecuencia (-75%) correspondió a la

primera categoría (1:1) designada como "normal", mientras que en la cuarta categoría no se observó ningún caso (168).

En la mayoría de los cromosomas acrocéntricos, es frecuente observar casi todos HM posibles. Por ejemplo, el cromosoma 15 exhibe un material fuertemente teñido (ph+), que no se ha asociado con actividad nucleolar. Además, se han observado Var tales como 15ss-, 15s+ y 15ss+ (134). También se ha reportado un PM 22p+ que se correlaciona con el porcentaje de asociación y es posible que presente una amplificación de su rDNA (135).

El cromosoma Y con bandas CBG también tiñe positivamente en las dos terceras partes de sus brazos largos. Todas las Var son atribuidas a la cantidad de HC C presente, con una incidencia de 1/100 para Yqh+ y 0.39/100 para Yqh- en individuos normales (154). Tanto las bandas CBG como QFQ denotan el grado de este PM, aunque no necesariamente el mismo segmento C (138).

Inicialmente, los HM C de las regiones 1qh, 9qh y 16qh se clasificaban en las 3 categorías tradicionales, mientras que otras, tales como los cromosomas de los grupos B, D, E (17-18), F y G, se clasificaban en 4:0, 1:3, 2:2 y así, de acuerdo al patrón de comparación C entre homólogos (151). Müller y cols. sugirieron que la HC podría ser clasificada en 5 categorías, empleando como referencia a 21q (169). Empero, algunos autores opinan que este último es muy largo y que las h grandes serían erróneamente clasificadas dentro de un nivel intermedio.

Por métodos cuantitativos, la variabilidad intraindividual de las regiones de HC C de los cromosomas 1, 9, 16 e Y sugiere que las longitudes relativas son más estables que las absolutas. Así, las longitudes promedio y DE de estas regiones fueron 1.26 ± 0.23 , 1.13 ± 0.20 , 0.85 ± 0.14 y 1.13 ± 0.21 , respectivamente. El análisis comparativo, la variabilidad y la distribución de los segmentos C entre sexos no revela diferencias estadísticamente significativas (DES). Esto confirma la idea de que la longitud qh es una característica neutra en la población normal independientemente del sexo (170,171). Además, no existe una correlación entre la longitud de homólogos o en cromosomas de varios pares, por lo que son combinaciones al azar (172).

Actualmente, el tamaño de las regiones qh tradicionales se clasifica en 5 categorías diferentes, utilizando como referencia el promedio de los brazos cortos del cromosoma 16 (16p). Esto es con el propósito de eliminar el grado de contracción cromosómica de cada mitosis (89,110) (Tabla 11).

Tabla 11. Criterio de Clasificación para el Tamaño de los FN de la región qh de los Cromosomas Humanos 1, 9 y 16 (110).

| Nivel | Descripción | Base |
|-------|-------------|-----------------------|
| 1 | Muy Pequeño | $\leq 0.5 \times 16p$ |
| 2 | Pequeño | $> 0.5-1 \times 16p$ |
| 3 | Intermedio | $> 1-1.5 \times 16p$ |
| 4 | Grande | $> 1.5-2 \times 16p$ |
| 5 | Muy Grande | $> 2 \times 16p$ |

En un estudio, las regiones qh fueron clasificadas por sexo (Tabla 12). Por lo general, las del cromosoma 1 corresponden a un nivel intermedio, las del cromosoma 9 al pequeño y las del cromosoma 16 al muy pequeño. Para los cromosomas 1 y 9, se asignaron 4 niveles y para las del 16, solamente 3 niveles (173).

Tabla 12. Frecuencias de los Diferentes Tamaños de FN C por Sexos (89,173,modificada).

| | Niveles | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|---------|----|----|-----|---------|----|-----|-----|---------|-----|----|----|--------|---|-----|---|-----|
| | (1) | | | (2) | | | (3) | | | (4) | | | | | | | |
| Sexo | 1 | 9 | 16 | T | 1 | 9 | 16 | T | 1 | 9 | 16 | T | 1 | 9 | 16 | T | T |
| Masc. | 8 | 14 | 40 | 62 | 34 | 44 | 35 | 113 | 38 | 20 | 5 | 63 | 2 | | 2 | | 240 |
| Fem. | 8 | 25 | 37 | 70 | 36 | 40 | 36 | 112 | 34 | 14 | 7 | 55 | 2 | 1 | 3 | | 240 |
| Total | 132 | | | | 225 | | | | 118 | | | | 5 | | 480 | | |
| (%) | (27.5) | | | | (46.87) | | | | (24.58) | | | | (1.04) | | | | |

Si todos los cromosomas son incluidos, la frecuencia de los niveles 1, 2, 3 y 4 es de 27.5%, 46.87%, 24.58% y 1.04%, respectivamente. Por ejemplo, el número 25 significa que 25 cromosomas 9 son pequeños (nivel 2). No hubo DES entre las frecuencias de homocigotos y heterocigotos (Tabla 13), así como para el tamaño y posición de los HM C (173).

Tabla 13. Tamaño de los PM en las "h" por Homólogos (173).

| Cromosomas | Niveles* | | | | | | | Total |
|------------|----------|-------|------|-------|-------|-------|------|-------|
| | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,2 | 2,3 | 3,3 | 3,4 | |
| 1 | 3 | 9 | 1 | 21 | 21 | 23 | 2 | 80 |
| 9 | 7 | 22 | 3 | 25 | 12 | 8 | 3 | 80 |
| 16 | 27 | 22 | 1 | 19 | 11 | | | 80 |
| Total | 37 | 53 | 5 | 65 | 44 | 31 | 5 | 240 |
| % | 15.41 | 22.08 | 2.08 | 27.08 | 18.33 | 12.91 | 2.08 | |

* Las combinaciones que no se encontraron entre los 80 individuos se eliminaron de esta tabla.

En los últimos años se ha desarrollado un nuevo sistema de clasificación para la región qh del cromosoma Y, al usar un microscopio fotométrico. Este cuantifica el contenido de DNA de cromosomas individuales y la HC C muestra una distribución discontinua en bloques separados por bandas pálidas (EC) que no tifen con bandas CBG. Esta distribución permite su clasificación en 4 tipos (Tabla 14) de acuerdo al número de bandas. Se encuentra una relación de 1:4:4:1 para los diferentes PM de la región Yqh, correspondiente a los cromosomas con 1, 2, 3 o 4 bandas C, respectivamente. Si se comparan los patrones de bandas C, se nota un incremento en la masa promedio de 1.36×10^{-14} g por cada banda extra, lo que representa un aumento aproximado de 13.26×10^6 pb. Los resultados sugieren que estos cambios en la HC son suficientes para producir un HM. Esto además demuestra que la HC no se observa en forma continua, sino en bloques discretos (115).

Tabla 14. Relación entre el Número de Bandas C, Masa de DNA y Equivalencia (pb) de los tipos de Cromosomas Y (115).

| Parámetro | Número de Bandas C | | | |
|--|------------------------|-------------------------------------|------------------------|--------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Número | 10 | 30 | 32 | 8 |
| Masa promedio | 5.88×10^{-14} | 7.17×10^{-14} | 8.63×10^{-14} | 10.005×10^{-14} |
| Número de Bandas C vs. correlación de masa, $r=0.9997$ | | | | |
| DE | 0.498 | 0.416 | 0.4255 | 0.449 |
| pb promedio | 57.42×10^6 | 70.12×10^6 | 84.31×10^6 | 97.75×10^6 |
| Diferencia (g) | 1.30×10^{-14} | 1.4×10^{-14} | 1.4×10^{-14} | |
| Diferencia promedio (g) | | 1.36×10^{-14} | | |
| Diferencia promedio (pb) | | 13.26×10^6 | | |
| | | F=192.37 | | |
| | | gl=3/76 significativa a $P > 0.001$ | | |

Varios sistemas de clasificación se han propuesto, pero ninguno se ha aceptado unánimemente. El Sistema Internacional de Nomenclatura en Citogenética Humana (ISCN) (125) propone el uso de la clasificación de Patil y Lube (110). Sin embargo, el hecho de adjudicar a cada región un cierto nivel, obliga a los investigadores a realizar estudios comparativos y poblacionales para establecer el significado citogenético y molecular de la HC C y, por lo tanto, de los diferentes FM C.

c. Inversiones Pericéntricas.

Anteriormente, el conocimiento de las inversiones (inv) de los cromosomas humanos era extremadamente limitado. Sólo algunas que se podían detectar eran las pericéntricas, las cuales eran identificadas por su morfología (cromosomas metacéntricos). Actualmente, por las técnicas de bandeos es posible detectar cualquier tipo de inv. La identificación de IP de las regiones de HC (h) permitió reconocer un nuevo tipo de HM C.

Existen pocos trabajos en poblaciones normales que reportan IP de los cromosomas 1, 9, 16 e Y, de las cuales la región 9qh es

la de mayor frecuencia (Tabla 15). Las frecuencias de IP de 1qh y 16qh son casi esporádicas. Por ejemplo, Tüür y cols. informaron una frecuencia de inv(1) de 0.48% en 208 adultos normales no relacionados (159).

Tabla 15. Frecuencias de IP del Cromosoma 9 con Diferentes Métodos y en Diferentes Poblaciones (166, modificada).

| Población | Bandeo | Frecuencia | Referencia (año) |
|---------------------|--------|------------|------------------|
| Recién Nacidos | - | 1/3543 | 174 (1970) |
| Caucásica y Negra | - | 2/3476 | 175 (1971) |
| Caucásica y Negra | - | 10/ 807 | 175 (1971) |
| Pacientes | - | 1/2291 | 148 (1974) |
| Pacientes-Escocia | + | 4/ 367 | 148 (1974) |
| Normal | + | 8/ 282 | 165 (1974) |
| Pacientes-Finlandia | + | 6/ 631 | 176 (1974) |
| Pacientes-Alemania | + | 6/ 93 | 166 (1976) |
| Pacientes-Hawaii | + | 9/1032 | 177 (1978) |

En un estudio realizado en Hawaii con individuos de diferentes razas, se hallaron IP de qh en 13 individuos. Cuatro de ellos tuvieron una inv(1) parcial, otro una inv(9) parcial, uno más tuvo una inv (9) parcial en ambos homólogos y un 21p- y 7 pacientes una inv(9) total. La frecuencia observada fue de 3.4% en orientales y de 0.4% entre los no-orientales (177).

Hansmann realizó un trabajo exhaustivo sobre la variabilidad estructural del cromosoma 9 y su evolución. Observó que este cromosoma muestra una alta susceptibilidad a rearrreglos estructurales, particularmente IP y 3 tipos de IP: Tipo I, toda la HC C yace en los brazos cortos; Tipo II, parte de la HC C se localiza en los brazos cortos y el resto en q proximal y Tipo III, cromosoma subteloentrico con parte de la HC C en los brazos cortos y el resto localizado intersticialmente en los brazos largos. Al parecer los puntos de ruptura se localizan preferentemente en la HC o cercano a las uniones de EC-HC. Estas observaciones sugieren que el cromosoma 9 humano fue en un

principio acrocéntrico y que tenía, por lo menos, algunas funciones similares a las de los cromosomas de los grupos D y G. Probablemente, durante su evolución este acrocéntrico cambió a submetacéntrico debido a una IP (166).

Donlon y Magenis emplearon diferentes técnicas de bandeado para definir la subestructura de 9qh. Por bandas CBG, 21 (38.88%) sujetos tuvieron una región positiva en ambos brazos (IP tipo II) o en brazos cortos solamente (IP tipo I). En 18 de ellos, el segmento C era mucho mayor que la región G-11 positiva. Empero, se presentaron pocas diferencias entre ambas técnicas comparadas con las que revelaron IP parciales o cromosomas normales (106).

Para evaluar diferentes tipos de IP y establecer sistemas de nomenclatura más uniformes, Verma y cols. clasificaron a los HN con IP en 5 categorías (Tabla 16). Esta se basa en la cantidad de HC C (h) confinada a cada brazo de los cromosomas humanos 1, 9 y 16 (173).

Tabla 16. Criterio de Evaluación de los HN con IP de las "h" en los Cromosomas Humanos 1, 9 y 16 (173).

| Nivel | Descripción | Definición |
|-------|-------------------------|---|
| 1 | No inversión (NI) | La h está confinada a los brazos "q". |
| 2 | IP-Menor (MIN) | Menos de la mitad de la h está presente en los brazos "p". |
| 3 | Inversión Media (MI) | La mitad de la h está presente en brazos p y la otra en brazos q. |
| 4 | IP-Mayor (MAJ) | Más de la mitad de la h está presente en los brazos p. |
| 5 | Inversión Completa (CI) | La h completa de los brazos q pasa a los brazos p. |

Al evaluar los HN con IP de los cromosomas 1, 9 y 16 en 80 caucásicos, se encontró que el cromosoma 16 no presenta IP, lo cual se confirma con lo reportado en la literatura. Solamente se encontraron 34 cromosomas (7.08%) con una IP. De estos, 16

correspondieron al cromosoma 1 y 18 al cromosoma 9 (Tabla 17). No se observaron IP con nivel 5, así como con nivel 4 (173).

Tabla 17. Frecuencias de los Diferentes Tipos de HN con IP por Sexo en los Cromosomas 1, 9 y 16 (173).

| Sexo | Cromosoma | Niveles de Inversión | | |
|------------|-----------|----------------------|---------|--------|
| | | 1 (NI) | 2 (MIN) | 3 (HI) |
| Masculino | 1 | 70 | 10 | |
| | 9 | 72 | 6 | 2 |
| | 16 | 80 | | |
| Femenino | 1 | 74 | 5 | 1 |
| | 9 | 70 | 8 | 2 |
| | 16 | 80 | | |
| Total | | 446 | 29 | 5 |
| Porcentaje | | 92.92 | 6.04 | 1.04 |

Además, los HN con IP de los 80 individuos se clasificaron por homólogos. Por ejemplo, hay 4 pares del cromosoma 9 en los que un homólogo no tuvo IP y el otro tuvo la mitad de la h presente en ambos brazos (173) (Tabla 18).

Tabla 18. PN con IP entre los 80 Individuos por Homólogos (173).

| Cromosoma | Niveles de Inversión | | | | |
|------------|----------------------|-------|------|------|-------|
| | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 2,2 | Total |
| 1 | 65 | 13 | 1 | 1 | 80 |
| 9 | 62 | 13 | 4 | 1 | 80 |
| 16 | 80 | | | | 80 |
| Total | 207 | 26 | 5 | 2 | 240 |
| Porcentaje | 86.25 | 10.83 | 2.08 | 0.83 | |

También, se combinaron los resultados de los tamaños y las IP de los cromosomas 1, 9 y 16. No se presentó una DES entre masculinos y femeninos, pero si hubo una posible interrelación al mostrarse una elevada frecuencia. Por ejemplo, hay 118 cromosomas que se clasificaron como tamaño "intermedio" (nivel 3) y 23 (19.5%) tuvieron IP. En contraste, hubo 225 que fueron de tamaño "pequeño" (nivel 2) y unicamente 10 (4.4%) tuvieron IP. Es posible que una IP parcial pequeña o muy pequeña de la "h" sea indetectable con las técnicas empleadas (173) (Tabla 19).

Tabla 19. Interrelación de los Tamaños y PM con IP de los Cromosomas 1, 9 y 16 (Combinada) (173, modificada).

| Niveles de Inversión | Niveles por Tamaño | | | | Cromosomas Totales |
|-------------------------|--------------------|---------|---------|--------|-----------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| 1 (MI) | 132 | 215 | 95 | 4 | 446 |
| (%) | (27.50) | (44.79) | (19.79) | (0.83) | (92.92) |
| 2 (MIM) | | 7 | 21 | 1 | 20 |
| (%) | | (1.45) | (4.37) | (0.20) | (6.04) |
| 3 (HI) | | 3 | 2 | | 5 |
| (%) | | (0.62) | (0.41) | | (1.04) |
| Total | 132 | 225 | 118 | 5 | 480 |
| Porcentaje | (27.50) | (46.87) | (24.58) | (1.04) | |

3. Heteromorfismos con Bandas R (RFA).

El principio básico de las llamadas bandas "reversas" o bandas R es el tratamiento de las laminillas a altas temperaturas en soluciones amortiguadoras y tinción con NA o Giemsa. El patrón de bandas R es opuesto al producido por las bandas Q y G. Otros métodos para evidenciar bandas R incluyen tinción con diferentes fluorocromos tales como cromomicina A3 y olivomicina y en general cualquiera que tenga afinidad por secuencias ricas en GC (123).

En un principio (Dutrillaux y Lejeune, 1971) se empleó colorante Giemsa (178) y más tarde, (Verna y Lubs, 1975) NA para dar una mejor resolución a los cromosomas (179). Actualmente, son nombradas como Bandas RFA (bandas R con fluorescencia y tinción con NA), así como modificaciones de la misma: Bandas RFG (con calor y Giemsa), Bandas RBD (con Brdu y Giemsa) y Bandas RBA (con Brdu y NA) (123,125).

a. Naturaleza y Mecanismos de Producción.

Las bandas R corresponden al grupo de las "bandas fluctuantes". Por hibridación *in situ* y autorradiografía, se observó que éstas son las regiones de transcripción más activas y que las rupturas cromosómicas espontáneas e inducidas ocurren en ellas (126), aunque los sitios críticos pueden ser las zonas de interbanda. Las bandas más extensas son las primeras en replicar y a tiempos intermedios de replicación se producen bandas intermedias. Por ello, la replicación de bandas Q no se sobrepone con la de las bandas R y esto es consistente con la presencia de dos etapas en la fase S. Si cada banda R contiene más de 100 replicones, entonces cada una debe activar un número suficiente de ellos a diferentes tiempos en S temprana y carecer de replicones tardíos; empero, los resultados no son unánimes (180).

El principio general es el uso combinado de un colorante fluorescente como NA (tinción primaria) y de otro colorante que sea o no fluorescente de diferente longitud de onda (contratinción). Después de una desnaturalización selectiva y tinción con NA, las hebras sencillas se tiñen de color rojo y las duplex de color verde. También, diferencias en densidad electrónica entre bandas y regiones interbanda son mucho más finas en cromosomas con bandas R que en aquéllos con bandas G (123). De hecho, la naturaleza diferencial entre las bandas Q/G y R es por secuencias complementarias de "clusters" AT y GC, más que por una relación lineal entre la intensidad de fluorescencia de una banda y su composición de bases (3).

El mecanismo de producción de las bandas R no ha sido dilucidado por completo. Se ha observado que el tipo de bandeo producido puede alterarse por simple ajuste de pH y temperatura.

Además, se ha visto que esta técnica es la que extrae la menor cantidad de proteínas durante el proceso de desnaturalización de los cromosomas (126). Por otra parte, se ha comprobado que con tratamientos térmicos existe una mayor desnaturalización de secuencias ricas en AT que de regiones ricas en GC (180).

b. Tipos, Clasificación y Frecuencias.

Los HM C con bandas RFA se encuentran especialmente en los brazos cortos de todos los cromosomas acrocéntricos (grupos D: 13-15 y G: 21-22). Las variaciones en estas regiones pueden observarse tanto en color como en tamaño (89). Verma y Lubs establecieron un sistema de clasificación para los HM con bandas RFA (181). Este se basa, por una parte, en 6 colores distintos al comparar los FM con las diversas regiones del cariotipo (Tabla 20) y, por otra parte, en 5 niveles de tamaño al compararlos con el brazo corto del cromosoma 18 (18p) (Tabla 21).

Tabla 20. Criterio de Clasificación de los HM C con Bandas RFA en Base a su Color (181).

| Código | Color | Comparación |
|--------|--------------------|---|
| 1 | Rojo | 3cen. |
| 2 | Rojo-naranja | Media de 2q (q21-q24). |
| 3 | Naranja-amarillo | 18p. |
| 4 | Amarillo pálido | Distal 1q (q32 y q42) y 20p. |
| 5 | Amarillo brillante | Distal 1p (p3), 22q y 19. |
| 6 | Verde pálido | Presente solamente en la h de los cromosomas acrocéntricos. |

En un estudio piloto las frecuencias de los HM fueron registradas. El tamaño de los FM fue del mismo orden en todos los cromosomas, aunque ligeramente menor en el 22 (Tabla 22). Una h de color verde (clave 6) del cromosoma 13 representó la mayor frecuencia, mientras que la más baja se le atribuyó al cromosoma 22. Al comparar con bandas QFQ, las variaciones fueron notorias. Por ejemplo, 62% de los cromosomas 14 tuvieron un FM con bandas RFA y únicamente 25% de estos con bandas QFQ. En contraste,

ninguno de los cromosomas sin Var RFA tuvo una Var QPQ. Por el contrario, las Var QPQ más intensas de los cromosomas 13, 15 y 21 correspondieron a cromosomas con y sin una Var RFA. En general, Var extremas en color fueron muy raras. Se concluye que no hay relación alguna entre la intensidad QPQ y los varios colores observados con RFA (181).

Tabla 21. Criterio de Clasificación de los HM C con Bandas RFA en Base a su Tamaño (181).

| Código | Tamaño | 13-15 | 21-22 |
|--------|-------------|----------------------|----------------------|
| 1 | Muy pequeño | Virtualmente ausente | Virtualmente ausente |
| 2 | Pequeño | < 0.5 x 18p | ≤ 0.25 x 18p |
| 3 | Medio | ≥ 0.5 a 1.5 x 18p | > 0.25 x 18p |
| 4 | Grande | > 1.5 a 2.0 x 18p | = 18p |
| 5 | Muy grande | > 2.0 x 18p | > 18p |

Tabla 22. Frecuencia de HM C en 25 Individuos Normales con Bandas RFA en los Cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22 (181).

| Color | Código | 13-15 | | 21-22 | |
|--------------------|--------|--------------|------|--------------|----|
| | | # Cromosomas | % | # Cromosomas | % |
| Rojo | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Rojo-naranja | 2 | 2 | 1.3 | 3 | 3 |
| Naranja-Amarillo | 3 | 90 | 60.0 | 15 | 15 |
| Amarillo pálido | 4 | 31 | 20.7 | 64 | 64 |
| Amarillo brillante | 5 | 4 | 2.6 | 12 | 12 |
| Verde pálido | 6 | 23 | 15.4 | 6 | 6 |
| Tamaño | | | | | |
| Muy pequeño | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Pequeño | 2 | 24 | 16.0 | 3 | 3 |
| Medio | 3 | 118 | 78.7 | 86 | 86 |
| Grande | 4 | 8 | 5.3 | 10 | 10 |
| Muy grande | 5 | 0 | 0 | 1 | 1 |

Estudios posteriores tampoco demostraron relación entre FM detectados por bandas QFQ y RFA. Las frecuencias de color con RFA para los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22 fueron 33.0, 38.0, 28.0, 50.0 y 24.5%, mientras que con QFQ fueron 56.0, 10.0, 10.0, 15.5 y 10.0%, respectivamente. El color más frecuente para el grupo D fue naranja-amarillo, mientras que para el grupo G fue amarillo pálido (89,182). El tamaño más frecuente fue el código 3 (medio). No hubo DES entre sexos y es evidente que las bandas RFA detectan más variaciones en el tamaño de los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos que cualquier otro método (89,183).

4. Heteromorfismos de las NOR.

Las NOR son las h de los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos. A partir de las técnicas de hibridación *in situ*, se desarrollaron métodos accesibles para localizar NOR en cromosomas metafásicos. En un principio, las NOR se teñían con Giemsa y tomaban el nombre de Bandas N (184) o Bandas NSG (bandas N con tinción de las NOR y Giemsa) (125). Luego, fue desarrollado un método más específico con impregnación argéntica (Ag) y fueron llamadas Bandas NOR (185) o Bandas Ag-NOR (123,125).

a. Naturaleza y Mecanismos de Producción.

La tinción Ag-positiva de las NOR se observa en las zonas de células mitóticas que fueron funcionales durante la interfase anterior. La cantidad de material teñible varía durante el ciclo celular. Es mayor en la interfase y menor en metafase y anafase. En células meióticas la tinción permanece hasta paquiteno o diploteno, pero se pierde en metafase. Esto indica que el grado de actividad ribosómica y de la tinción es proporcional al número de copias activas de rDNA. El número de NOR varía de 4-10 y la cantidad de plata en cada acrocéntrico con NOR activo da un patrón único en cada individuo y constante en todos sus tejidos. Sin embargo, la cantidad de NOR activas depende de la diferenciación celular y los requerimientos funcionales (74,126).

Las NOR de los cromosomas humanos son afectadas por el envejecimiento, con pérdida de rDNA hibridable y decremento de la cantidad de Ag fijada. Además, esto es más notorio en las mujeres

(cromosomas del grupo D) y su actividad parece estar regulada por sistemas hormonales (tiróides) (74).

Una de las características de las NOR es que permanecen asociadas en metafase, por lo que se le ha descrito como una asociación de satélites. De hecho, las asociaciones son producto de la participación activa en la formación de los nucléolos de la interfase precedente. Empero, éstas se realizan a nivel de los tallos (NOR) y no en los satélites mismos. El término adecuado para designarlas sería entonces asociación de NOR o de acrocéntricos. El contacto físico entre ellas está dado por los rDNA. Así, la frecuencia de asociación se correlaciona con la longitud del tallo-satélite, la cantidad de tinción Ag-positiva y la cantidad de rDNA presente. Se han establecido varios criterios para determinar la distribución y el porcentaje de asociación entre individuos. Al parecer el cromosoma 21 participa más activamente que otros, en donde se observan rearrreglos y dependencia del sexo. Por ejemplo, en mujeres los cromosomas 13 y 21 participan con más frecuencia que otros (26,74).

Las asociaciones se pueden clasificar en cromátidicas (más frecuentes) y cromosómicas. Se ha encontrado con ICH que las cromátidas asociadas tienen una orientación lateral y una segregación al azar, en una cromátida y no aleatoria de doble cromátida, en el segundo y tercer ciclo celular, aunque los resultados son confusos (74).

Al combinar las diferentes técnicas de bandeado es posible distinguir tres regiones de los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos, las cuales exhiben una gran variabilidad. Las regiones no teñidas después de una tinción con DIPI o quinacrina parecen ser los tallos, pero cuando se tiñen con mitramicina se observan dos regiones: una proximal muy fluorescente y otra distal muy opaca. Esta última contiene muy poco DNA, pero al utilizar bandas Ag-NOR el precipitado queda opaco y deja libre la región fluorescente. Esta porción está sujeta precisamente a PM y puede estar ausente o tener grandes cantidades de secuencias GC (186).

El mecanismo de producción de las bandas N y NOR es poco conocido. En ambas técnicas la tinción es negativa después de un

tratamiento con tripsina o pronasa, pero es positiva al extraer el DNA (26,123,126). Al parecer las no histonas son las responsables de la producción de las bandas N (184), con una pequeña porción y específicas de las NOR (23,123).

El componente responsable de la tinción Ag-NOR parece ser de naturaleza protéica, de tipo ácido y altamente fosforilado (RNP). Se ha observado que solamente las NOR activas se tiñen con plata, lo que indica que las proteínas asociadas con la transcripción de los citrones ribosómicos son las responsables de esta impregnación. Estudios de microscopía electrónica revelan que la tinción es adyacente a las NOR y no sobre ellas. También se ha demostrado que estas proteínas están representes sólo en unidades de transcripción nucleolar y ausentes en las secuencias espaciadoras entre un cistron y otro. Su naturaleza es incierta, pero se ha sugerido la participación de proteínas ácidas ricas en grupos sulfhidrilo y disulfuro, de las proteínas C23 y B23 y de las subunidades grandes de la RNA polimerasa (23,123).

b. Tipos, Clasificación y Frecuencias.

En los acrocéntricos, con bandas QFQ, CBG y RFA, existen por lo menos 3 bandas heteromórficas: bandas p11, p12 y p13. Sin embargo, al emplear la técnica de bandas Ag-NOR, únicamente la banda p12 (NOR) es fuertemente teñida. Usando bandas RFA, se ha demostrado que el color de las NOR equivale al verde pálido y no se observa en ninguna otra parte del genoma humano. El número de acrocéntricos que revela este color varía de una persona a otra y es consistente en todos sus tejidos (74,89).

Las regiones Ag-NOR se han clasificado citológicamente en 5 categorías, de acuerdo a la cantidad de plata depositada. El nivel 1 corresponde al "muy pequeño", mientras que el nivel 5 al "muy grande". Rara vez tamaños muy grandes con NOR duplicada o triplicada con o sin satélite (14p+ y 22p+) han sido reportados (51,74,89,135). El cromosoma 15 es el más polimórfico, principalmente 15p+ y 15ps+ (133,134). Howell y Black describieron una técnica simultánea de bandas NOR y bandas G que permite la identificación individual de las NOR y evalúa la cantidad de plata sobre cada acrocéntrico (187).

5. Heteromorfismos Usando Biología Molecular.

a. Mecanismos de Producción.

Recientemente, el uso de las técnicas de Biología Molecular, sobre todo aquellas que implican endonucleasas de restricción, ha permitido también la identificación de HM C. Los cromosomas metafásicos son susceptibles a DNasas. Por ello, al tratar cromosomas con estas enzimas, muestran un patrón de bandeo característico, resultado de la cantidad de DNA extraído, que a su vez depende del tamaño de los fragmento producidos y determinado por la distancia entre dos sitios de corte-específicos (26,123).

La digestión con DNasa I y nucleasa micrococcica sobre el DNA produce secuencias cortas de unos cuantos pb. Por el contrario, con DNasa se generan fragmentos largos debido al reconocimiento de secuencias cortas de 4-5 pb. Esto resulta en la extracción selectiva de secuencias específicas, en donde las zonas que tienen un mayor número de sitios de reconocimiento generan fragmentos más pequeños. Se ha sugerido que fragmentos de DNA de más de 1000 pb permanecen en la matriz cromosómica, mientras que fragmentos menores de 250 pb son extraídos de los cromosomas. La pérdida del DNA está directamente relacionada con el decremento en la tinción diferencial con Giemsa (26,123).

El mecanismo de bandeo cromosómico por endonucleasas de restricción ha revelado que, al cuantificar radioactivamente el DNA extraído y digestiones subsecuentes con proteinasa K, producen la pérdida de fragmentos más largos. Esto sugiere que la organización espacial y el plegamiento de las fibras de Cr son factores importantes en el mecanismo de producción (188).

Cada región cromosómica puede revelarse al emplear diferentes enzimas y tinción con Giemsa. El cromosoma completo es susceptible a la digestión; no obstante, por el hecho de que las enzimas de restricción reconozcan diferentes sitios de corte y produzcan bandas similares, es probable que éstas no tenga acceso a todos los sitios específicos. Algunas enzimas como AluI, MboI, DdeI, EcoRII y HinfI, producen una marcada disminución de esta

Dale y cols. encontraron en una familia dos portadores de un 14p+. El material extra C positivo reveló que contenía DNA repetitivo, diferente a los encontrados comunmente en la HC C de los cromosomas 1, 9, 15, 16 e Y. La hibridación in situ con la sonda a (pTRA-2) para acrocéntricos mostró un incremento significativo en la cantidad de las secuencias a centroméricas (192). Earle y cols. también hallaron otro 14p+, al emplear las sondas pTRA-2, pTR9-H2 (específica de DNA sat III) y pY3.4. Al parecer, el origen del material extra es resultado de la amplificación de algunos segmentos centroméricos (DNA sat III), normalmente presentes en el cromosoma 14 (193).

Para caracterizar a la HC C, Babu y Verma evaluaron estas regiones con AluI, HaeIII y varias técnicas de bandeó. Los resultados mostraron que la HC puede dividirse en por lo menos 7 tipos. Las regiones pericéntricas de los cromosomas 1, 5, 7, 9, 13-18 y 20-22 consisten en más de un tipo de HC, en las cuales el cromosoma 1 tiene el mayor grado de heterogeneidad, mientras que para los cromosomas 10, 19 e Y, no lo hay. El cromosoma 18 representa el HM pequeño con más frecuencia en tamaño y posición (AluI). Esto sugiere que las propiedades de cada tipo de HC están relacionadas con la diversidad de sus secuencias (194).

Una nueva secuencia ha sido aislada a partir de una clona de DNA sat III (sHS3), clonado de sgtWES y derivada de EcoRI. Esta se localiza en el cromosoma 1 (qh), mientras que en los cromosomas 9 y 16 no se relaciona con el tamaño del segmento C polimórfico. La secuencia dentro de sHS3 puede representar una fracción satélite homóloga a algunas de las secuencias de DNA sat II o III. El DNA sat total contiene una mezcla de secuencias, algunas de las cuales se localizan en ciertos pares cromosómicos (195). Este hecho fue confirmado más tarde al emplear una clona de DNA sat α para evaluar la especificidad y variabilidad de la HC C. Cinco sondas hibridaron en los cromosomas 3, 11, 17, 18 y X. Los resultados revelaron que la HC C tiene, efectivamente, una gran variabilidad de secuencias satélite a que pueden ser útiles para la detección y la evaluación de los PM C humanos (196).

La técnica de citometría de flujo se ha empleado últimamente para identificar cromosomas mitóticos y cuantificar DNA.

Homólogos materno y paterno pueden diferenciarse por la posición "pico" al emplear Hoechst 33258 y cromomicina A3; esta distribución diferencial se conoce como cariotipos de flujo bivalente. Al hacer un análisis comparativo y determinar el rango de posición pico entre cromosomas normales, los cromosomas 13-16, 19, 21, 22 e Y fueron los más heteromórficos y los cromosomas 2-8 y X los menos polimórficos. El cromosoma 21 más grande fue 45% mayor que el 21 más pequeño. La composición de bases de las regiones C difirió entre los tipos cromosómicos. La hibridación *in situ* con sondas específicas de DNA repetitivo indicaron que la variabilidad en el número de copias es parcialmente responsable de la posición-pico en algunos cromosomas. Por tanto, los HM C pueden ser identificados por la información paterna de los cariotipos de flujo si los rearrreglos de novy son resultado de cambios en el contenido genético (197).

También, actualmente, se han caracterizado y evaluado los HM de las regiones de bandas C por medio de una batería de enzimas de restricción (AluI, MboI, HaeIII, DdeI, HinfI y RsaI) (Tabla 23). Cada enzima induce un patrón de tinción característico de cada región heterocromática, lo que sugiere una alta diversidad de secuencias repetitivas o satélite en ellas. No obstante, varios FM identificables por bandas CBG no fueron detectados. Esto indica que puede existir una variabilidad en la distribución y en la frecuencia de sitios de restricción en cromosomas homólogos. Así, la región C revelada por esta técnica proporciona una herramienta muy útil para identificar marcadores y compararlos con los de otras técnicas ya descritas (188,198).

6. Heteromorfismos Revelados por Otras Técnicas de Bando.

La técnica de Bandas G-11 representa una modificación de la tinción con Giemsa a un pH alcalino (pH 11). Esta tinción está restringida a ciertas regiones de bandas C, la cual revela las regiones pericentroméricas de los cromosomas 1, 3, 5, 7, 10, 20 y la región proximal de los brazos cortos y satélites de acrocéntricos. El área más evidente corresponde a la del cromosoma 9 y algunas veces a las del 1 y del 4 (26,123,126).

El mecanismo de producción de las bandas G-11 aún no es bien

Tabla 23. Distribución de Bandas C Convencionales Comparada con la de Bandas Inducidas por Endonucleasas de Restricción en los Cromosomas Humanos (188).

| Cromosoma No. | Bandas C | Bandas por Endonucleasas de Restricción | | | | | |
|------------------|-------------|---|------|--------|------|----------------|--------------|
| | | AluI | NboI | HaeIII | DdeI | HinfI | RsaI |
| 1 | +++ | +++ | - | +++ | +++ | gap(2) -(1) | +++ |
| 2 | + | - | + | - | - | - | + |
| 3 | + | +(2) -(3) | + | - | + | +(1) -(2) | - |
| 4 | + | +(1) -(3) | - | - | - | - | - |
| 5 | + | + | + | - | - | - | - |
| 6 | + | - | - | - | - | - | - |
| 7 | + | + | + | - | - | - | + |
| 8 | + | - | + | - | - | - | +(1) -(1) |
| 9 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | gap(2) -(1) | + |
| 10 | + | +(2) -(3) | + | - | - | - | - |
| 11 | + | - | - | - | - | - | + |
| 12 | + | - | + | - | - | - | - |
| 13 | ++ | ++(3) +(2) | + | - | + | - | - |
| 14 | ++ | +(2) | + | - | - | - | - |
| 15 | ++ | ++ | + | + | + | - | - |
| 16 | +++ | +++ | + | +++ | ++ | gap | +++ |
| 17 | + | - | - | - | - | - | + |
| 18 | + | - | + | - | - | - | - |
| 19 | + | - | - | - | - | - | +(1) -(1) |
| 20 | + | ++ | + | - | - | - | ++ |
| 21 | + | + | + | + | + | - | - |
| 22 | + | - | - | - | - | - | + |
| X | + | - | - | - | - | - | - |
| Y | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | - | - |

- +++ = región grande.
- ++ = región mediana.
- + = región pequeña.
- = ausencia de región.
- gap = región no teñida en área paracentromérica.
- () = número de individuos que presentan o no bandas inducidas por endonucleasas de restricción en el mismo cromosoma para una enzima determinada.

entendido. Espero, para la formación del eosinato de azufre es preciso una tinción magenta y la producción de éste se puede ajustar con la concentración de los colorantes y el pH (126). Se ha establecido que hay una estrecha relación entre las regiones G-11 positivas y las regiones que contienen DNA sat III (123).

La presencia de algunos individuos que carecen completamente de la región C del cromosoma 9, revelado con bandas G-11, comprueba la posibilidad de ser tolerada sin afectar el fenotipo (199). También, individuos con una gran banda extra en el cromosoma 9 pueden presentar dos entidades distintas, con una banda no teñible en medio de la región sin efecto alguno (200).

La subestructura de la región C del cromosoma 9 con bandas G-11 a menudo exhibe un bloque muy distal con respecto al cen. La examinación de IP muestra una posición teñida no usual en los brazos largos y ninguna en los cortos, por lo que no son verdaderas inversiones. Además la asimetría lateral de HC C sólo se presenta en aquellos cromosomas que contienen bloques grandes G positivo. La porción C que corresponde al material G-11 positivo no revela un patrón constante de asimetría, por lo que en ciertos cromosomas un bloque de HC G-11 a menudo rota 180° en relación a otros bloques G-11 de la misma banda C (106).

Una gran variedad de fluorocromos (colorantes fluorescentes) han sido empleados para teñir cromosomas, los cuales dan patrones de bandeado característicos. Los fluorocromos primarios como Hoechst 33258, DBP (2, 7-di-t-butil proflavina), DAPI y DIPI son agentes afines a las secuencias AT y revelan bandas similares a las QPQ o H. Pero otros, llamados DNA ligandos, como olivomicina, cromomicina A3 y nitramicina, son afines a las secuencias GC y

exhiben bandas tipo RFA. Estos, cuando se usan independientemente producen bandas poco diferenciadas. Pero diferentes combinaciones de uno de cada grupo inducen o aumentan tal diferenciación. Esto se logra por un baneo competitivo de cada uno de los ligandos y/o un mecanismo de transferencia de energía (26,123).

Las Bandas H vistas en los cromosomas teñidos por DAPI aparentemente reflejan áreas con cantidades diferentes de AT. DA es otro ligando con afinidad por AT que se une al surco menor del DNA. Así, la fluorescencia diferencial DA/DAPI tal vez exhibe interacciones entre los 2 colorantes con preferencia por pb similares. Al parecer los sitios de unión DAPI son bloqueados por DA en regiones de EC, mientras algunos sitios en las regiones de HC quedan disponibles para DAPI (26,123). Además, es posible observar una fluorescencia simultánea de bandas R y DA/DAPI que revela regiones de HC C (cromocina A-DA/DAPI) (201).

Los cromosomas teñidos con DAPI muestran fluorescencia brillante en las regiones 1qh y 16qh y un patrón complementario de bandas tipo QFQ. Si éstos se exponen luego a colorantes no fluorescentes como DA, exhiben especialmente las regiones de HC de los cromosomas 1, 9 y 16, la región proximal de los brazos cortos del cromosoma 15 y Yq distal (26,34,123).

Se ha visto que existen 3 tipos de IP de 9qh teñidas con DA/DAPI: a) aquéllas en las que la región C flouresce sólo en los brazos largos, b) aquéllas en las que la región C flouresce sólo en los brazos cortos y c) aquéllas en las que la región C flouresce en ambos brazos. Por hibridación in situ también se observa un contenido diferencial de DNA sat en cada tipo de IP, donde los tipos a y b tienen cantidades similares, mientras que el tipo c contiene casi el doble que su homólogo. Al parecer DA/DAPI tiñe específicamente HC que contiene DNA sat (202). Asimismo, es posible evaluar el HM 15p por DA/DAPI siguiendo el mismo criterio de clasificación que se da para bandas QFQ (Tabla 9). A pesar de que el PM 15p no es siempre positivo con esta técnica, el grado de HM es mucho mayor de lo que revelan otras técnicas ya que su intensidad es independiente del tamaño (203).

La variación de la intensidad DA/DAPI en la banda Yq12

exhibe 3 clases distintas de HC C. Una muy constante (Yq11.23) no descondensa cuando se expone a DA mostrando una fluorescencia pálida con bandas Q, C positiva y brillante con DA/DAPI. Las otras dos clases están en la banda Yq12. Ambas muestran una descondensación con DA, brillantez con bandas Q y una banda C positiva. Una de ellas es brillante y la otra pálida con DA/DAPI; el tamaño y la intensidad de ambas es variable. Estos resultados indican que hay una alta heterogeneidad de secuencias en la región de HC C del cromosoma Y (204).

El empleo de patrones de replicación tardía y fluorocromos también permite la visualización de los HM C. Esta técnica es referida como Bandas LBA (bandas de replicación tardía por Brdu y tinción con NA) y se basa en un criterio de clasificación similar al de las bandas Q (Tabla 24). Pese a que las bandas LBA revelan principalmente el tamaño y la intensidad de fluorescencia de los cen, brazos cortos y satélites de los cromosomas acrocéntricos, son evidenciadas también regiones tipo C (78). En realidad, los segmentos de replicación tardía de los cromosomas corresponden a la intensidad de fluorescencia de las bandas LBA (205).

Tabla 24. Clasificación por Tamaño e Intensidad de Fluorescencia de los HM C de los Acrocéntricos con Bandas LBA (78).

| Intensidad | Tamaño de Brazos "p" | Tamaño de Satélites |
|-------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| 1. Negativo | Muy pequeño (ausente) | Muy pequeño (ausente) |
| 2. Pálido (1q) | Pequeño ($\leq 0.25 \times 18p$) | Pequeño (raro) |
| 3. Medio (9q) | Intermedio ($\leq 0.5 \times 18p$) | Intermedio ($\leq 0.25 \times 18p$) |
| 4. Intenso (13q) | Grande ($\leq 1.0 \times 18p$) | Grande ($\leq 0.5 \times 18p$) |
| 5. Brillante (Yq) | Muy grande ($> 18p$) | Muy grande ($> 0.5 \times 18p$) |

En un estudio, los cromosomas acrocéntricos fueron examinados y comparados con el patrón de bandas QFQ. Un total de 41 PM C se detectaron: 28 de ellos con bandas LBA (11 en brazos cortos y 17 en cen) y 7, incluyendo 4 de éstos en los satélites, se observaron con bandas QFQ. Seis Var fueron determinadas por ambos métodos. Aunque las bandas QFQ son más efectivas en la detección de Var satélites, el empleo de bandas LBA parece ser

más útil en la detección de cen y brazos cortos de acrocéntricos (205). Asimismo, las Var 1qh, 9qh y 16qh se clasificaron en 5 niveles de acuerdo a su intensidad de fluorescencia. Se encontraron 15 PM y el tamaño de las regiones qh parece decrecer en relación al aumento del tamaño cromosómico. Además, -50% de los autosomas restantes (por ejemplo 2, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 17, 18, 19 y 20) tuvieron un PM (206).

En otro trabajo, el tamaño de la HC centromérica de los cromosomas 2, 5-8, 10-12 y 17-20 fue medido por microdensitometría y evaluado con bandas LBA. Se observaron 87 PM y el tamaño relativo de la HC centromérica de cada par fue: 3.2, 4.6, 8.2, 8.5, 5.4, 5.3, 5.5, 5.6, 9.6, 7.5, 12.4 y 11.2%, respectivamente (207). Así también fueron evaluadas las regiones qh de los cromosomas 1, 9 y 16 y los brazos cortos de los acrocéntricos. Las regiones qh tuvieron una frecuencia de 14.4%, 19.3% y 20.8%, respectivamente. En el cromosoma 13 (7.0-19.6%), 5 estuvieron en la clase 2, 15 en la 3, 3 en la 4 y 1 en la 5. Para los cromosomas 14, 15, 21 y 22 se detectaron 11, 7, 10 y 10 PM, respectivamente. Además, las regiones 3cen y 4cen mostraron 8 y 9 HM, respectivamente (118).

En conclusión, la presencia de HM C en los cromosomas humanos revela una amplia distribución de secuencias satélite y otras altamente repetitivas entremezcladas unas con otras. Esto conlleva al uso combinado de técnicas de tinción selectiva y biología molecular para una mejor caracterización y un mayor entendimiento de su naturaleza.

E. ESTUDIOS FAMILIARES Y SEGREGACION DE LOS HETEROMORFISMOS.

La existencia de los HM C en individuos normales permite que estos se distribuyan en las generaciones subsecuentes. Un gran número de trabajos familiares señalan que estos se heredan en forma Mendeliana simple y que un entrecruzamiento meiótico ocurre en o adyacente a la región C (88,99). Sin embargo, otros estudios informan que no siempre se segregan al azar y que existe una segregación preferencial. Además, ciertos sujetos presentan Var de novo y aún mosaicismo somático (91).

Palmer y Schroeder reportaron un familia de 3 generaciones, en donde 12 miembros presentaron una Var del cromosoma 9 con un radio de segregación de 1:1. Empero, se asume la posibilidad de una segregación preferencial en los oocitos de la abuela portadora (208). Otro trabajo indicó que generalmente la región 9qh+ es producto de una duplicación de la HC y de replicación temprana. Este PM tuvo un radio de 25:10, el cual difería significativamente del esperado. Un disturbio en la segregación a favor de este PM es postulado nuevamente (209).

Otros trabajos familiares en recién nacidos señalan que la cantidad de HC C del cromosoma Y es heredada de manera constante; no obstante, no incluyen mediciones precisas de tal región (91). McKenzie y cols. evaluaron la longitud del cromosoma Y y encontraron que ésta es altamente heredable, pero variable de una familia a otra, principalmente para la región C (210). También, Beltran y cols. observaron que en varios descendientes existe una alta heterogeneidad entre las regiones de EC y de HC del cromosoma Y (211). Asimismo, se estimaron las longitudes qh de los cromosomas 1, 9 y 16 por medio una regresión lineal de las mediciones de EC y HC. No hubo DES de estas regiones entre los descendientes y los padres. Sin embargo, existe una fuerte tendencia de los primeros en poseer cromosomas más pequeños que en los adultos (212).

Por otra parte, en la heredabilidad de los PM QPQ, se encontró que 8 cromosomas distintos eran estables, heredables y tenían un radio de segregación en cada progenie de 1:1 (213). Con bandas CBG, se observó la herencia de 14 PM distintos, con más variabilidad y presentes en 90% de las células. Aunque los PM fueron observados en la región 3cen, regiones centroméricas y satélites de los acrocéntricos, no hubo una correlación entre las bandas Q y las bandas C (214).

En 10 segregaciones de 5 árboles genealógicos, un total de 99 Var se identificaron y se dividieron en 3 tipos: 1) Var heredadas (85 individuos), 2) Var nuevas (7 casos) y 3) Var alteradas (7 personas). Sólo se encontró 3% de mosaicismo. Aunque estos valores no revelan la frecuencia estimada por falta de medidas cuantitativas, si reflejan un patrón hereditario clásico.

Además, la presencia de los dos últimos tipos de Var sugiere que rearrreglos ocurrieron durante el entrecruzamiento meiótico (215).

Asimismo, un grupo de 32 familias reveló que 29 tuvieron uno o más apareamientos informativos por lo menos en un cromosoma. El cromosoma 1 tuvo un radio de 0.497 y el 16 de 0.54. En cambio, la mayoría de las regiones 9qh+ tuvieron una segregación preferencial (216). En otro estudio, 22 individuos revelaron PM en uno o ambos cromosomas 1, 9 o 16: 10 mostraron 1qh-, 2 1qh+, 5 9qh-, 3 9qh+, uno 16qh- y 6 16qh+. No hubo una DES en la segregación, pero la región 9qh+ tuvo una segregación preferencial en 15 de 20 individuos (217). Se sugiere que este imbalance podría explicarse por un efecto adverso del marcador sobre su homólogo, generando gametos no viables, tal y como ocurre en Drosophila sp. (209).

Simi y Tursi (218) evaluaron las longitudes qh de los cromosomas 1, 9, 16 e Y. Estas se transmitieron en 63 de los 67 casos y revelaron una DES con respecto a la longitud incrementada del segmento C. Además, se encontró una discrepancia entre la longitud 9qh del progenitor y aquella del descendiente, por lo que se especula que haya ocurrido un rearrreglo meiótico del segmento C. Otro reporte (219) indicó una distribución y una segregación de los PM en forma normal. De las 204 Var estudiadas, 200 fueron heredadas y sólo 4 (1.96%) fueron nuevas. Además, 11 individuos (2.35%) presentaron mosaicismo. También, se propone un entrecruzamiento desigual como mecanismo para generar Var de novo.

Se reportaron 3 familias con una Var diferente, sin alguna patología y con un segmento extra en el cromosoma 9 (banda 9p12). Esta revela una intensidad media con Bandas GTL (bandas G con tripsina y tinción con Leishman) y RBC, C negativa y positiva con Feulgen. Ha sido observada en células neoplásicas y al parecer es una región de EC que contiene rDNA. La hibridación in situ con el genoma total, DNA satélite a, DNA sat III y rDNA produjo en todas reacción negativa. Debido a que 2 miembros han heredado una Var de tamaño menor, se sugiere que las Var 9p12 son regiones homogéneamente teñidas o HSR [hsr(9)(p12)] (125) y que una amplificación ocurrió in vivo en las células normales (220).

Por otro lado, la segregación de los FM también se ha demostrado por estudios en gemelos. Van Dyke y cols. evaluaron las Var en gemelos monocigotos (GMC) y dicigotos (GDC) por bandas QPQ y CBG. No hubo DES en la frecuencia entre los GMC; empero, entre los GDC hubo discordancias en 5 regiones polimórficas (1qh, 3cen, 4cen, 13p y 22p). De 17 GDC, 12 de ellos tuvieron cariotipos distintos, mientras que en todos los GMC las Var fueron estables y heredables (221).

En otro estudio, las regiones C de los cromosomas 1, 9 y 16 de 16 GMC y 16 GDC del mismo sexo, mostraron concordancia solamente en los primeros (0.64, 0.73 y 0.40%, respectivamente). Aunque se esperaría una transmisión regular de los FM, factores como fallas metodológicas, variaciones de condensación y entrecruzamiento desigual son propuestos como posibles causas (222). Asimismo, por FM C QPQ en 24 gemelos, solamente 16 de éstos fueron confirmados como GMC. La concordancia media (0.56) indicó una DES ($P > 0.001$), por lo que cada grupo tuvo su propio patrón de segregación clásico (223).

En conclusión, la presencia de FM C en estudios familiares demuestra que son segregados en forma mendeliana, aunque algunas Var pueden surgir de novo. No obstante, una segregación preferencial de la región 9qh+ es muy evidente. Por otra parte, la presencia de mosaicismo en ciertos individuos indica que eventos de mal apareamiento ocurren tanto en células somáticas como en meióticas. Asimismo, la concordancia de FM en casi 100% de los GMC es bien conocida.

F. DISTRIBUCION DE LOS POLIMORFISMOS EN POBLACIONES HUMANAS.

La incidencia de los FM C tiene una amplia distribución en las poblaciones humanas. A través del tiempo, estos marcadores se han diversificado a partir de un ancestro común debido a una selección natural. Pese a los inconvenientes de los métodos de evaluación, algunos estudios han establecido un análisis comparativo entre los diferentes grupos raciales. Varios trabajos han determinado la longitud del segmento C de los cromosomas 1, 9, 16 e Y por análisis cuantitativos, como el de Podugolnikova y

Korostelev que demuestran que los PM C en la mayoría de las poblaciones normales tiene una elevada heterogeneidad (224).

Así, estudios esporádicos se han realizado para establecer el tipo y frecuencia de una población particular. En una muestra poblacional en Estonia, 51 mujeres y 52 hombres tuvieron 45% y 50% de Var autosómicas, respectivamente. Las más evidentes fueron 1qh+, 9qh+, 16qh+, 17ph+, Dp+ y Gp+. Si se toma en cuenta que 5 hombres tuvieron un PM Yqh (9.5%), la frecuencia de PM del sexo masculino aumenta ligeramente 51.9% (146).

En una población americana, la distribución de los PM C abarcó un total de 391 HM y un promedio de 5 por sujeto. Las 225 Var Q se distribuyeron en 76 individuos y con 3 Var por persona. Las más frecuentes fueron en 3cen, 4cen (ambos con 40.9%) y en 13p y/o 13s (46.8%), que juntos comprenden -90%. Las Var C se distribuyeron en todos los cen y qh. Para el cromosoma 1 (8.5%) hubo 6 1qh+ y 7 1qh-, para el 9 (15.6%) hubo 11 9qh+, 7 9qh- y 6 inv(9) y para el 16 (16.9%) hubo 8 16qh+ y 18 16qh-. Las Var centroméricas se hallaron en 73 sujetos con 1 por persona. Únicamente 36 satélites fueron positivos (3.4%). Si se excluyen las Var Yqh, no existe una DES entre sexos y sin una correlación entre los PM C QPQ y CBG; empero, la combinación de estas técnicas provee una mayor información (225).

En otra muestra, 376 neonatos presentaron 1.6, 10.7 y 1.4% de Var C en los cromosomas 1, 9 y 16, respectivamente. Solamente 0.6% tuvieron una inv(9). La proporción de HM del grupo C fue de 1%, excepto para los cromosomas 7 (10%) y 11 (13%). Las Var Q 3cen y 4cen tuvieron una tasa de 55% y 13%, respectivamente. La Var 13 con nivel 5 tuvo la mayor frecuencia (74%), seguido por los HM 14 y 15 con -2.5% cada uno. Hubo una DES con nivel 5 entre 22p (34%) y 22s (28%) a comparación de 21p (2.6%) y 21s (17%). La distribución de estos PM C se comporta de acuerdo a la ley de Hardy-Weinberg, a excepción de la de los cromosomas 13 y 22 (169).

En 3 poblaciones escocesas, los PM C de las regiones 1qh y 9qh no mostraron DES entre ellas. Una tasa elevada de 16qh fue observada en todas las poblaciones. Además, existió una menor frecuencia de inv(1) parcial en una de las poblaciones y una

mayor incidencia de inv(9) parcial en otra. En promedio, las frecuencias de los niveles brillante e intenso fueron 4.17%, 3.9% y 2.9% para cada población. No hubo DES entre los sexos, aunque la observación de los FM fluorescentes fue subjetiva (226).

En 200 neonatos de Nueva Delhi, las regiones C tradicionales mostraron que la moda de 1qh, 9qh y 16qh correspondió a los niveles 2, 2 y 3, respectivamente, en ambos sexos. Se presume que existe una frecuencia muy baja de HM comparada con la de otras poblaciones, principalmente del segmento 9qh. Esto confirma una variación étnica/racial y geográfica de los HM C, a pesar de emplear diferentes metodologías en cada estudio (227).

En México, fue evaluada la distribución qh de los cromosomas 1, 9, 16 e Y por dos métodos de cuantificación. Las curvas de distribución fueron muy cercanas a la normal, muy similares con las reportadas en otros grupos étnicos y con muy poca variabilidad racial. El CV del área fue mayor (23.7-25.6%) que el del largo (13.6-15.5%) y la medición de la primera discrimina mejor las variaciones de menor tamaño. Aunque el método de medición del área es más complicado y requiere de mayor tiempo que el de la cuantificación del largo, el primero determina con más exactitud el tamaño de los segmentos C (228).

Asimismo, dos estudios comparativos en las poblaciones blanca y negra con bandas Q y C fueron realizados. El primero, registró una tasa elevada de HM C en negros, principalmente en los cromosomas del grupo C (175). En el segundo, fueron más frecuentes los HM QPQ en negros, con un promedio de 7 FM por sujeto y de un nivel brillante o intenso (cromosomas 3, 13 y 22). Los HM de los cromosomas 4, 8 y 19 fueron menos frecuentes, pero más comunes en negros; el HM Xcen+ fue más común en blancos. Además, la inv(9) total fue más común en negros, mientras que la inv(1) parcial lo fue en blancos (229).

En 80 negros americanos se evaluó el tamaño y tipo de IP de las regiones qh (CBG) y se compararon con los de una población blanca. Las frecuencias de los HM 1qh (10.63%) y 16qh (6.88%) son similares a las reportadas en la población blanca (11.3% y 7.5%, respectivamente). Sin embargo, hubo una mayor incidencia de 9qh

(47.5%) en blancos que en negros (30.0%). Las tasa de IP de los cromosomas 1 (17.5%), 9 (21.9%) y 16 (0.0%) en negros fue mayor que la de los blancos (10.0%, 11.25% y 0.0%, respectivamente). Además, hubo una correlación entre el incremento de tamaño de la región qh con la frecuencia de IP ($P < 0.01$). Se concluye que existen diferencias raciales entre el tamaño de los HM del cromosoma 9 e IP de los cromosomas 1 y 9 (173,230).

Con respecto al cromosoma Y, 3,183 caucásicos de diferente origen europeo se analizaron para determinar su longitud. Se reporta una tasa del Yqh+ de 1.0% en la población protestante, 2.6% en la católica y 3.6% en la judía. Aunque 45% de la católica era italiana, 80% de los sujetos con un Y largo descienden de familias italianas. Puesto que la mayor frecuencia de Yqh+ se encontró en individuos de origen judío, italiano y español y la más baja en personas del norte de Europa, parece ser que el cromosoma Y largo tuvo su origen en el Mediterráneo y luego divergió gradualmente hacia el norte de Europa (231).

En 60 caucásicos se determinó la longitud de Yq a partir del índice Y/F y se clasificaron en 5 categorías. Las frecuencias de éstas fueron 0.0, 15.0, 66.7, 13.3 y 5.0%, respectivamente. El rango promedio del cromosoma Y fue de 0.9-1.09. Además, la variación se presentó tanto en el segmento fluorescente como en el no-fluorescente. Ninguna relación se halló entre los dos segmentos evidenciados por la técnica QFQ (232).

Por densitometría se evaluaron los segmentos C de los cromosomas 1, 9 e 16 de una población indígena y de una caucásica del Brasil. No se presentó variabilidad intra e interpoblacional, aunque los caucásicos tuvieron los promedios más bajos. Las frecuencias relativas fueron similares en ambos grupos (40.7%, 34.5% y 24.8% contra 40.9%, 34.2% y 25.0%, respectivamente). En los caucásicos, las frecuencias de las regiones 1qh (6%) y 9ph (9%) fueron mayores, comparadas con 2% de ambas regiones en indígenas (233). No obstante, al evaluar la región Yqh existió una DES intrapoblacional (0.81-1.32) en indígenas, pero no hubo una correlación sorprendente entre Yqh y las regiones 1qh y 16qh. Por lo anterior, tal vez la variabilidad C pueda estar sujeta a efectos intercromosómicos de naturaleza desconocida (234).

Otro trabajo similar fue realizado en caucásicos y japoneses. El primer grupo tuvo los segmentos 1qh, 9qh y 16qh relativamente más grandes. Pese a una mayor presencia de IP parciales en caucásicos, y correspondiente al aumento de tamaño de la región qh, el único FM diferente fue el del cromosoma 9. No obstante, el HM Yqh de los japoneses tuvo una gran DES con respecto al de los caucásicos. Los valores totales de la HC C no mostraron DES, aun entre sexos, de ambos grupos raciales (235).

Por otro lado, algunos estudios en poblaciones japonesas muestran que la incidencia de Var Q media individual es de 3.83 ± 1.86 . Una tasa baja de 3cent+ y una alta de Yqh+ en varones, parece ser característica de la población. La longitud promedio de Yq registra un índice (Yq/21p) de 1.56 ± 0.25 . La banda Yq11 es casi constante (pálida) y la banda Yq12 variable (brillante). Además, la banda 13p11 es más frecuente (44.8%) que la banda p13 (satélites) de los cromosomas 14, 15 y 21 (236). Por otra parte, 9 Var de los grupos D y G fueron analizadas y se encontraron 4 dobles Ag-NOR en los brazos cortos (p++): dos del cromosoma 22, uno del 13 y el otro del 14 y otros 4 HM presentaron solamente una Ag-NOR positiva: 2 fueron 15s+, uno 22s+ y otro 15p+. En este estudio el cromosoma 14 no tuvo material Ag-NOR, el cual demuestra que la cantidad Ag-NOR no siempre se correlaciona con el tamaño Q o C positivo. Tal vez dos mecanismos originen estas Var: por duplicación (brazos cortos o satélites) o por inserción de un NOR positivo y satélites de un acrocéntrico donador (237).

En 3 poblaciones mongólicas y 3 de Highland Kirghiz (URSS) los FM QPQ de 7 autosomas (3, 4, 13-15, 21 y 22) no mostraron DES en las frecuencias internas y distribuciones. Pero el análisis comparativo reveló una DES en: 1) el promedio de HM por individuo (3.49 y 2.50, respectivamente), 2) la mayoría de las Var halladas en los cromosomas 3 y 13 de ambas poblaciones. Hubo una inv(3) con -5.8% y -0.3%, respectivamente y 3) la distribución de homomorfismos y HM en 4 pares (13-15 y 21), con una tasa mayor en los mongoles (-/-) que en las poblaciones de las tierras altas. Tal vez HC C asuma un carácter selectivo en la adaptación de las poblaciones humanas a climas extremos (altitud) y en la presencia de heterogeneidad intrarracial en los mongoles que viven en diferentes zonas ecológicas (238). Empero, con bandas

CBG el tamaño de los segmentos qh tradicionales entre estos grupos étnicos, no exhibió DES en sus frecuencias. Por lo que se sugiere, contrariamente, que la HC C no tiene un significado en el proceso de adaptación de estas poblaciones humanas (239).

Por último, un gran estudio poblacional, de los principales FN C, fue realizado. Se contemplaron 4 grupos étnicos (6,250 sujetos): 2,334 (37.3%) descendientes de europeos, 1,795 (28.7%) de negros americanos, 1,737 (27.8%) de hispanos y 384 (6.1%) de asiáticos (orientales e indios). El análisis confirmó que: 1) la frecuencia de inv(9) es mayor en negros (3.57%), ligeramente elevada en hispanos (2.42%) y baja en blancos (0.73%) y asiáticos (0.26%), 2) el cromosoma Y parece ser más variable en asiáticos (3.37%) e hispanos (1.82%) que en blancos o negros y 3) el FN 9qh+ es el más frecuente, seguido de 1qh+ y 16qh+. Los FN con inv(1), 9qh- y 16qh- son raros, sin presentarse casos de 1qh- y de inv(16). En general, existe una ligera discrepancia entre cromosomas Y largos (0.67%) y cortos (0.57%), sin que sea significativa entre los grupos. Los datos confirman que estas Var tienen una distribución particular en cada población examinada (240).

V. POLIMORFISMOS CROMOSOMICOS Y SU RELACION CON LA GENETICA CLINICA.

A. APLICACIONES.

El empleo de las diferentes metodologías que identifican las regiones polimórficas de cualquier individuo, constituye una herramienta muy útil en el área de la genética clínica. Ya que estos HM se heredan en forma clásica, son estables y con una tasa mutacional baja, son utilizados como marcadores citogenéticos para rastrear su segregación entre los descendientes y poder establecer su parentesco. En muchos casos, la variación entre ellos es discontinua y permite la identificación individual de cualquier sujeto dentro del linaje (89,133,134,136).

Con el uso estos marcadores, es posible identificar el origen de cromosomas adicionales. Tal es el caso del cromosoma 21 extra en individuos con Síndrome de Down, así como de otras polisomias. De igual manera, se ha estudiado el posible mecanismo productor de las triploidias en abortos y el origen de la dotación génica en otras poliploidias (89,134,136).

El uso de marcadores bioquímicos ha sido importante para los estudios de ligamiento génico. Espero, si éstos se emplean junto con los FM C, la información generada se incrementa. Esto tiene gran valor para los estudios de mapeo que implican herencias mendelianas atípicas. La localización de un HM es muy importante ya que proporciona datos sumamente útiles para regiones del genoma con pocos loci mapeados. Por ejemplo, hace unos años había solamente dos loci confirmados en el cromosoma 3, adyacentes a la banda heterocromática. Esto es, porque cuando se establece un ligamiento con Var, automáticamente se asigna el locus. Tal es el caso de la asignación del primer locus autosómico (grupo sanguíneo Duffy) a la región 1qh. También, estas Var se emplean para ordenar loci relacionados al cen y para detectar rearrreglos cromosómicos que pudieran afectar el ligamiento (136,241).

Los HM C han sido usados en el diagnóstico prenatal para distinguir los cariotipos materno y fetal y para detectar una

posible contaminación de células maternas a partir de cultivos de líquido amniótico (89,136). También han sido utilizados como una prueba más en casos de disputa de paternidad. Es importante recalcar que esta prueba más que confirmar descarta la paternidad del individuo, con una confiabilidad de -99.0% (242).

Otras aplicaciones han sido el estudio de los mecanismos cromosómicos que intervienen en la producción de mosaicos, fusión de embriones o quimerismo, cromosomopatías en retinoblastomas, origen de teratomas de ovario y en el seguimiento de células transfundidas o transplantadas. Actualmente, se han aplicado en pruebas de cigocidad en gemelos y otros nacimientos múltiples. Finalmente, pueden ser empleados en el mapeo genético a partir de células somáticas híbridas (89,134,136).

B. SIGNIFICADO CLINICO.

Se ha visto que la HC C tiene características, muchas veces excepcionales, que la hacen ser difícilmente comprensible. Su gran variabilidad es quizá la cualidad más notoria, no sólo desde el punto de vista evolutivo, sino también clínico. Aunque su o sus posibles funciones no se han dilucidado, varias hipótesis han sido propuestas y se discute la idea de que sus secuencias no repercuten en el fenotipo y no tienen alguna función específica, "viviendo simbióticamente como un parásito en el genoma" (92).

Aunque a los FM C se les consideraba sin ningún significado clínico, en los últimos años reportes en la literatura señalan que estas Var se asocian con el desarrollo anormal del individuo. Espero, las conclusiones son controversiales y los mecanismos no son muy claros. Cuando se comparan diferentes grupos, la metodología, los parámetros, las variaciones étnicas y las vías de evaluación impiden un buen análisis estadístico. Varios de estos estudios son descritos a continuación.

1. Aneuploidías. Las primeras averiguaciones se realizaron a partir de trabajos en donde contemplaron pacientes con diferentes tipos de aneuploidías tales como Síndrome de Down, trisomía 13 y 18, monosomía X y otras polisomias. Más tarde, se asumió que

estos rasgos desbalanceados se asociaban con la HC de los cromosomas adicionales (243). La presencia de algunas Var (como 15p+) aparentemente elevan el riesgo de aneuploidía, tal vez por interacciones no específicas de la HC de varios cromosomas (92).

Nielsen y cols. informaron una frecuencia elevada de 9qh+ en padres (3.5%) y parientes (2.8%) de niños con aberraciones cromosómicas, a diferencia de la población normal (0.1%). Este FM probablemente representa una duplicación de la HC que pudiera dar un alto riesgo de anomalías cromosómicas en la progenie (244). Holbek y cols. también hallaron una mayor frecuencia de 1qh+ y 9qh+ en padres de productos abortados con cromosopatías que en padres con descendientes normales. Empero, los NM de acrocéntricos mostraron frecuencias contrarias (245).

Al comparar casos de Síndrome de Down y controles con retraso mental (RM), la HC de los cromosomas 1, 9, 16 e Y no revela alguna asociación entre los dos grupos, así como una no disyunción del cromosoma 21 (246). No obstante, un estudio de recién nacidos (93 con Síndrome de Down y 171 de pacientes con múltiples malformaciones y/o RM) mostró una distribución normal en el tamaño de las regiones 1qh y 9qh y una mayor frecuencia de HC sobre 9p en el último grupo (247). En otros dos grupos, con las mismas características, los resultados mostraron una correlación entre la longitud qh y las características antropométricas. Ambos reportes sugieren que las regiones de HC C ejercen alguna influencia en ciertos estadios del desarrollo embrionario, producto de un desbalance cromosómico (248).

En un trabajo, con el uso AluI en de 5 casos con Síndrome de Edwards, la HC centromérica mostró 4 personas heterocigotas para los 3 cromosomas 18. Además, se encontró predominio de una región grande o muy grande de HC C, lo cual asume que ésta podría tener una función importante en el proceso de la no disyunción (190).

Algunas evidencias señalan una tasa elevada de Gp+ en sujetos con Síndrome de Down, debido a una expresión aumentada de las NOR en el cromosoma 21 (74,91,92). Empero, personas con acrocéntricos NOR positivos tienen una mejor prognosis, que aquéllos con NOR negativos (74). También, se ha reportado una

alta frecuencia del PM 9qh en pacientes con trisomía 9 parcial o completa, así como un 22p+ en la trisomía 22 (92).

2. Anomalías en el desarrollo. Se ha sugerido una relación entre HM C y malformaciones congénitas (91,92). Gardner y cols. asumen que portadores de un 1qh+ podrían tener hijos con Síndrome de Meckel (249). Kunze y Mau reportaron que de 23 pacientes malformados con HM, todos presentaron por lo menos un HM C, mientras que en 25 controles se halló solamente una Var (250). Halbrecht y Shabtay hallaron una tasa elevada de PM de acrocéntricos (en especial del cromosoma 21) que pudieran relacionarse con disturbios en el desarrollo del sistema nervioso central. Además, la presencia de cada PM parecería incrementar el riesgo de no disyunción y descendientes con malformaciones congénitas (251). Sin embargo, en otro grupo la presencia de PM no resultó significativa. Se desconoce la causa del efecto fenotípico y si la presencia de estas Var es producto sólo de la incidencia racial (252).

Por otro lado, Nielsen y cols (1981) investigaron 11,148 recién nacidos y encontraron una mayor frecuencia de Yqh- (45.5%) en niños con defectos congénitos (icterus y eritroblastosis fetal) que en normales (25.8%), así como Var autosómicas (10.6%) y Yqh+ (14.0%) en niños con bajo peso al nacimiento, en comparación con los normales (4.0%) (253). También, Podugolnikova y Blumina (1983) mostraron que 100 niños con embriopatías de etiología desconocida tenían un PM de los cromosomas 1, 9, 16 e Y. Esto haría suponer que también un decremento en la cantidad de HC podría afectar el proceso normal de morfogénesis (254).

En 6,691 recién nacidos, 2.6% presentaron un Y largo, pero sin DES en la frecuencia de malformaciones y peso al nacimiento. No obstante, un incremento significativo en la estimulación de prostaglandinas se halló en las madres de los portadores Yqh+. Aunque el efecto es desconocido, aparentemente hay un cierto riesgo de problemas al nacimiento en niños con un Y grande (255).

3. Retraso mental. Algunos estudios revelan una correlación entre PM C e individuos con coeficiente intelectual (CI) bajo (90,91). En uno de ellos, los resultados mostraron 6 Var por

paciente, la mayoría observadas en negros. Entre éstas, $1qh-$ o $1qh+$ mostraron una DES entre niños con CI bajo (19%) y niños control (5%). Similarmente, variaciones de la región qh fueron más comunes en niños con bajo peso al nacimiento (256).

En otros trabajos, las frecuencias de $16qh+$ y de $1qh+$ fueron 0.12 y 0.08%, respectivamente, comparadas con 0.1 y 0.04% en la población normal. En ambos grupos no se encontró asociación entre estos FM y RM (257,258). Asimismo, la frecuencia de una $inv(3)$ fue la misma en personas con RM y personas normales. Esto conlleva a que la $inv(3)$ no se asocia con el RM (259). Los RM de los cromosomas 1, 9 y 16 de diferentes grupos raciales con CI bajo exhibieron diferencias en su distribución. Los orientales tuvieron con más frecuencia $1qh+$, $9qh-$ e IP que otros grupos, mientras que para los caucásicos el $9qh+$ fue el más frecuente. No obstante, no se hallaron DES entre los diferentes grupos, ni entre los diversos grados de RM (260).

Asimismo, los FM C de pacientes con CI bajo se compararon con individuos control. Se observó una mayor frecuencia de $9qh+$ en los primeros y un $9qh-$ en el grupo control. Se sugiere la posibilidad de algún efecto negativo de estas Var sobre el fenotipo, en combinación con otros factores (261). También, se encontró una mayor frecuencia de RM del cromosoma 4 (41.6%) en pacientes con esquizofrenia, RM, hiperactividad y retraso en el desarrollo que en individuos normales (8%). Esto indica un posible efecto adverso de esta Var sobre los portadores (130).

La existencia de algunos FM C en ciertos individuos con RM es relativamente común. No obstante, una evaluación más precisa de estas regiones se requiere para un análisis adecuado.

4. Conducta antisocial. El FM de la región heterocromática del cromosoma Y es uno de los más estudiados y más controversiales. Varias asociaciones se han hecho con respecto con alguna patología. Por ejemplo, se ha establecido una relación entre un Y largo y conducta antisocial, en especial con criminalidad. Aunque los resultados son confusos, se espera que estudios futuros amplíen el conocimiento sobre esta asociación y otros posibles efectos fenotípicos.

Al comparar la longitud del cromosoma Y entre recién nacidos y criminales, una distribución normal fue observada en ambos grupos, aunque la longitud media fue mayor en el segundo grupo ($P < 0.001$). Se presume una correlación entre el tamaño de la región Yqh y el riesgo de criminalidad (262). En otro trabajo, el cromosoma Y fue medido y comparado entre prisioneros e individuos normales. Los resultados revelaron una DES ($P < 0.025$) en la frecuencia de un Y largo entre los dos grupos. Además, tanto el fragmento fluorescente como el no fluorescente de Yq estuvieron implicados en la variación de sus longitudes (263).

Sin embargo, otros estudios han reportado lo contrario. Por ejemplo, Benezech y cols. examinaron la longitud del cromosoma Y entre criminales y personas sanas. La distribución normal de ambas poblaciones no indicó DES entre el promedio de Y/F, los valores Y-fluorescentes/Y y el número de estos segmentos fluorescentes. No existe una relación entre el tamaño del Y y anomalías psiquiátricas de estos individuos (91,264).

5. Cáncer. Uno de los aspectos más importantes atribuidos a los HNC es la posible relación con cáncer, en particular en pacientes con tumores sólidos (linfomas, carcinomas de ovario y senos, mielomas, etc.) y leucemias. No obstante, los resultados son dudosos y se requieren más estudios.

Atkin reportó una frecuencia de 1qh+ de 55.2% de pacientes con cáncer comparada con 31.0% de un grupo control. Esto muestra una DES y, por lo tanto, una asociación entre un 1qh+ e inestabilidad general de los cromosomas (265). En otro estudio, 9 de 14 carcinomas de ovario presentaron en uno o ambos cromosomas 1 un HNC qh+ y otros dos presentaron IP de la región 1qh, aún en las células normales (linfocitos). Por lo que se asume una relación entre estas Var, neoplasia ovárica y cambios estructurales del cromosoma 1 (266). De la misma manera, la frecuencia de IP del cromosoma 1 mostró una DES entre pacientes con cáncer (15%) y normales (4%). Al parecer cuando el punto de ruptura de un segmento invertido ocurre en la vecindad de la HC C, un efecto adverso repercute en la atracción cromosómica, o bien, una cantidad desigual entre los homólogos da como resultado un mal apareamiento somático (267).

Por otro lado, 8 de 13 carcinomas de vejiga presentaron un 1qh+ y en 3 de éstos también se encontró en las células normales. En 4 tumores hubo IP de uno o ambos cromosomas 1 y, en 7 de los cromosomas, un cambio estructural. Se sugiere una asociación entre la estas Var, la susceptibilidad a cáncer y la presencia de cambios estructurales en el cromosoma 1 (268). Otro trabajo en 26 carcinomas de cervix mostró que, además de los cambios estructurales en el cromosoma 1, el rasgo más consistente en los complementos aneuploides de estos tumores parece ser un exceso de EC C en el cen y parte de la h del cromosoma 1 (269).

En un grupo de 120 pacientes con enfermedades malignas y premalignas se observó una alta frecuencia de EM de las regiones 1qh y 9qh. La susceptibilidad a ciertos agentes virales o mutágenos sería una explicación a esta tasa elevada en algunas familias. Un imbalance cromosómico, aunado a factores ambientales tal vez sea la base de la iniciación de la malignidad (270).

Un grupo de mujeres con carcinoma de ovario y de senos y controles fueron analizados. No existió DES en las frecuencias de bandas Q y C entre ambos grupos, aunque hay una posible relación entre el tamaño del segmento C e inversión. No obstante, la presencia de estas Var no está asociada con un alto riesgo de malignidad (271). Así también, la frecuencia de EM en 23 pacientes con enfermedades malignas y sus controles no mostró DES, excepto para el cromosoma 1 (cáncer de mama) que fue más común que en los controles. Los resultados indican ninguna relación entre EM y algunos tipos de malignidad (272).

Otros dos trabajos indican que la frecuencia de segmentos C grandes se relaciona con pacientes con leucemia mielóide crónica y otros desórdenes mieloproliferativos. En el primero, hubo una frecuencia más elevada (20/24) de 1qh+ en individuos con leucemia mielóide crónica que en controles (8/17) (273). En el segundo, 70 pacientes con Ph+ también mostraron una DES. En pacientes con Policitemia Vera, leucemia mieloblástica aguda y metaplasia mielóide no hubo DES para la región 1qh, pero sí la hubo para 9qh en los primeros dos grupos y para 16qh en el tercer grupo (274).

En otro grupo de pacientes con malignidad epitelial, 628

tuvieron un HM 1qh comparado con 36% de los controles ($P < 0.1\%$). Empero, 49% de los pacientes sin malignidad tuvieron HM. También, IP parciales en uno o ambos cromosomas 1 fueron más frecuentes (49%) en los primeros, que en pacientes sin ella (37%) y en controles (26%). No obstante, los estudios combinados mostraron DES (69% y 83% contra 49%, respectivamente), por lo que se asume una asociación entre HM y cáncer (275). Al evaluar pacientes con mieloma múltiple y controles, se halló 92% de PM (1qh-, inv(1), inv(9) y 16qh-) en el primer grupo contra 44% en el segundo. Se sugiere que esta neoplasia presenta un comportamiento heterocromático intermedio entre las enfermedades hematológicas y los tumores sólidos (276). Empero, para mujeres con adenocarcinoma de ovario y/o de mama y mujeres sanas, los resultados no mostraron DES para las regiones qh de los cromosomas 1, 9 y 16. Por lo tanto, no hay una relación causal entre estas Var y un elevado riesgo de malignidad (277).

También, mujeres con cáncer cervico-uterino, con lesiones pre-malignas y controles fueron estudiados. El primer grupo exhibió una mayor frecuencia (48.39%) de 1qh+ comparado con controles (29.8%) y lesiones pre-cancerosas (28.8%). Se especula que estas Var podrían tener una influencia en el desarrollo maligno del cervix uterino (278). Finalmente, otro estudio de pacientes con leucemia mielóide crónica Ph+ y controles, indicó que los HM 16qh+ e inv(9) parciales son más frecuentes en el primer grupo. Se sugiere que el incremento de HC C, vía ICH, puede facilitar la heterocigocidad de genes responsables del desarrollo y/o progresión de neoplasias (279).

6. Otras asociaciones. El conocimiento de los PM C también se ha encausado hacia otras asociaciones y aunque los reportes son esporádicos, deben ser tomados en consideración. En un estudio de niños en clases especiales y en clases normales no se encontró DES con respecto a la longitud del cromosoma Y. No obstante, una correlación entre tal longitud y un incremento en el nivel de actividad si fue significativo cuando ambos grupos se conjuntaron. Es posible que la cantidad excesiva de HC C de Yq y factores ambientales repercutan en el aprendizaje y conocimiento intelectual del individuo (280).

La evaluación de la longitud del cromosoma Y en una población japonesa mostró una correlación entre la longitud de la banda Yq12 y la estatura. Esto es, los varones más altos tuvieron Y más largos, por lo que un posible efecto de la HC de Yq sobre la estatura del hombre es una posibilidad a considerar (281).

Fryns y cols. informaron de una niña con inestabilidad cromosómica de las regiones qh tradicionales asociada con malabsorción e inmunodeficiencia combinada (282). También, Maraschio y cols. reportaron otro paciente con las mismas características. Este fenotipo y las configuraciones radiales constituyen ya un nuevo síndrome y postulan que el defecto básico radica en una mutación que interfiere con el proceso normal de condensación de la HC centromérica (283).

Por otro lado, las observaciones citológicas demuestran una asociación de pequeños nucléolos con regiones medias de cromosomas grandes. En meiosis masculina, 9cen posee una estructura compleja, la cual está asociada al nucléolo en 84% de las células de Sertoli. Además, numerosos micronúcleos también se asocian con segmentos de HC C. Estos pueden observarse en los oocitos a partir de los 6 meses de gestación y su función pudiera relacionarse con la ontogenia regular del individuo (90).

En algunos portadores de Var no usuales una tasa elevada de rupturas cromosómicas y sensibilidad se ve aumentada *in vitro* por radiaciones y agentes químicos. Esta inestabilidad se hereda y tal vez sea consecuencia de una mala reparación del DNA; además es mayor en sitios de HC que de EC. Es común que Var y rearrreglos estructurales los porten individuos con defectos congénitos. Sin embargo, cuando los sitios HC-EC están implicados, es más probable que ocurran duplicaciones o deleciones debido a una mayor susceptibilidad de estas regiones (90).

También, las áreas de HC C son fuente de inserciones virales y evidencias indirectas señalan una relación entre la cantidad de PM y la susceptibilidad al virus Coxsackie B. La elevada frecuencia de rupturas en portadores de estas Var, es quizá consecuencia de una inestabilidad cromosómica heredada y de susceptibilidad génica, debido a infecciones persistentes por

virus atenuados. En pacientes infértiles con mosaicismo para el HM del 9, se ha encontrado un título significativo de anticuerpos contra virus del Herpes. Asimismo, trabajos epidemiológicos informan de una alta susceptibilidad de integración viral asociada al PM del cromosoma Y y relacionado con una sola secuencia repetitiva. Esto se ha comprobado por diferentes sitios de corte de HaeIII. También la resistencia a otros virus parece relacionarse con los PM de las NOR y la asociación con malformaciones del sistema nervioso central podría explicarse por la integración viral y factores ambientales (92).

Finalmente, algunos investigadores han considerado que los sitios frágiles de los cromosomas humanos son otro tipo de PM C. Así, se han propuesto que estos sitios son zonas de modificación o de integración viral (92).

VI. POLIMORFISMOS CROMOSÓMICOS Y ABORTO HABITUAL.

En nuestro medio la infertilidad es comúnmente aceptada como la incapacidad de llevar a término el producto concebido. Empero, existen controversias para establecer cuantas interrupciones debe haber tenido una pareja para considerarla infértil, así como tomar en cuenta los abortos espontáneos (AE), partos inmaduros y fetos con o sin malformaciones que haya tenido durante su vida. Por otra parte, se debe tomar en cuenta que las interrupciones diagnosticadas que ocurren dentro de las primeras 20 semanas de gestación se consideran AE y aborto habitual (AH) a la presencia de dos o más AE consecutivos. A este respecto, se sugiere que existe un riesgo de un segundo aborto de -22.7% (284).

A principios de los años 60's se empezaron a estudiar los aspectos etiológicos de los AE. Los exámenes citogenéticos del material abortado muestran que 50-60% de todos los AE tienen alteraciones cromosómicas tales como aneuploidias, poliploidias y mosaicos de éstas. También, se ha comprobado que si el primer AE es cromosómicamente anormal, existe 80% de probabilidad de que el segundo también lo sea. Se ha descubierto en las parejas infértiles una gran cantidad de cromosopatías que están vinculadas con el aborto, principalmente, rearrreglos balanceados tales como inversiones y translocaciones, así como algunas microdelecciones, las cuales se consideran independientemente del sexo (284-285).

A partir de los años 70's, los estudios han reportado que los EM C no son variaciones sin sentido y pueden repercutir en la integridad del producto. Esto es, existe una correlación entre la presencia de FM C en un miembro de la pareja y pérdida fetal recurrente. No obstante, los resultados son controversiales, ya que al comparar individuos portadores de estas Var con individuos fenotípicamente normales no siempre existe una DES. Además, debe considerarse que la metodología empleada, la elección del grupo testigo, los análisis estadísticos y las variaciones raciales son parámetros que se emplean arbitrariamente. Los reportes más sobresalientes son descritos a continuación.

A. REGIONES HETEROMORFICAS TRADICIONALES.

Los primeros estudios se realizaron en familias que incluían parejas seleccionadas por tener dos o más AE. Los resultados mostraban una tasa relativamente alta de Var tales como $1q+$, $9q+$, $16q+$, $Dp+$, $Ds+$, $Dps+$, $Gp+$, $Gs+$, $Gps+$, $17ps+$, $Yq-$ y $Yq+$, además de asociaciones múltiples de cromosomas acrocéntricos (286-294). Se consideró que estas Var no tenían una repercusión en los AE, pero que podían contribuir a disyunciones anormales causadas por un imbalance de las regiones de HC C (289-290). No obstante, ya que estos estudios se realizaron con pocos individuos y fueron altamente selectivos, sin incluir grupos testigo adecuados y métodos cuantitativos, la evaluación no es muy confiable. Pese a lo anterior, la frecuencia de FN C, principalmente $Yqh+$, fue mayor en las parejas abortadoras (PA) que en las normales. Sin embargo, no fue posible establecer su significado (289-294).

1. Heteromorfismos de los Cromosomas 1, 9 y 16.

Entre los primeros estudios con evaluaciones confiables se encuentra el de Holbak y cols. quienes informaron una frecuencia de HN C (qh) de 26.9% en parejas con AE. La distribución de estos FN establece una DES entre las PA con cariotipo anormal y con cariotipo normal. De las 17 regiones $qh+$ encontradas, 16 correspondieron al cromosoma 9 y una al cromosoma 1. Se postula que tales $qh+$ podrían causar inestabilidad meiótica (295).

Hemming y Burns reportaron que en 45% de padres abortadores, uno de ellos tuvo un $9qh+$ comparado con 57.5% de las parejas fértiles (PF). Empero, 15% tuvieron un $9qh+$ en ambos padres comparado con 5% de las control. También, en 62% de padres abortadores, un padre tuvo un $1qh+$ comparado con 60% de las parejas control y en 2.5% ambos padres tuvieron un $1qh+$ comparado con 10% de las control. No se hallaron DES entre las poblaciones, lo que no establece relación alguna entre HN C y AE (296). Pero al examinar un grupo de 180 PA, la región $16qh$ reveló DES con respecto a la del grupo control. Estos resultados sugieren una asociación entre el AE y la presencia de un $16qh+$ (297). Otro grupo de PA mostró una frecuencia elevada (12.5%) de $1qh+$, lo que establece una DES con respecto al grupo de PF (1.7%). Al parecer

en algunos individuos normales, grandes cantidades de secuencias repetitivas pueden ser toleradas sin consecuencias, pero en otros, un $1q\dot{+}$ puede aumentar la tasa de una no-disyunción (298).

Para encontrar una asociación entre Var y capacidad reproductiva, Carothers y cols. aplicaron un método que compara portadoras y no portadoras dentro del mismo linaje con respecto al número de nacimientos, tiempo de generación y descendientes, en relación a la edad reproductiva. Los resultados mostraron ninguna DES entre los grupos, aunque en los portadores los AE tempranos pueden retardar el siguiente embarazo y tener un efecto indetectable sobre la aptitud reproductiva (299).

Así también, Blumberg y cols. examinaron los HN autosómicos de un grupo de PA y uno de PF. Las longitudes de las regiones $q\dot{b}$ de los cromosomas 1, 9 y 16 de ambos grupos no difirieron en sus distribuciones, por lo que no exista una relación entre FN C y AN (300). Tho y cols. reportaron una elevada frecuencia (12.0%) de FN en parejas con AN en comparación con la población general (2.6%). En uno de los subgrupos abortadores, la Var más frecuente fue $9q\dot{+}$ (2.52%). Se cuestiona si algunos HN pudieran tener una repercusión deletérea sobre la aptitud reproductiva (301).

Por otra parte, Ford y cols. evaluaron por pares homólogos los HN $9q\dot{b}$ de un grupo de mujeres con AN y de un grupo de mujeres control. Los resultados mostraron que: 1) los pares más largos del grupo problema fueron significativamente más largos que los del grupo control, 2) los pares más pequeños fueron iguales en ambos grupos, 3) las DES entre homólogos fueron mayores en el grupo de abortadoras que en el control y 4) la suma de homólogos fue significativamente mayor en el primero que en el segundo grupo (302). Asimismo, en otro grupo de mujeres infértiles también se mostró que la relación entre el cromosoma 1 más chico y el 9 más grande y las diferencias de par de cada cromosoma son significativamente mayores en las mujeres abortadoras (303). Se concluye que las diferencias en el tamaño de la NC y/o su interacción con los cromosomas 1 y 9 pudieran influir en el apareamiento cromosómico, lo que da como consecuencia una mala segregación, o bien, que un exceso de la misma pudiera distorsionar alguna función génica.

Al comparar otro grupo de PA con PF, los FM 1, 9 y 16 no mostraron DES inter-individual e inter-poblacional. Empero, las variaciones intra-individuales para cada homólogo, en ambos sexos, fueron altamente significativas. Aunque son afectadas por el grado de contracción cromosómica, ni la cantidad de HC C ni la diferencia entre homólogos señalaron una DES entre ambas poblaciones, lo que sugiere que los fenómenos presuntivos de no-disyunción no son causa de infertilidad (304). Rodríguez-Gómez y cols. examinaron los HM C de un grupo de PA y de un grupo de PF. Los resultados tampoco revelaron DES de las regiones qh de los cromosomas 1, 9 y 16 intra e interpoblacional, diferencias entre cromosomas y entre homólogos. Es posible que el valor de corrección (218) empleado en este estudio y el método de cultivo hayan influido en los valores obtenidos, por lo que la variación mitótica es un factor a considerar (305).

Ultimamente, se han reportado dos Var no usuales. Una correspondiente al cromosoma 9 (9p21) con una banda G extra, C-negativa, G-11 negativa y asociación MOR sin aparente efecto fenotípico. La otra corresponde al cromosoma 16 con una banda adicional pericentromérica (16p+), con tinción C-negativa y Ag-NOR negativa. El origen y naturaleza de estas bandas extras son desconocidos, ya que al parecer carecen de actividad génica y tienen diferentes propiedades que la HC C. Sin embargo, un posible riesgo de asociación de éstos (9p+ o 16p+ en los portadores) con el AH, no puede ser excluida (131,132).

2. Heteromorfismos del Cromosoma Y.

Uno de los FM C asociados con AH más controvertidos es el del cromosoma Y. Al igual que en el caso de las Var autosómicas, los trabajos iniciales sobre el HM Yqh fueron meramente descriptivos y sin análisis estadísticos (286,289,292). No obstante, tendencias subjetivas hacían incapié en tal correlación. Reportes como los de Patil y Lubs sugieren fuertemente que el riesgo de AH se incrementa cerca de cinco veces en familias caucásicas con un cromosoma Y largo. De 1,736 hijos de madres con dos o menos AE previos, 33 tuvieron un Y largo, en contraste con 3/29 recién nacidos de madres con 3 o más AE consecutivos; esto representa una DES (306,307).

Nielsen encontró en 5,761 varones examinados que 58 poseían un Yqh+; sus madres tuvieron 118 embarazos, 26 de ellos abortados (224). El grupo control comprendió 4,895 infantes con cariotipo normal y sin un Y largo, en donde sus madres presentaron 138 de AE. Esto produce una DES e indica que un padre portador de un Yqh+ incrementa el riesgo de AH (308). Asimismo, Genest analizó 51 PA, de las cuales 39 varones revelaron cariotipo normal, 10 un

qh+, 1 un Yqs y otro sujeto 2 cromosomas Y. La tasa elevada de Yqh+ indica que el riesgo de aborto recurrente aumenta cuando un padre posee un Y largo (309).

Al examinar 101 PA, se observó que 76 varones tenían un cromosoma Y normal, 19 un Yqh+, 5 un Yqh- y 1 una inv(Y). El índice promedio fue de 1.08 ± 0.014 y 52.63% de los sujetos estuvieron por debajo de este valor. Los datos soportan que un aumento en la longitud de Yqh puede causar pérdida fetal (310).

Espero, los reportes con bandas QFQ de Blumberg y cols. establezcan que no existe una DES en la distribución de la longitud de Yq entre PA y PF. Por lo tanto, un cromosoma Y largo no es un factor importante en la etiología de AE recurrente (297,300,311). También, un grupo de 108 parejas con AH y otro de 108 individuos con RN fueron evaluados en forma ciega por dos observadores. La comparación cuantitativa no reveló DES en relación a la longitud de Yq en ambos grupos. Sin embargo, en el primer grupo sí existió por lo menos un hijo anormal, cuando el padre tuvo un Y largo. Aunque los resultados sugieran que aunque la pérdida recurrente del embarazo no se asocia con un Y largo, sí con un desarrollo fetal anormal (312,313).

Verp y cols. estudiaron 3 grupos diferentes de PA: 1) con 3 o más AE e infantes no vivos, 2) con 2 o más AE e infantes vivos y 3) con infantes vivos solamente. Las tendencias centrales fueron similares, pero las distribuciones de las longitudes de Yqh mostraron DES, por lo que una longitud óptima de esta región con respecto a su función reproductiva es una característica importante (314). Los estudios de Verma y cols. en un grupo de 15 parejas con AH y 15 controles tampoco revelaron DES en la longitud promedio del Y. Probablemente el índice Y/F influya en

longitud normal del Y de cada grupo racial (315).

Por otra parte, Genest y Genest estudiaron sujetos de 10 generaciones en 4 familias que presentaban AH. En 2 familias, los varones portaron un Yqh+ y en las otras 2 un Yqh- o un Y normal. En una de las familias con Yqh+, 17/26 mujeres tuvieron 21.8% de AE, mientras que en las otras 3, 7/30 mujeres tuvieron una tasa de AE de 4.9, 7.5 y 5.7%, respectivamente. Parece ser que la correlación entre un cromosoma Y largo y pérdida fetal en la primera familia es un hecho. Sin embargo, la baja frecuencia de AE en las otras portando un Yqh+ indica que los Y largos son de varios tipos y producto de diferentes mecanismos (316).

Finalmente, al evaluar el cromosoma Y de un grupo de PA y de uno de PF se detectaron DES. Pese a la existencia de mecanismos que pudieran producir un efecto negativo sobre los descendientes y a la presencia de Y largos en otras poblaciones normales, es poco probable que un PW Yqh+ estuviera asociado al AH (305).

3. Otros Heteromorfismos.

Existen pocos estudios cualitativos de otros PM C en relación al AH. Se han encontrado con bandas QFQ Var extremas en casi todos los cromosomas (300,317); sin embargo, es difícil evaluarlos debido a que no existe un patrón de comparación adecuado para establecer el grado de significancia y únicamente es posible hacerlo en base a la frecuencia poblacional. Por lo anterior, sólo se hará mención de algunos estudios esporádicos.

Petrovic reportó una Var(3)(p11q11) no usual en un varón, en el que su esposa había tenido 3 AE y un niño normal. Al parecer esta banda es de replicación tardía (C positiva), no está implicado ningún segmento translocado y tal vez es resultado de una amplificación. Ninguna asociación con el AH es considerada ya que la Var también está presente en la madre y sin antecedentes de AE (127). De igual manera, dos familias distintas mostraron una Var extrema 20ph+, donde cada esposa tuvo dos AE consecutivos. El NM fue estable en tamaño y segregándose preferencialmente. Pese a no tener efectos fenotípicos, no deja de ser una Var rara y siempre asociada al AH (318).

También, se ha establecido que la asociación NOR de algunos acrocéntricos se relaciona con aborto recurrente. En un estudio comparativo, la moda y la media de Ag-NOR observadas en los acrocéntricos no mostró DES entre un grupo de parejas con AH y un grupo control. Empero, el promedio de asociaciones Ag-NOR por célula fue similar en masculinos y femeninos del primer grupo, pero menor que en el segundo (319). Al parecer se observa una relación entre asociaciones NOR y AH, aunque reportes más extensos deben realizarse al respecto.

B. REGIONES HETEROMORFICAS CON INVERSION PERICENTRICA.

Es muy discutida la propuesta de si las IP que implican únicamente la región heterocromática son consideradas como un FN o son inversiones clásicas como las implicadas en cualquier otra parte del cariotipo. Aunque en las diferentes poblaciones humanas se acepta que la frecuencia de IP de los cromosomas 1, 9 y 16 es variable y aparentemente no repercuten en el fenotipo, se ha propuesto que estos HN tienen un efecto deletéreo sobre la capacidad reproductiva del portador o sobre los mecanismos de recombinación meiótica durante la segregación de los cromosomas. Informes en la literatura sugieren una mayor frecuencia de IP del cromosoma 9, seguidas por la de los cromosomas 1 y 16 en relación al AH, comparadas con la de la población general.

Boué y cols. reportaron por primera vez una correlación entre IP del cromosoma 9 e infertilidad, al estudiar a 10 familias no relacionadas. En 4 de ellas, la IP estuvo relacionada con cromosopatías. La frecuencia de portadores (masculinos) fue de 7/10 y se observaron periodos grandes de esterilidad, cuando el portador era el varón. Quizá la interacción de la IP con otras regiones cromosómicas origina las anomalías responsables de los AE (320). No obstante, de la Chapelle y cols. no hallaron una DES entre 6/732 (0.82%) personas con pérdida fetal de una inv(9)(p11q13) y un grupo control de 631 sujetos (1.1%) (321).

Los estudios realizados por Howard-Peebles indicaron, por un lado, que las inv(9) ocurren con mayor frecuencia que en otras partes del cariotipo. Y por el otro, que los efectos de una IP en

un portador sobre su capacidad reproductiva no son de alto riesgo y que podrían ser el resultado de diferentes mecanismos de interacción cromosómica y meiótica (322,323). Pero Tho y cols. encontraron un alto porcentaje de inv(9) en 110 parejas con AE comparado con un grupo testigo de 1,589 sujetos. Ellos concluyeron que existe un mal apareamiento dado por esta Var, además de un efecto intercromosómico que predispone a la no disyunción (301). De igual manera Ford y cols. afirmaron que las inv(9) muestran DES entre un grupo de PA y un grupo control. Si se correlaciona la diferencia de tamaño entre los homólogos, el efecto se establece por un mal apareamiento de los cromosomas morfológicamente diferentes, la cual pudiera ser crítica (302).

En otro estudio de parejas infértiles y controles no hubo DES entre las frecuencias de inv(1) parciales e inv(9) totales. Espero, al comparar los resultados de las inv(9) parciales, fueron observadas DES entre ambos grupos, principalmente en las mujeres del grupo problema (305). Por último, fue reportada una nueva Var de una IP de la región heterocromática del cromosoma 19 [inv(19)(p13q13)] en 3 familias. Estas tuvieron AE con o sin mortinatos malformados; en una de ellas se halló también una inv(9) total. Al parecer una segregación preferencial de las IP es notoria, por lo que un portador de esta Var puede tener un alto riesgo en la aptitud reproductiva (324).

En conclusión, los HC de los cromosomas 1, 9, 16 e Y al parecer repercuten indirectamente sobre las parejas originando problemas de fertilidad, puesto que un exceso o una cantidad diferencial de HC entre homólogos pudiera generar productos desbalanceados. Sin embargo, debido a que los resultados son controversiales, se requieren más estudios en diferentes grupos raciales. En relación a las IP de la región heterocromática, la mayoría de los datos apoyan la idea de una clara asociación con el AE. Aunque los mecanismos no están bien entendidos, es posible que un efecto adverso en el apareamiento cromosómico conlleve a la producción de cromosopatías o a una no disyunción durante los estadios embrionarios. En consecuencia, la infertilidad por aneuploidía de recombinación puede reflejar detenciones muy tempranas del embarazo, muchas veces sin ser detectados.

VII. METODOLOGIA.

A. MUESTRA BIOLÓGICA.

De un grupo de parejas con AH, se estudiaron en forma retrospectiva 21 de ellas, las cuales acudieron al Servicio de Genética del Hospital General de México S.Sa. de Enero de 1980 a Enero de 1990. Para ello se tomaron en cuenta los siguientes requisitos: 1) que ambos provengan de abuelos mestizos mexicanos y 2) que tengan 2 o más AE consecutivos, con o sin antecedentes de hijos vivos sanos y/o productos malformados y habiéndose descartado previamente causas ginecológicas, inmunológicas, endócrinas e infecciosas. El grupo testigo estuvo integrado por 25 parejas seleccionadas tomando en cuenta los siguientes requisitos: 1) que ambos desciendan de abuelos mestizos mexicanos, 2) que hayan tenido 2 o más hijos sanos y 3) que no tuvieran antecedentes de AE previos o posteriores a los hijos.

B. OBTENCION DE LAS PREPARACIONES CROMOSÓMICAS.

1. Cariotipo de Linfocitos de Sangre Periférica.

Las preparaciones cromosómicas fueron realizadas a partir de un cultivo de linfocitos de sangre periférica por la técnica de Moorhead (325), modificada en el laboratorio del Servicio de Genética de este mismo hospital.

1. Tomar una muestra de sangre periférica por cada individuo con una jeringa heparinizada en condiciones de esterilidad.
2. Colocar de 7-9 gotas de sangre (~1 ml) en 5 ml de medio de cultivo (*). Preparar 2 frascos por cada individuo.
3. Incubar durante 70-70½ horas a 37°C. Adicionar 45 ml de solución de colchicina al 0.02% e incubar por 1½-2 horas a 37°C.
4. Vaciar el contenido de cada frasco a un tubo de centrifuga de 15 ml y centrifugar a 3,000 rpm durante 5 minutos.
5. Decantar el sobrenadante y resuspender el precipitado (botón celular). Agregar 5 ml de solución hipotónica (0.0375 M de KCl) a 37°C. a cada tubo agitando simultaneamente en el vortex. Dejar reposar durante 20-30 minutos a 37°C.

6. Centrifugar a 3,000 rpm durante 5 minutos. Decantar y agregar gota a gota, agitando en el vortex, 5 ml de fijador fresco (metanol-ácido acético 3:1). Dejar reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente.

7. Centrifugar a 3,000 rpm durante 5 minutos. Decantar y resuspender el botón en 5 ml de fijador. Centrifugar nuevamente. Repetir esta operación cuantas veces sea necesario (-4 veces) hasta obtener un botón blanco y un sobrenadante transparente.

8. Para hacer las preparaciones, decantar y adicionar 10 gotas de fijador para resuspender. Tomar con una pipeta pasteur y dejar caer desde una altura de -10-15 cm 2-3 gotas sobre cada portaobjetos limpio y desengrasado. Dejar secar al aire.

9. Teñir con Giemsa durante 3 minutos [3 ml de Giemsa + 47 ml de solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8 o agua destilada]. Lavar con agua corriente y dejar secar al aire.

10. Observar al microscopio. Buscar metafases no muy cerradas y con cromosomas de buena morfología. Del cultivo de cada individuo se prepararon de 8-10 laminillas, las cuales se dejaron envejecer a temperatura ambiente por lo menos una semana antes de realizarles las técnicas de Bandas GTG y CBG.

Preparación de reactivos:

- Medio de Cultivo^o: 0.5 ml de suero de ternera fetal (10%) + 4.5 ml de medio de cultivo Mc Coy 5a + 2,000 U/ml de penicilina y 275 µg/ml de estreptomycin + 0.2 ml de fitohemaglutinina M.

- Solución de Colchicina: pesar 0.02 g de colchicina y aforar en 100 ml de agua destilada previamente esterilizada.

- Solución de Colorante Giemsa: pesar 5 g de Giemsa + 220 ml de glicerina agitando con calor. Dejar enfriar lo suficiente y agregar después 300 ml de metanol. Calentar un poco y filtrar en caliente.

- Solución amortiguadora de Fosfatos pH 6.8 (Sorensen): pesar 2.56 g de Na_2HPO_4 + 6.63 g de KH_2PO_4 y aforar a 1000 ml.

2. Técnica de Bandas GTG.

Para descartar alguna aberración cromosómica estructural, se realizó en las preparaciones de cada individuo la Técnica de Bandas GTG de Wang y Fedoroff (326) modificada.

1. Colocar las laminillas por -30-45 segundos en una solución que contiene 3 ml de una solución de Tripsina al 1% + 47 ml de amortiguador de fosfatos pH 6.8 en baño maría a 37°C.

2. Enjuagar con solución salina isotónica (0.9% de NaCl) y luego en agua corriente. Teñir con una solución de colorante Giemsa (3 ml de Giemsa + 47 ml de amortiguador de fosfatos pH 6.8) durante 1-1½ minutos. Lavar con agua corriente y secar.

3. Observar al microscopio. Se localizan metafases bien bandeadas y con cromosomas separados para analizar. Si es posible tomar fotografías de algunas mitosis.

Nota: Los tiempos de tripsina deben ajustarse en cada caso.

Preparación de reactivos:

- Solución de Tripsina: pesar 1 g de Tripsina + 0.02 g de EDTA. Aforar en 100 ml de amortiguador de fosfatos 0.01 M pH 6.8. Agitar durante 5-6 horas en agitador magnético. Filtrar y fraccionar en alícuotas de 5-10 ml para guardar congelada.

3. Técnica de Bandas CBG.

Para la observación de los PM C, se llevó a cabo la técnica de Bandas CBG dado por Sumner (140), modificada en el laboratorio de citogenética del Servicio de Genética de este mismo hospital.

1. Colocar las laminillas en una solución de HCl 0.2 N durante 20-30 minutos. Enjuagar con agua destilada.

2. Poner las laminillas en una solución de Ba(OH)₂ (0.065 M) a 37°C. durante 20-30 minutos. Lavar con agua destilada a 37°C.

3. Colocarlas en una solución de 2xSSC (8.82 g de citrato de sodio + 17.53 g de NaCl y aforar en 1000 ml de agua destilada) a 60°C. durante 2 horas. Lavar con agua destilada a 60°C. y con agua corriente.

4. Teñir con una solución de colorante Giemsa (5 ml de Giemsa + 45 ml de amortiguador de fosfatos pH 6.8) durante 5 minutos. Dejar secar al aire.

5. Observar y analizar al microscopio. Buscar mitosis abiertas y con buena morfología. Fotografiar .

C. EVALUACION.

Por cada individuo, tanto pacientes como grupo testigo, fueron analizadas de 8-10 metafases. La selección de las metafases se realizó de la siguiente manera:

1. La mitosis debía contener por lo menos a los cromosomas implicados en el estudio, o sea, a los pares cromosómicos 1, 9 y 16 y al cromosoma Y, en su caso.

2. Estos, no debían estar doblados ni superpuestos afectando la región heterocromática de alguno de ellos.

3. Las cromátidas de cada cromosoma debían permanecer paralelas y próximas entre sí, de tal forma que se apreciara bien el contorno de la región C.

4. La tinción CBG debía mostrar un contraste bien definido entre la región C y el resto del cromosoma.

5. El grado de espiralización de los cromosomas debía ser de "tamaño mediano". Para corregir el grado de contracción cromosómica de cada mitosis, se empleó el largo promedio de los brazos cortos del cromosoma 16 (16p). Esta región se eligió como referencia por: a) que no se apreciaba una alteración significativa en el grado de compactación, b) ser de tamaño intermedio, comparado con las regiones qh de los cromosomas 1, 9 y 16, c) ser el cen fácilmente identificable y d) poder localizar el cromosoma 16 rápidamente en la metafase (110).

Las 8-10 metafases seleccionadas se fotografiaron con película Kodalith ortho 6556 tipo 3 (35 mm) en un fotomicroscopio Carl Zeiss Fovymat III con un objetivo de inmersión planapocromático 100x. Los negativos se montaron para transparencia y se proyectaron por medio de un proyector Kodak Ektagraphic B-2, lente Ektanar de 4-6 pulgadas f:3.5, en una pantalla rígida a una distancia constante de 303 cm. La amplificación total (10,000x) se dió por la estimación del aumento que tiene el ocular, el objetivo, el sistema automatizado de fotografía y el aumento que da el proyector.

Por cada individuo se utilizó una hoja blanca de papel bond, sobre la cual se trazó la longitud de los segmentos C de cada uno de los cromosomas de cada mitosis. Las mediciones van de la parte inferior del cen a la parte media terminal del segmento qh de los

cromosomas 1, 9 y 16, de la parte media proximal a la terminal de la región Yqh y del cen a la parte terminal de 16p. Para ello se empleó un vernier Scala calibrado con precisión 1/20 mm.

Todos los valores de cada sujeto se ordenaron en una tabla, colocándose los mayores de cada par cromosómico en la columna izquierda y los menores en la derecha ('). Para determinar la longitud C, se calculó el valor promedio y DE de cada individuo, al analizar cada uno de los cromosomas 1, 1', 9, 9', 16, 16' e Y, así como el de la región 16p y 16p'.

También, se presentaron los datos correspondientes al rango de variación de las medidas observadas de las regiones C de los cromosomas 1, 9, 16 e Y.

Para el análisis estadístico, se empleó únicamente la longitud promedio qh de cada cromosoma de cada persona y se aplicó la prueba "U" de Mann-Whitney. El procedimiento es el siguiente:

1. Se determinan los valores de n_1 y n_2 , donde el primero es el número de casos del grupo más pequeño.

2. Se entremezclan los valores de ambos grupos, asignando el rango (R) de 1 al puntaje que sea algebraicamente más bajo, donde la suma de $n_1 + n_2 = N$.

3. Se determina el valor de "U", por medio de las fórmulas:

$$U = n_1 n_2 + \frac{n_1(n_1 + 1)}{2} - R_1, \quad U' = n_1 n_2 + \frac{n_2(n_2 + 1)}{2} - R_2$$

ya que $U = n_1 n_2 - U'$

4. Como la muestra $n_2 > 20$, es posible determinar la significancia de un valor de "U" observado por medio de:

$$z = \frac{U - uU}{\sigma U} = \frac{U - \frac{n_1 n_2}{2}}{\sqrt{\frac{(n_1)(n_2)(n_1 + n_2 + 1)}{12}}}, \quad \text{donde la}$$

$$\text{media} = uU = \frac{n_1 n_2}{2} \quad \text{y} \quad DE = rU = \frac{\sqrt{(n_1)(n_2)(n_1 + n_2 + 1)}}{12}$$

La prueba "U" de Mann-Whitney es una de las pruebas no paramétricas más poderosas, su potencia-eficacia se acerca a $3/\pi = 95.5\%$ cuando N (número de datos totales) aumenta. Constituye la alternativa más útil ante la prueba "t" cuando el investigador desea evitar las suposiciones que ésta exige o si la medición en la investigación es más vaga que la escala de intervalo (327). También se aplicó una prueba "U" para la diferencia en longitud de cada región C de cada par cromosómico, esto es: 1qh-1qh', 9qh-9qh' y 16qh-16qh'.

Los datos obtenidos se expresaron también en gráficas, en las que se muestra el perfil de los histogramas, correspondientes a la distribución de cada cromosoma de ambos grupos, así como la de la diferencia de cada par cromosómico.

Además, la evaluación de los PM C se realizó en base a la longitud promedio de la región C y, de acuerdo al método de Patil y Lubs (110), fueron clasificados en 5 niveles empleando nuevamente como referencia a 16p. Las Var medidas en los límites entre 2 niveles fueron asignadas al nivel superior. Así, las frecuencias de cada segmento qh de cada par cromosómico y del cromosoma Y fueron obtenidas. También, fueron registradas las frecuencias de las IP, tanto parciales como totales, en ambos grupos y clasificadas en 5 niveles de inversión (230).

Para tener un buen control de calidad de las mediciones de la región C, fue necesario realizar una segunda medición de la región 16p promedio de cada persona (grupo control) para aplicar una prueba de asociación de rangos. Esta última, llamada coeficiente de correlación de rangos de Spearman (r_s), requiere que las variables sean medidas en una escala ordinal. El procedimiento es el siguiente:

1. Se ordenan las observaciones de la primera medición en la variable X de 1 a N y las de la segunda medición en la variable Y de 1 a N.

2. Se apunta el rango de cada variable X y el rango de cada variable Y junto a su anotación.

3. Se determina la diferencia entre los dos rangos (d_i) de cada valor, se eleva éste al cuadrado (d_i^2) y se suman todos ellos (Σ) para determinar Σd_i^2 .

4. Se emplea la fórmula:

$$r_s = 1 - \frac{6 \Sigma d_i^2}{N^3 - N}, \text{ cuando } N = 4-30 \text{ o}$$

$$t = r_s \frac{\sqrt{N-2}}{\sqrt{1-r_s^2}}, \text{ cuando } N \geq 10$$

Por último, fue aplicada la prueba χ^2 de independencia de variables categóricas en los resultados de los valores de los niveles de tamaño y niveles de inversión de las regiones de HC C de los cromosomas 1, 9, 16 e Y.

En todos los análisis de las mediciones fue considerado un nivel alfa de 5% ($\alpha = 0.05$).

VIII. RESULTADOS Y DISCUSION.

La historia clínica de las 21 parejas con AH fue registrada. De ellas, 13 presentaron únicamente AE consecutivos, 5 tuvieron AH y un mortinato con o sin malformaciones congénitas, 2 tuvieron AH e hijo(s) vivo(s) sano(s) y solamente una presentó AE recurrente e hijo vivo no sano. Los datos obtenidos de la HC C muestran que la población de las parejas con AH es heterogénea. Esto dificulta la comparación de la muestra con los reportes de la literatura, donde generalmente se define al grupo problema como aquellas parejas que hayan tenido solamente dos o más AE consecutivos (286-289,291-293,295,297,298,300,304,309,312,314).

Un total de 7,860 mediciones fueron realizadas en las 1,104 metafases de los 92 individuos, de las cuales 4,172 correspondieron al grupo testigo (25 PF), 3,504 al grupo problema (21 PA) y 184 correspondientes a la segunda medición del grupo testigo (16p promedio).

Los resultados obtenidos y el análisis de los mismos se muestran en las tablas 25 a 37 y en las figuras 9 a 20.

Los valores promedio y las DE de las regiones polimórficas de los tres pares cromosómicos 1, 9, y 16 y del cromosoma Y de cada grupo se muestran en la tabla 25. En todos los casos, los valores de la media del grupo de PA fueron ligeramente superiores a aquellos del grupo testigo, principalmente, los valores de las regiones qh de los cromosomas 9 y 9'. Además, se demuestra que la cantidad de HC C está en proporción directa con la longitud C y con el tamaño correspondiente de los cromosomas 1, 9 y 16, sin existir una DES entre ambos grupos. Estos resultados están de acuerdo con lo reportado en la literatura (170,218,228,233), en donde el mayor contenido de HC pertenece al cromosoma 1 y el menor al cromosoma 16. Los valores encontrados para los segmentos C de los cromosomas 9 y 9' entre ambos grupos son los más discrepantes. Esto podría explicarse por cantidades variables de y/o excesivas de secuencias repetitivas contenidas en esta región, principalmente DNA sat III, ya que este cromosoma presenta mayor variación de secuencias que los pares autosómicos 1 y 16 y similar a la del cromosoma Y (295) (Tabla 2).

Los datos pertenecientes al rango de variación de la longitud promedio de los segmentos de HC C de cada cromosoma de ambos grupos, se muestran en la tabla 26. En los C1 y C1', las cifras del grupo control tuvieron un intervalo más amplio que las del grupo problema. Sin embargo, en el C9 del grupo de PA el intervalo fue ligeramente superior que el del grupo de PF y muy amplio para los C9', C16 y C16' para ambos sexos. Era de esperarse que la región C del cromosoma 1 fuese altamente polimórfica, puesto que contiene una cantidad mayor de HC C que cualquier otro autosoma, pero menor diversidad de secuencias (47). No obstante, para la región C del cromosoma Y, el rango más amplio correspondió a los individuos del grupo testigo. Esto es contradictorio, ya que si el segmento Yq distal es uno de los que poseen una mayor diversidad de secuencias (26,45,50) y un mayor grado de PM (34,88-91), se esperaría una asociación con la pérdida repentina del embarazo (306-316). Esto implica que una relación causal entre la longitud del bloque C y la presencia de AH es prácticamente excluida, por lo menos, para este cromosoma.

Los resultados del análisis estadístico por la prueba "U" de Mann-Whitney se muestran en las tablas 27 y 28. Los valores N1 y N2 así como R1 y R2 para cada región C de cada cromosoma y la diferencia entre homólogos, fueron obtenidos (Tabla 27). En base a éstos, se calcularon los valores de U, U' y Z, así como los valores correspondientes de p y 2p (Tabla 28). Como se puede observar, los valores p de los cromosomas C1, CY y las tres diferencias entre homólogos fueron mayores de 0.05, por lo tanto, no existe DES entre el grupo de PF y el grupo de PA. Esto implica que al menos la longitud C de estos cromosomas no contribuye directamente en la etiología de la pérdida fetal. En cambio, los valores p de las regiones qh de los cromosomas C1', C9, C9', C16 y C16' sí muestran DES entre ambos grupos. Esto podría demostrar que la longitud C en estos últimos sí representa un factor importante en la estabilidad cromosómica del producto. No se excluye la posibilidad de que, en casos particulares, las cantidades moderadamente elevadas, dentro de los límites de la significancia estadística (como es el caso de C1 con $p = 0.053$), puedan también repercutir en la vitalidad del embrión.

El valor del coeficiente de correlación de Spearman (r_g) fue

de 0.999996, por lo que existe un buen control de calidad para las mediciones de todas las regiones qh de los grupos de parejas testigo y parejas problema.

Numerosos estudios se han realizado para tratar de establecer si existe una correlación entre FM C y parejas con AH. Estos se basan en los aspectos cuantitativos de las regiones qh tradicionales y muestran parámetros similares de comparación (Tabla 29). Espero, los criterios de selección de las muestras poblacionales, número de células analizadas, métodos de medición y estadísticos son muy heterogéneos. En términos generales, existe una fuerte tendencia a demostrar que los HM C están implicados en la pérdida fetal recurrente. No obstante, es probable que algunos de estos trabajos no cuenten con un buen control de calidad en sus mediciones y que la significancia no represente en realidad lo observado. De igual manera, la elección de grupos comparativamente apropiados y métodos estadísticos adecuados pueden influir notablemente en los resultados.

En adición, la prueba "U" de Mann-Whitney no mostró significancia alguna en las diferencias en longitud del segmento C entre homólogos de los tres pares cromosómicos entre un grupo y otro. Esto podría indicar que las interacciones entre homólogos de las secuencias contenidas en la HC C no son causa de AH. La mayoría de los autores emplean valores promedio, pero con un menor número de metafases (1-10) por persona, por lo que esto podría parcialmente explicar la controversia entre AE recurrente y la presencia de HM C (304,305). Maes y cols. asumen que ni la cantidad de HC C (en cada homólogo o un promedio de ambos), ni la diferencia entre homólogos (expresada como la diferencia en longitud C entre ellos) difieren significativamente; de tal manera que los fenómenos presuntivos de una no disyunción no son causados por los FM C (304). Sin embargo, Ford y cols. reportaron que las diferencias en el tamaño y/o la interacción de la HC C entre los cromosomas 1 y 9 pueden actuar adversamente sobre el apareamiento cromosómico, dando como consecuencia una mala segregación de los cromosomas (302,303).

Por otro lado, en las figuras 9 a 17, se muestran los histogramas correspondientes a la longitud media de HC C/16p

promedio de los pares cromosómicos 1, 9 y 16, así como las diferencias entre homólogos en relación a su frecuencia en las PF y las PA. En el C1 (Figura 9) y el C1' (Figura 10), los valores qh del grupo de PA fueron ligeramente más elevados que los del grupo de PF, lo cual indica que contienen cromosomas con mayor cantidad de HC. Esto demostraría que la HC C adicional pudiera ser un factor trascendental en la etiología de los abortos. Así, Wordermson encontró una elevada frecuencia de 1qh+ en parejas con AH. Sugiere que generalmente cantidades excesivas de secuencias repetitivas pueden tolerarse sin consecuencias, empero, la presencia de PW en el cromosoma 1 en ciertas familias con pérdida fetal pueden generar una no disyunción (298). Además, se ha visto que cuando va aunado a una asociación no fortuita con acrocéntricos se incrementa el tamaño de la misma y el riesgo de AE consecutivos (38). Si las aneuploidías están íntimamente ligadas con los AE, esto podría ser la causa de una alta incidencia de heterocigotos para 1qh+ en PA (249).

Respecto al C9 (Figura 11) y C9' (Figura 12), los histogramas muestran que la frecuencia de los valores qh más elevados es ampliamente superior en las parejas problema que en las testigo. Por tal motivo, grandes regiones de HC en estos cromosomas pueden ser causa de infertilidad. Nielsen y Sillesen señalaron que un 9qh+ en mujeres tiende a incrementar la posibilidad de tener un descendiente con alguna aneuploidía *de novo* o anomalías cromosómicas estructurales, en adición a AE (156). Asimismo, otros trabajos asocian al segmento 9qh con oligospermia, subfertilidad y AH (244,295,320). Ford y Lester mencionan que portadores de regiones enormes de HC en este par tienen una mayor posibilidad de presentar una no disyunción (328).

En las gráficas del C16 (Figura 13) y del C16' (Figura 14), los segmentos qh de las parejas infértiles exhibieron una mayor frecuencia de valores más elevados, que en las parejas con fertilidad comprobada, aunque las medidas centrales fueron favorecidas en los dos grupos. Esto es, en algunas parejas las regiones 16qh+ pueden influir adversamente en su reproducción con una historia de AH. A pesar de contener un bloque pequeño de HC C, se esperaría que el cromosoma 16 no tuviera un efecto directo sobre los posibles mecanismos que desencadenan los AE, ya que

posee una baja concentración de secuencias repetitivas y de un sólo tipo (DNA sat II) (47). La literatura ha reportado pocos casos asociando PN del cromosoma 16 y AH (32). No obstante, los resultados de este trabajo indican que una correlación es posible, pero no es tan importante la cantidad de secuencias en esta región, sino el tipo de secuencia la cual pudiera perturbar la segregación cromosómica.

Como puede observarse (Figura 15), los valores q_h diferenciales entre cromosomas 1 de las PF fueron mayores que los de las PA, pero sin DES entre un grupo y otro. Lo anterior corrobora los hallazgos de Rodríguez y cols. (305). No obstante, Ford y cols. reportaron que el tamaño de la diferencia del par 1 en el grupo problema es más grande que en el grupo testigo (303).

Los valores diferenciales del tamaño del bloque C entre el par 9 (Figura 16), aunque son superiores en las PF, no mostraron DES entre ambos grupos, lo que indica ninguna asociación con el aborto recurrente. De igual manera, Rodríguez y cols. señalaron que tales diferencias q_h entre ambos grupos no son causa de aborto (305). Espero, Ford y cols. asumen que el cromosoma más largo ejerce un efecto negativo sobre el pequeño. Esto se lleva a cabo por un mal apareamiento entre homólogos morfológicamente diferentes más que por un efecto de tamaño (302).

Se ha comprobado que las trisomías autosómicas son de las aberraciones cromosómicas más comunes en AE. Dentro de ellas, las del cromosoma 16 son las más frecuentes, pese a que el material abortado es difícil de detectar en las primeras semanas del embarazo (284,285,288,292). Si la HC C se encuentra incrementada en uno o ambos de estos cromosomas, posiblemente las secuencias comprendidas en esta región también ejerzan un efecto similar al de $1q_h$ y $9q_h$, lo que produciría un desbalance cromosómico en el producto. Sin embargo, las diferencias q_h entre los homólogos C16-C16' (Figura 17) indicaron que no hay DES entre las PF y las PA. Esto es apoyado por el estudio de Rodríguez y cols. (305).

Por otra parte, en las tablas 30 a 32, se comparan las frecuencias observadas por niveles de tamaño (ISCN) de cada región C de los cromosomas 1, 9 y 16 entre los grupos testigo y

problema. En este tipo de análisis, sin embargo, los resultados son diferentes a los ya descritos, a excepción del cromosoma 9. La región C del cromosoma 1 mostró los niveles mayores de tamaño. Para el nivel 3, el mayor porcentaje correspondió a las PA, mientras que los niveles 2 y 4 a las PF (Tabla 30). La longitud C del cromosoma 9 mostró valores diferentes: un gran porcentaje para el nivel 3 concierne al grupo problema, mientras que para el nivel 2 al grupo testigo (Tabla 31). Los segmentos C del cromosoma 16 prácticamente no mostraron DES en sus frecuencias para cualquier nivel entre un grupo y otro, aunque solamente dos individuos de las PA tuvieron un bloque C de nivel 3 (Tabla 32).

Pocos autores han reportado la frecuencia de los EM C por niveles de tamaño (305) en relación al AH y sin hallazgos favorables. Solamente algunos trabajos se han encaminado a obtener la incidencia en poblaciones humanas, tales como la negra (230) y la caucásica (233). En este estudio, los resultados de la prueba de χ^2 de las regiones qh de los cromosomas 1, 9 y 16 por niveles de tamaño fueron obtenidos. En los casos C1 y C16, las cifras de χ^2 fueron 5.42 y 2.51 con una $p > 0.05$, respectivamente. Esto implica que no existe, para estas regiones heterocromáticas, una DES entre las parejas testigo y las parejas con AH. No obstante, el valor de χ^2 de C9 fue de 16.69 siendo la $p < 0.005$, por lo que existe una amplia DES entre las PF y las PA.

Los resultados obtenidos con la prueba de χ^2 por niveles de tamaño sugieren que no existe una correlación de las longitudes qh de los cromosomas 1 y 16 con el AH. Espero, los de la región 9qh asumen que ésta se encuentra íntimamente relacionada con la pérdida del embarazo. Tal vez el segmento sea muy susceptible y genere gametos cromosómicamente anormales, debido a un entrecruzamiento desigual entre las secuencias repetitivas contenidas en esta región. Quizá una no disyunción se lleve a cabo tan temprano que no sea posible detectarla clínicamente. Cabe señalar que, por lo menos, para el cromosoma 1 los datos expresados en los límites de la significancia no escapan de un posible efecto sobre el desarrollo normal del individuo, pues los niveles adjudicados incluyen rangos amplios y no están ajustados para establecer una asociación entre PM con alguna patología, sino una incidencia meramente poblacional.

En esta población, la cantidad de HC en cada uno de estos cromosomas parece ser crítica. Probablemente no es la diferencia que exista entre homólogos, sino más bien la cantidad excesiva de secuencias o de algún tipo de secuencia particular incrementada en ambos lo que repercute, cuantitativa o cualitativamente, en la recombinación cromosómica y, por lo tanto, genere una posible no disyunción. Esto es, el riesgo de AH parece aumentar cuando el individuo es portador de grandes regiones C positivas. También, es plausible que algunos individuos con únicamente una región qh+ no necesariamente estén en riesgo de presentar AH y, por el contrario, sujetos con regiones que posean cantidades moderadas de HC C, pero con concentraciones mayores de secuencias repetitivas particulares, puedan presentar una probabilidad más elevada de AE consecutivos.

Las Var tienen una incidencia relativamente baja en la población general y como algunos informes postulan que no son inofensivas, las cuales se relacionan con la pérdida repentina del embarazo, el significado de éstas es difícil de tasar debido a métodos no uniformes. Por lo anterior, un monitoreo de los cromosomas polimórficos del material abortado será de gran ayuda para aclarar tal asociación (293). Además, microanomalías morfológicamente indistinguibles pueden ser etiológicamente diferentes y algunas de ellas ser translocaciones reales, pero el homólogo que también toma parte en el intercambio, no puede ser identificado (289).

Debe notarse que la ausencia de cualquier cambio detectable en la aptitud reproductiva de los portadores no necesariamente contradice a algunos reportes. En una especie como el hombre, con un alto grado de compensación y éxito reproductivos, los AE tempranos simplemente retardan el siguiente embarazo a término por unos cuantos meses y así, pasan inadvertidos ciertas anomalías menores. Por ejemplo, el radio de segregación y de muerte fetal son consistentes con la probabilidad de AE de un portador, el cual es cerca de dos veces mayor que el de un no portador; aun el efecto en el riesgo reproductivo sería el de ampliar el promedio de tiempo de generación de los portadores por unas cuantas semanas (299).

La etiología de los AE ha sido de mucha importancia y por eso, numerosas hipótesis han tratado de explicar como los diferentes PM C a nivel molecular pueden interferir con el embarazo a término. Kóossar y Mikelsaar son de la opinión de que el estado de la región C puede ser diferente en padres portadores y sus descendientes. Los AE de los primeros pueden ser causados por un desbalance de la HC en los embriones, o bien, contribuir a separaciones cromosómicas anormales al poner en peligro el desarrollo fetal por una "carga genética estructural" (289,290).

Se ha postulado que el incremento de HC en los cromosomas 1 y 9 cercana al cen puede originar un disturbio en la segregación de alguno de ellos durante meiosis (290). Esto es, para inhibir la formación de los quiasmas, la HC C puede provocar una formación ineficiente de los bivalentes, la cual se sitúa al inicio de una segregación cromosómica desigual (45,258). Ahora bien, si regiones 1qh+ y 9qh+ muestran asociación evidente con el AE, es probable que ésta este influenciado por separado o por una interacción de ambas regiones que interfieran con alguna actividad crítica. Es más, los dos homólogos pueden actuar sinérgica o independientemente. Aunque una alta correlación es justificada, un efecto común en meiosis femenina es difícil de concebir como una interacción que opere en el apareamiento o en la segregación. En adición, se ha visto que como 85% de las mujeres con dos AE consecutivos tienen al menos un feto cromosómicamente anormal, se infiere que los portadores son más susceptibles a la no disyunción meiótica (303,328).

Ford y Lester, asumen que los HM influyen en la gametogénesis masculina y femenina, quizá por alteración en la mitosis y/o meiosis. Sus estudios mostraron que células con 9qh+ e IP, además de un número significativo de células hiperploides, incrementan la probabilidad de una mala segregación mitótica in vitro, ya que las fibras del huso acromático sufren una alteración en estructura y función, tras afectarse la unión centromérica. No obstante, no se descarta la posibilidad de que las Var repercutan en la meiosis al reducir la eficacia del apareamiento cromosómico; o bien, que en ciertas condiciones celulares encaminadas a una inestabilidad mitótica puedan predisponer a cambios en la meiosis (328). Asimismo, otras

investigaciones establecan que si el tamaño qh de en uno de los homólogos autosómicos es el doble que el del otro, se correlaciona con retardo en la separación centromérica. Esto es, el cromosoma con la región C más grande tiende a separarse más tardíamente que su homólogo, lo que sugiere que la cantidad del bloque C repercute directamente en el control génico de la disyunción: mecanismo que sería trascendental para explicar el origen de algunas de las trisomías (329).

Las investigaciones concernientes a la región de HC C del cromosoma Y y su asociación con el AE consecutivo son las más controversiales (306-316). El histograma correspondiente al segmento C del cromosoma Y (Figura 18) muestra que no hubo DES entre parejas testigo y parejas con AH, aunque denota una pequeña tendencia en las segundas por tener los valores qh más elevados. Esto implica que la presencia de $Yqh+$ no causa infertilidad. Algunos informes asocian un cromosoma Y largo con riesgo de aborto recurrente (307-310,316). Aun cuando los resultados contradican lo anterior, otros autores opinan que existe una longitud establecida en relación a la función reproductiva (314).

Ahora bien, los resultados de la prueba "U" de Mann-Whitney no mostraron DES entre las poblaciones de PF y de PA, por lo que no existe tampoco correlación alguna entre la longitud de la región qh del cromosoma Y y pérdida repentina del embarazo.

De igual manera, los resultados por niveles de tamaño de la región C del cromosoma Y fueron obtenidos. La frecuencia del nivel 3 fue mayor en el grupo problema, pero menor para el nivel 2 (Tabla 33). El resultado de la prueba de χ^2 de la región C del cromosoma Y fue de 1.85 con una $p > 0.05$. Esto indica que no existen DES entre el grupo de parejas testigo y el de parejas problema, por lo que la presencia de FM del cromosoma Y no es causa de la falla reproductiva en las parejas con AH.

Reportes en la literatura informan tanto de asociaciones negativas como positivas entre el tamaño de Yq distal y parejas con AH (Tabla 34). Esto podría deberse a que la mayoría han sido poco controlados o conducidos inadecuadamente, ya que la

interpretación de los HC C es altamente subjetiva e influenciada por detalles metodológicos y técnicos, desde la elaboración de las preparaciones cromosómicas hasta la realización de las técnicas de medición. Además, no cuentan con un grupo control apropiado, puesto que es preciso definirlo en base a un grupo con fertilidad comprobada. Por otra parte, se ha demostrado que la inclusión de parejas con un feto malformado o con un hijo sano además de historia de pérdida fetal recurrente, se reporta con frecuencia, lo cual dificulta las comparaciones entre un estudio y otro (300,305,314-316).

A pesar de que la variación de Yqh corresponde a la HC C, es posible que también exista variación en la porción de la EC proximal (305,314). Al parecer el grado de contracción está genéticamente controlado y las características de este enrollamiento son heredables. Los cromosomas in vivo presentan parámetros distintos, teniendo grados tridimensionales de densidades fibrosas dependientes de ciclo celular, interacciones con otros cromosomas y una composición inherente DNA-proteínas; esto es, no hay una longitud absoluta establecida. Por ello, deben realizarse mediciones objetivas de los cromosomas en forma espacial para la determinación de más límites. Las variaciones in vitro son influenciadas también por la posición cromosómica (declinante, torcido), estado de contracción, modo de preparación y fluctuaciones tintoriales. Además, el proceso fotográfico puede alterar el tamaño aparente y la subjetividad del observador que evalúa cada mitosis aumentar el grado de error (314).

Cuando se comparan las frecuencias de las longitudes Yqh entre los diferentes laboratorios, la variación mitótica es un parámetro a considerar (305). Si el tamaño del cromosoma Y fuera un factor importante en la falla reproductiva, entonces por el proceso de selección natural los grupos étnicos con un cromosoma Y largo (expresado normalmente como el índice $Y/F \geq 1$) deberían haberse extinguido, ya que las mujeres nunca habrían sido aptas para procrear (315). Contrario a esto, diversas poblaciones humanas que portan un Yqh+, tales como la judía, italiana y española (231,240) así como la hindú y japonesa (236,240), no muestran una mayor tasa de AE consecutivos. Por ello, se sugiere que la variabilidad del cromosoma Y es un PM normal no asociado a

problemas reproductivos (305) y se propone que antes de nombrarlo como "normal o anormal", es preciso definir su tamaño con referencia al de la población general (315).

Asimismo, es probable que un cromosoma Y grande en algunas parejas con AH no afecte la fertilidad del individuo portador, sino la viabilidad del cigoto; o bien, aunque algunos varones posean cromosomas Y con longitudes similares, éstas difieran en su naturaleza y, por lo tanto, en su comportamiento (316).

Por otro lado, la influencia de un cromosoma Y largo sobre la pérdida reproductiva es un asunto de debate, pues parece ser una característica heredable en cantidades restringidas y limitada solamente a algunos portadores con $Yqh+$. (309,310). Otros resultados sugieren que el riesgo de AH es cerca de dos veces mayor en familias con un Y largo (306). En suma, la frecuencia de esta Var en los descendientes daría también información valiosa, particularmente cuando la longitud de Yq distal fuese determinada en los abortos (307,308). Existen evidencias que segmentos recombinantes de DNA repetitivo en la región C tienen homología con el DNA autosómico. A pesar de ignorar una posible función del DNA repetitivo, tanto centromérico como disperso, es coherente que influya en varios niveles, tales como función génica o diferenciación celular (313).

Se ha visto que los acrocéntricos pequeños y el cromosoma Y se contraen proporcionalmente menos durante mitosis, haciéndose más elongados (209). Si es así, las variaciones en longitud serían menores que en los demás cromosomas, por lo que la observación de un $Yqh+$ en portadores es un rasgo normal, pero con una longitud óptima en cuanto a la función reproductiva. No es aventurado postular que la HC adicional o la carencia de ella pudiera afectar el apareamiento a nivel del huso acromático y guiar a una aneuploidia (314). Alternativamente, la variación en el Y sería también en la EC, a expensas de la cantidad de HC (313). Por ello, eventos tempranos en el desarrollo o en la meiosis paterna podrían afectar gravemente la funcionalidad de un gen, causando una deficiencia o una duplicación (314). Esta última, es más probable que suceda por una amplificación de una secuencia más que por una translocación (127,160).

Las discrepancias entre mujeres abortadoras y la incidencia de AE en familias con Yqh+ similares pueden explicarse por diversos mecanismos: a) resultado de una elongación del DNA junto con cambios conformacionales que expliquen la alteración de secuencias de DNA sat específicas (316,330) y b) un efecto de posición resultado de un rearrreglo cromosómico, en el cual los genes cercanos a la HC proximal sean dañados (316). También, se ha postulado que el riesgo de pérdida fetal está determinado por la integración eventual de DNA viral y no por la cantidad de secuencias repetitivas. Ello explica porqué sujetos con otros RM del cromosoma Y morfológicamente similares no presentan una historia de falla reproductiva recurrente (309).

A este respecto, la integración de DNA viral en el segmento Yqh puede ser un hecho, ya que la resistencia o susceptibilidad a ciertos virus parece estar también en las NOR de acrocéntricos. Lo anterior se justifica por los defectos congénitos que son eventualmente causados in utero por la inserción viral. El efecto teratogénico resultante puede ser diferente de acuerdo a la capacidad génica e inmunocompetencia del embrión. Así, estos factores pueden asociarse a los PM C por vías múltiples. También, el tamaño de las NOR puede tener un significado importante en la no disyunción de los acrocéntricos, principalmente, del cromosoma 21 (92). Algunos estudios han reportado Var con doble NOR que quizá estén relacionadas con riesgo elevado de trisomía 21 regular. Por lo anterior, se menciona que los cromosomas del grupo D y G son de los últimos en separarse del plano ecuatorial durante la disyunción cromosómica humana (331).

En este trabajo, no pudo ser evaluado el grado de PM de los cromosomas acrocéntricos, establecer la frecuencia poblacional mestiza mexicana y tal vez una asociación con la pérdida fetal en las parejas con infertilidad, por lo que un estudio a fondo es necesario. Pocas investigaciones al respecto se han realizado en relación con esta patología (319) y a pesar de no contar con resultados contundentes, no se descarta la posibilidad de que en estas regiones polimórficas también existan secuencias específicas que influencien la segregación cromosómica. Además, es probable que la susceptibilidad a ciertos virus, por integración en tales zonas, tanto en secuencias altamente

repetitivas como NOR, en adición a una posible amplificación de algunas de ellas, sea un mecanismo por el cual los eventos de no disyunción repercutan en la fertilidad de las parejas.

Finalmente, de las 21 parejas examinadas con AH, 6 presentaron una IP de la región heterocromática del cromosoma 9 (28.57%) (Figura 19). De éstas, 3 correspondieron a individuos de sexo femenino y las otras 3 a individuos masculinos (Tabla 35). En el grupo testigo, únicamente una pareja tuvo una IP del cromosoma 9 (4.0%), correspondiente a un individuo de sexo femenino (Figura 20): 46,XX,inv(9)(p11q12).

En el grupo problema se obtuvieron las frecuencias de los diferentes tipos de IP del cromosoma 9 por niveles de inversión (Tabla 36), al seguir estrictamente la clasificación de la tabla 16 (capítulo IV.D.2.c), donde la mayor frecuencia correspondió al nivel 1 (No inversión: NI). La tasa de IP del grupo de PA fue de 6/42 individuos (14.29%), mientras que sólo hubo un sujeto del grupo testigo con IP de la región 9qh (2.0%) y que correspondió al nivel 3 (HI). Al aplicar la prueba de χ^2 , los resultados mostraron un valor de 4.89, $p < 0.05$. Esto demuestra una clara DES entre ambos grupos dentro de la población mestiza mexicana.

La existencia de IP en nuestro medio y el índice de asociación con el AH en este estudio es claro. Del total de parejas analizadas con AE consecutivos, la frecuencia de aparición en ambos sexos fue de 50% en cada uno, lo que implica que un sujeto puede tener una IP independientemente del sexo. A pesar de que los datos muestran una evidente DES entre las poblaciones examinadas, las regiones de HC C de las PA comprenden un grupo muy heterogéneo de IP de casi todos los tipos. Ambos aspectos analíticos establecen que las IP del cromosoma 9 son un factor causal en la producción de varios de los AE.

No se sabe a ciencia cierta como las inv(9) se relacionan directamente con el AH; se consideran aparentemente Var normales, las cuales tienen una frecuencia de 1% en la población general (289,290). Empero, el riesgo de los portadores con IP puede depender de donde ocurran los puntos de ruptura, la distancia de estos últimos al cen y la frecuencia de entrecruzamiento con la

inversión. Estos pueden ser factores que afecten la formación de cromosomas recombinantes. Así, no es posible generalizar que las inv(9) sean comunes y consideradas como PM C normales (323). Parece ser que las IP proceden de un ancestro común: están ampliamente distribuidas en las diferentes étnias y permiten distinguir morfológicamente varios tipos de cromosomas invertidos. Moorhead, asume que: a) éstas no causan anomalías fenotípicas, b) la proporción de los descendientes clínicamente anormales debido a un entrecruzamiento desigual en la duplicación inducida es pequeña, c) la infertilidad en portadores es poco común y d) los eventos de no disyunción resultantes de interacciones de regiones C pueden ser coincidencia (332).

En estos individuos, posiblemente los puntos de ruptura y reunión son los realmente críticos. Esto podría ser el resultado de diversos mecanismos que dan como consecuencia una variedad de fallas reproductivas, debido a un desbalance génico en el portador o en el cigoto (322). En realidad, no significa que las IP que implican mayor cantidad de HC C en los brazos cortos sean las que tienen mayor probabilidad de originar una aparente segregación desigual durante la división celular. Lo anterior se explica por los resultados obtenidos, donde el único sujeto testigo presentó una IP media (nivel 3), mientras que tres individuos del grupo problema tuvieron una IP menor (nivel 2).

La función de la HC C es aún desconocida y, por lo tanto, el significado biológico de los PM C, en especial, los implicados en las IP no son mera casualidad. Reportes en la literatura informan que la relación de las inv(9) con el AE consecutivo no es clara (Tabla 37). Es importante recalcar que en la mayoría de los estudios no se realizó un adecuado análisis comparativo y algunos parámetros a considerar debieron ser: 1) la población normal equivalente a la examinada, 2) la población problema con amplio conocimiento de su historia obstétrica y 3) las parejas evaluadas como una unidad (296). No obstante, la mayoría asumen una correlación entre inv(9) y AH. Además, algunos aspectos de la pérdida reproductiva en ciertas parejas portadoras pueden estar ligados también con anomalías cromosómicas (241,258) y múltiples malformaciones durante el desarrollo embrionario (251,295).

Es más, algunos autores han reportado que grandes periodos de esterilidad se dan con mayor frecuencia cuando el portador de la inv(9) es el varón. Esto puede reflejar que anomalías en la espermatogénesis o cigotos detenidos tempranamente lleven a fertilizaciones no detectables. Sin embargo, efectos deletéreos en la espermatogénesis por translocaciones balanceadas se han reportado, no así por inversiones (320).

Estudios del segmento 9qh con tinción específica sugieren la existencia de actividad génica durante la primera división meiótica masculina (paquiteno) (337). Asimismo, en la profase del ovocito (diploteno), la asociación de material micronuclear con esta región indica también actividad génica, dada por la formación de mRNA (338). Parece ser que una inversión o rearrreglo en el bloque 9qh puede tener consecuencias en la primera división meiótica. Además, algunos aspectos de falla reproductiva quizá estén ligados con cromosopatías, tales como: a) disminución cuantitativa de la espermatogénesis, b) riesgo de no disyunción meiótica en otros pares cromosómicos y c) disturbios en la síntesis de mRNA durante meiosis, debido a cambios metabólicos que dan como resultado malformaciones congénitas. No obstante, el apareamiento de los homólogos, sólo se establece mediante la formación de inversiones en asa (301,320).

Si las variaciones de tamaño de estas regiones C se relacionan con puntos de ruptura vulnerables, algunas de ellas pueden ser más propensas a ruptura y reunión, especialmente, las que se encuentran cercanas a la unión EC-HC. También, una posición espacial propia de la región 9qh durante la interfase puede resultar en ruptura y reunión simultáneas en estos dos puntos. Se postula que cuando un entrecruzamiento meiótico en un segmento invertido origina gametos desbalanceados, la fertilidad por "aneusomía de recombinación" puede reflejar detenciones muy tempranas del cigoto, la fertilización permanece indetectable y las no subsiguientes fertilizaciones simulan esterilidad o AE no detectados. A pesar de que ninguna aneusomía de recombinación se ha visto en descendientes de familias con inv(9), tanto en neonatos como en productos abortados, se especula que este evento es raro o ausente en las secuencias repetitivas (320).

Tabla 25. Promedios y Desviación Estandar de las Regiones Polimórficas de los Cromosomas 1, 1', 9, 9', 16, 16' e Y en los Grupos de Parejas Abortadoras (PA) y Parejas Fértiles (PF).

| Grupo | C1 | C1' | C9 | C9' | C16 | C16' | CY | |
|-------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| PA | \bar{x} = | 1.185 | 1.008 | 1.031 | 0.861 | 0.740 | 0.595 | 0.948 |
| | DE = | 0.148 | 0.129 | 0.140 | 0.167 | 0.131 | 0.129 | 0.158 |
| PF | \bar{x} = | 1.145 | 0.936 | 0.948 | 0.766 | 0.675 | 0.548 | 0.913 |
| | DE = | 0.170 | 0.137 | 0.127 | 0.110 | 0.097 | 0.091 | 0.189 |

Tabla 28. Rango de Variación de la Longitud Promedio de los Segmentos de HC C de los Cromosomas 1, 9, 16 e Y entre Parejas Abortadoras y Parejas Fértiles por Sexo.

| Cromosoma | Parejas Abortadoras | | Parejas Fértiles | |
|-----------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | M | F | M | F |
| 1 | (0.873-1.492)=0.619* | (0.964-1.512)=0.548 | (0.911-1.776)=0.865 | (0.791-1.582)=0.791 |
| 1' | (0.789-1.284)=0.485 | (0.694-1.193)=0.499 | (0.663-1.450)=0.767 | (0.699-1.256)=0.557 |
| 9 | (0.720-1.342)=0.622 | (0.772-1.311)=0.539 | (0.735-1.336)=0.601 | (0.748-1.202)=0.454 |
| 9' | (0.502-1.174)=0.672 | (0.453-1.211)=0.758 | (0.585-1.048)=0.463 | (0.504-0.990)=0.486 |
| 16 | (0.521-1.035)=0.514 | (0.408-1.096)=0.688 | (0.484-0.885)=0.401 | (0.487-0.861)=0.374 |
| 16' | (0.328-0.850)=0.522 | (0.335-0.920)=0.585 | (0.416-0.788)=0.372 | (0.453-0.705)=0.252 |
| Y | (0.678-1.201)=0.523 | | (0.667-1.458)=0.791 | |

* = Diferencia de los valores extremos.

Tabla 27. Datos Correspondientes a los Valores de N1, N2, R1 y R2 así como de U, U', S, p y 2p de los Segmentos C de cada Cromosoma y Diferencias entre Homólogos.

| | C1 | C1' | C9 | C9' | C16 | C16' | CY | C1-C1' | C9-C9' | C16-C16' |
|----|------|------|------|------|------|------|------|--------|--------|----------|
| N1 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 21 | 42 | 42 | 42 |
| N2 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 25 | 50 | 50 | 50 |
| R1 | 2160 | 2316 | 2331 | 2364 | 2272 | 2199 | 540 | 1872 | 1845 | 2097 |
| R2 | 2118 | 1962 | 1947 | 1914 | 2006 | 2079 | 541 | 2406 | 2433 | 2181 |
| T | 4278 | 4278 | 4278 | 4278 | 4278 | 4278 | 1081 | 4278 | 4278 | 4278 |

Tabla 28. Resultados de la PRUEBA "U" DE MANN - WHITNEY.

| | U | U' | S | p | 2p |
|----------|------|------|--------|-------|-------|
| C1 | 824 | 1257 | -1.623 | 0.053 | 0.105 |
| C1' | 687 | 1413 | -2.845 | 0.002 | 0.005 |
| C9 | 672 | 1428 | -2.963 | 0.002 | 0.003 |
| C9' | 639 | 1461 | -3.222 | 0.000 | 0.000 |
| C16 | 731 | 1369 | -2.501 | 0.006 | 0.012 |
| C16' | 884 | 1296 | -1.928 | 0.027 | 0.054 |
| CY | 216 | 309 | -1.025 | 0.154 | 0.308 |
| C1-C1' | 1131 | 969 | 0.635 | 0.261 | 0.522 |
| C9-C9' | 1158 | 942 | 0.847 | 0.198 | 0.396 |
| C16-C16' | 906 | 1194 | -1.129 | 0.129 | 0.258 |

Tabla 29. Análisis de los Estudios al Estimar la Relación entre Heteromorfismos de la Región "qh" de los Cromosomas 1, 9 y 16 y Aborto Habitual (AH).

| HM C | TAMANO POBLACIONAL | NUMERO DE CELULAS/ PERSONA | METODO DE MEDICION | METODO ESTADISTICO | RELACION ENTRE HM C y AH | REFERENCIA |
|--------------|---------------------------------------|----------------------------|--------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------|
| qh | 80 PA | 5 | Subjetivo | χ^2 | + | 295 |
| 1qh+ 9qh+ | 50 PA. 50 PF | 2 | Objetivo | χ^2 | - | 296 |
| 16qh+ | 180 ind. con AH, ind. fértiles (?) | 7 | Subjetivo | "t" | + | 297 |
| 1qh+ | 20 PA. 11 PF | 1 | Subjetivo | ? | + | 298. |
| qh | 184 ind. con AH, 165 ind. fértiles | 15 | Objetivo | Pearson, "t" y "U" | - | 300 |
| qh | 110 PA | 20 | Subjetivo | ? | + | 301 |
| 9qh+ | 58 M con AH, 100 M fértiles | 1 | Objetivo | "U", "t" y Anál.Var. | + | 302 |
| 1qh-9qh | 54 M con AH, 100 M fértiles | 1 | Objetivo | "U" | + | 303 |
| qh | 15 PA. 15 PF | 20-25 | Objetivo | Análisis de Varianza | - | 304 |
| qh | 100 PA. 106 PF | 5 | Objetivo | "U" y "t" | - | 305 |
| qh | 21 PA. 25 PF | 8-10 | Objetivo | "U" y χ^2 | + | Presente Estudio |

PA = parejas abortadoras; PF = parejas fértiles; M = mujeres; ind.= individuos.

Tabla 30. Comparación de las Frecuencias de los Heteromorfismos de los Cromosomas 1 y 1' entre Parejas Abortadoras (PA) y Parejas Fértiles (PF) por Sexo.

| Sexo | Niveles de Tamaño | | | | | | | | | | | |
|------------|-------------------|----|--------|----|----------------|----|--------|----|------------|----|-------|----|
| | Pequeño (2) | | | | Intermedio (3) | | | | Grande (4) | | | |
| | PA | | PF | | PA | | PF | | PA | | PF | |
| | 1 | 1' | 1 | 1' | 1 | 1' | 1 | 1' | 1 | 1' | 1 | 1' |
| Masculino | 3 | 11 | 4 | 19 | 18 | 10 | 20 | 6 | | | | 1 |
| Femenino | 1 | 10 | 4 | 18 | 19 | 11 | 20 | 7 | 1 | | | 1 |
| Subtotal | 4 | 21 | 8 | 37 | 37 | 21 | 40 | 13 | 1 | | | 2 |
| Total | 25 | | 45 | | 58 | | 53 | | 1 | | 2 | |
| Porcentaje | (29.76) | | (45.0) | | (69.05) | | (53.0) | | (1.19) | | (2.0) | |

Tabla 31. Comparación de las Frecuencias de los Heteromorfismos de los Cromosomas 9 y 9' entre Parejas Abortadoras (PA) y Parejas Fértiles (PF) por Sexo.

| Sexo | Niveles de Tamaño | | | | | | | | | | | |
|------------|-------------------|----|----|----|-------------|----|--------|----|----------------|----|--------|----|
| | Muy Pequeño (1) | | | | Pequeño (2) | | | | Intermedio (3) | | | |
| | PA | | PF | | PA | | PF | | PA | | PF | |
| | 9 | 9' | 9 | 9' | 9 | 9' | 9 | 9' | 9 | 9' | 9 | 9' |
| Masculino | | | | | 9 | 15 | 18 | 24 | 12 | 6 | 7 | 1 |
| Femenino | 1 | | | | 10 | 17 | 19 | 25 | 11 | 3 | 6 | |
| Subtotal | 1 | | | | 19 | 32 | 37 | 49 | 23 | 9 | 13 | 1 |
| Total | 1 | | | | 51 | | 86 | | 32 | | 14 | |
| Porcentaje | (1.19) | | | | (60.71) | | (86.0) | | (38.1) | | (14.0) | |

Tabla 32. Comparación de las Frecuencias de los Heteromorfismos de los Cromosomas 16 y 16' entre Parejas Abortadoras (PA) y Parejas Fértiles (PF) por Sexo.

| Sexo | Niveles de Tamaño | | | | | |
|------------|-------------------|--------------|--------------|--------------|----------------|--------------|
| | Muy Pequeño (1) | | Pequeño (2) | | Intermedio (3) | |
| | PA 16 16' | PF 16 16' | PA 16 16' | PF 16 16' | PA 16 16' | PF 16 16' |
| Masculino | 6 | 2 12 | 20 15 | 23 13 | 1 | |
| Femenino | 1 4 | 1 | 19 17 | 25 24 | 1 | |
| Subtotal | 1 10 | 2 13 | 39 32 | 48 37 | 2 | |
| Total | 11 | 15 | 71 | 85 | 2 | |
| Porcentaje | (13.1) | (15.0) | (84.52) | (85.0) | (2.38) | |

Tabla 33. Comparación de las Frecuencias de los Heteromorfismos del Cromosoma Y entre Parejas Abortadoras (GP) y Parejas Fértiles (GT).

| Niveles de Tamaño | Grupo Problema (8) | | Grupo Testigo (8) | |
|-------------------|--------------------|---------|-------------------|--------|
| Pequeño (2) | 12 | (57.14) | 19 | (76.0) |
| Intermedio (3) | 9 | (42.86) | 6 | (24.0) |
| Total | 21 | | 25 | |

Tabla 34. Análisis de los Estudios en Diferentes Poblaciones que Sugieren una Relación entre la Longitud de la Región "qh" del Cromosoma Y y Aborto Habitual.

| DEFINICION (GP/GT) | TECNICA DE MEDICION | METODO ESTADISTICO | FRECUENCIA DEL GP (%) | FRECUENCIA DEL GT (%) | RELACION | REFERENCIA |
|-----------------------------|---------------------|----------------------------|------------------------|-----------------------|----------|---------------------|
| 2 o más AEC/ sin AK | Y/20 | "t" (P=0.025) | 19.6 | 98.4 | - | 300 |
| 2 o más AEC/ 2 IS | Y/F | "U" | 88.0 | 81.0 | - (?) | 305 |
| 3 o más AEC/ < 2 AEC | Y/F ≥ 1 | χ^2 (P<0.05) | 10.3 | 1.9 | + | 307 |
| En ambos AK (?) | Y/F ≥ 1 | χ^2 (Yates) | 1.0 | 0.0 | + | 308 |
| 2 o más AEC | Y/F | ? | 19.6 | <1.5 | + | 309 |
| 2 o más AEC | Y/F ≥ 1 | ? | 18.8 | ? | + | 310 |
| 2 o más AEC/ Ind. con RM | Y/20 ≥ 1 | χ^2 , Fisher y "t" | 80.6 | 81.2 | - (?) | 313 |
| 3 o más AEC/ 1 o más IS | Y/20 | χ^2 | 0.96 | 0.91 | - (?) | 314 |
| 3 o más AEC/ sin AK | Y/F > 1 | Anál. Var. (P<0.05) | 1.046 | 1.068 | - | 315 |
| 2 o más AEC | Y/F | χ^2 (P=0.005) | 65.4 | 23.3 | + | 316 |
| 2 o más AEC/ sin AK e IS | Y/16p | "U" y χ^2 (P<0.05) | 57.14 (2) 42.86 (3) | 76.0 24.0 | - (?) | Presente Estudio |

AK= abortos espontáneos consecutivos; GP= grupo problema; GT= grupo testigo; IS= infantes sanos; Ind. Individuos; RM= retraso mental; (?)= nivel pequeño; (3)= nivel intermedio.

Tabla 35. Historia Reproductiva y Resultado de los Cariotipos de las Parejas Abortadoras con una Inversión Pericéntrica del Cromosoma 9.

| Pareja No. | No. Abortos Espontáneos | Cariotipo | |
|---------------|----------------------------|----------------------|----------------------|
| | | Femenino | Masculino |
| 1 | 2 | N | 46,XY,inv(9)(p11q12) |
| 2* | 3 | 46,XX,inv(9)(p11q12) | N |
| 3 | 2 | N | 46,XY,inv(9)(p11q12) |
| 4 | 3 | N | 46,XY,inv(9)(p11q12) |
| 5 | 3 | 46,XX,inv(9)(p11q12) | N |
| 6 | 2 | 46,XX,inv(9)(p11q12) | N |

N = Normal.

* = Después del segundo aborto tuvieron un hijo con Sx. Down.

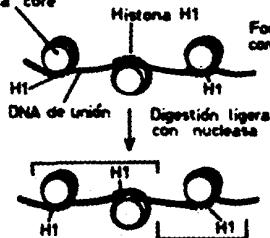
Tabla 36. Frecuencias de los Distintos Tipos de Inversión Pericéntrica por Niveles de Inversión (Ver Tabla 16) del Cromosoma 9 del Grupo Problema por Sexo.

| Sexo | Niveles de Inversión | | | | |
|------------|----------------------|---------|--------|---------|--------|
| | 1 (NI) | 2 (MIN) | 3 (HI) | 4 (NAJ) | 5 (CI) |
| Masculino | 18 | 2 | | | 1 |
| Femenino | 18 | 1 | 1 | | 1 |
| Total | 36 | 3 | 1 | | 2 |
| Porcentaje | 85.71 | 7.14 | 2.38 | | 4.77 |

Tabla 37. Frecuencia de Inversiones Pericéntricas de 9qh en Parejas Abortadoras y en Parejas Fértiles de la Literatura y de Este Estudio.

| Parejas Abortadoras | | Parejas Fértiles | | Correlación | Referencia (año) |
|---------------------|-------|------------------|------|-------------|------------------|
| (#) | (%) | (#) | (%) | | |
| 50 | 28.0 | 50 | 22.0 | NO | 296 (1979) |
| 37 | 5.4 | ? | | ? | 328 (1980) |
| 145 | 2.76 | ? | | ? | 329 (1980) |
| 42 | 9.5 | ? | | SI | 330 (1980) |
| 100 | 2.0 | 92 | 1.1 | ? | 331 (1980) |
| 110 | 5.4 | 1589 | 1.3 | SI | 301 (1982) |
| 52 | 5.17 | 100 | 1.0 | SI | 302 (1982) |
| 100 | 16.84 | 106 | 9.92 | NO ? | 305 (1987) |
| 21 | 28.57 | 25 | 4.0 | SI | Presente Estudio |

Octámero de histonas de la partícula "core"



Forma de la cromatina como "cuentas de un rosario"

Figura 1. El nucleosoma es la unidad básica de la Cromatina (200 pb de DNA) (5).

Distancia entre cortes = múltiplo de 200 pb

Digestión más prolongada con nucleasa

Partícula central o "core"



(146 bp DNA & 8 histonas)

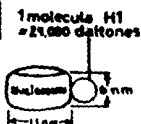
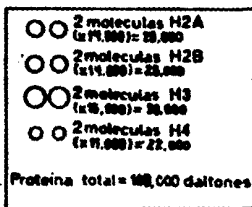
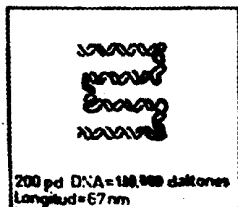


110 Å

H1 liberada



Figura 2. El Nucleosoma Consiste de Aproximadamente igual Masa de DNA que de Histonas (Incluyendo H1) (2).



Pares de bases

800
600
400
200

Dirección de migración

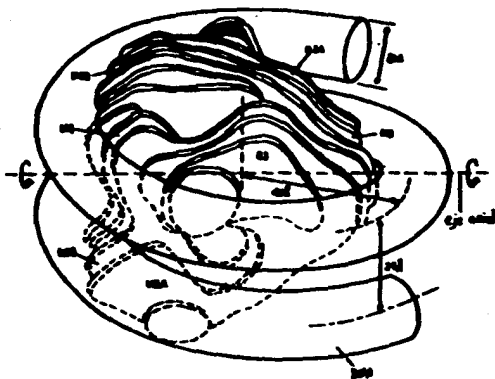


Figura 3. Estructura Tridimensional de la Partícula "central" del Nucleosoma con Aproximadamente 146 pb de DNA (5,7).

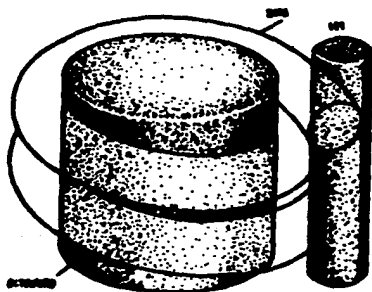


Figura 4. Representación de la Partícula "central" con la participación de la Histona H1 (Nucleosoma) (3,7).

Figura 5. Fibra de Cromatina de 30 nm de Ancho, la cual Posee 6 Nucleosomas por Vuelta y Organizada en Forma Espiral (Modelo del Solenoide) (2).

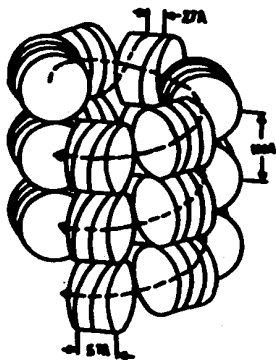


Figura 6. Estructura Cromosómica en Estado Desespiralizado y su Relación con las Bandas (24):



- A. Heterocromatina Constitutiva Perinucleolar y Pericentromérica.
- B. Constricción Secundaria del Organizador Nucleolar.
- C. Constricción Primaria o Centrómero.
- D y E. Principales Bandas y Subbandas, las cuales Contienen los - Genes Informativos.
- F. Bandas G Claras Donde se Encuentran los Genes Estructurales.

FIGURA 9. HISTOGRAMA DE LOS VALORES CORRESPONDIENTES DEL CROMOSOMA 1 (C1)

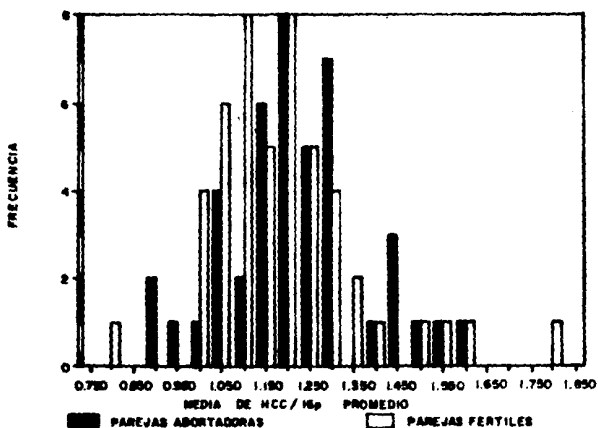


FIGURA 10. HISTOGRAMA DE LOS VALORES CORRESPONDIENTES AL HOMOLOGO DEL CROMOSOMA 1 (C1')

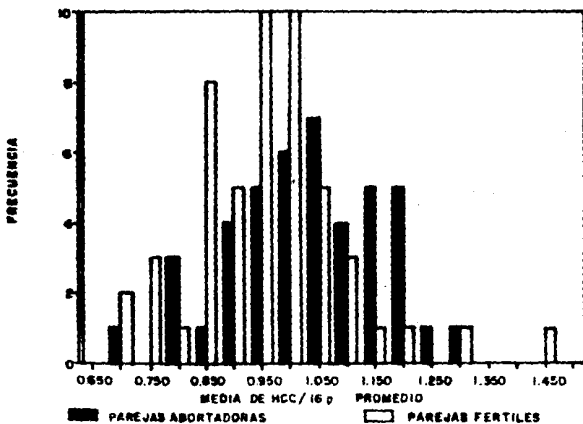


FIGURA 11. HISTOGRAMA DE LOS VALORES CORRESPONDIENTES DEL CROMOSOMA 9 (C9)

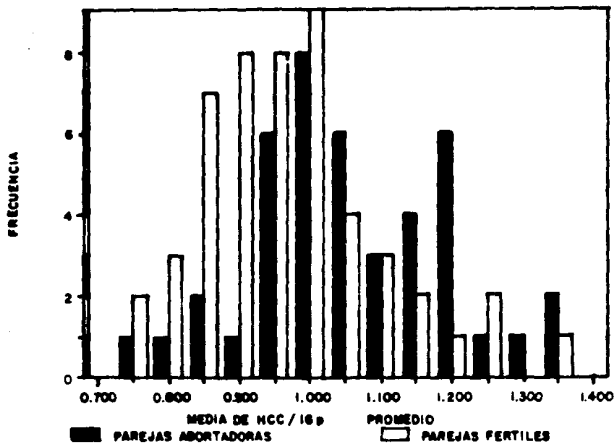


FIGURA 12. HISTOGRAMA DE LOS VALORES CORRESPONDIENTES AL HOMOLOGO DEL CROMOSOMA 9 (C9')

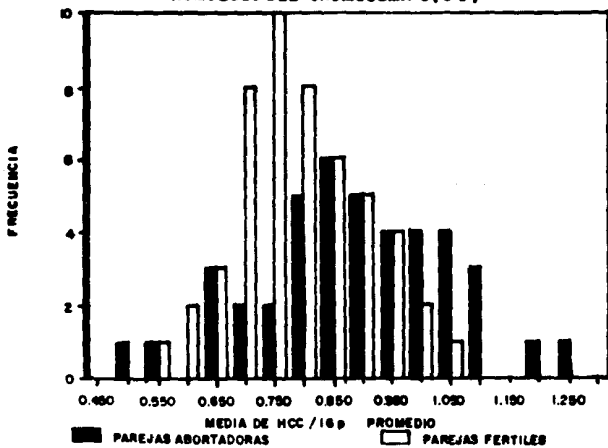


FIGURA 13. HISTOGRAMA DE LOS VALORES CORRESPONDIENTES DEL CROMOSOMA 16 (C 16)

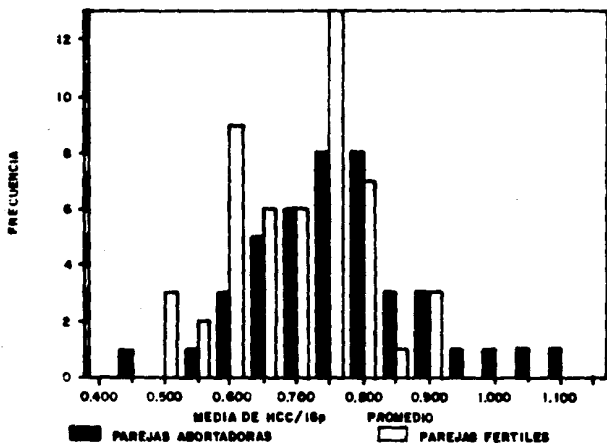


FIGURA 14. HISTOGRAMA DE LOS VALORES CORRESPONDIENTES AL HOMÓLOGO DEL CROMOSOMA 16 (C 16')

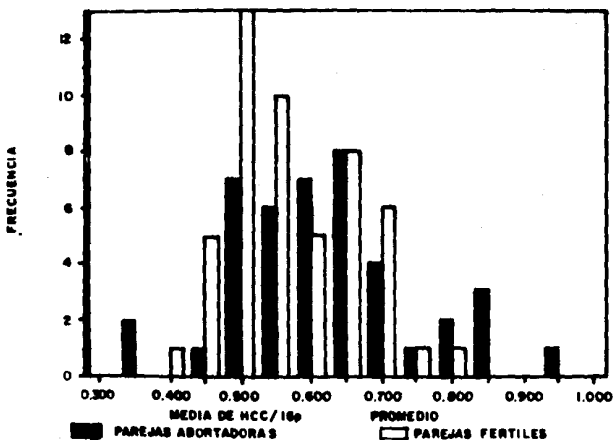


FIGURA 15. HISTOGRAMA DE LOS VALORES CORRESPONDIENTES A LAS DIFERENCIAS DE LOS CROMOSOMAS 1 (C1-C1)

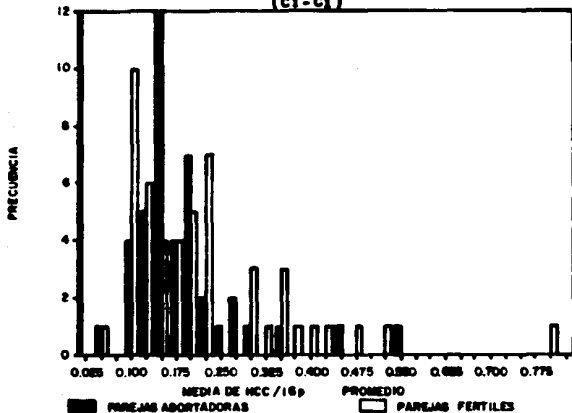


FIGURA 16. HISTOGRAMA DE LOS VALORES CORRESPONDIENTES A LAS DIFERENCIAS DE LOS CROMOSOMAS 9 (C9-C9)

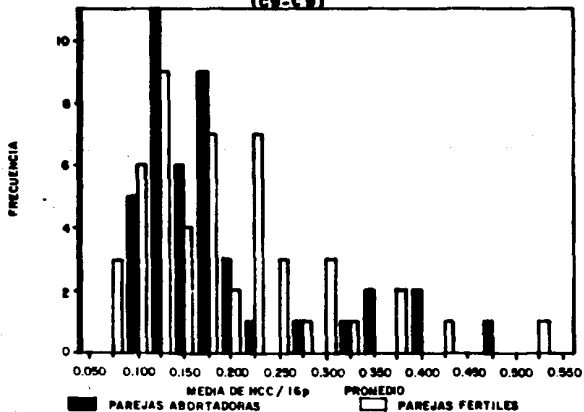


FIGURA 17. HISTOGRAMA DE LOS VALORES CORRESPONDIENTES DE LAS DIFERENCIAS DE LOS CROMOSOMAS 16 (C16 - C16)

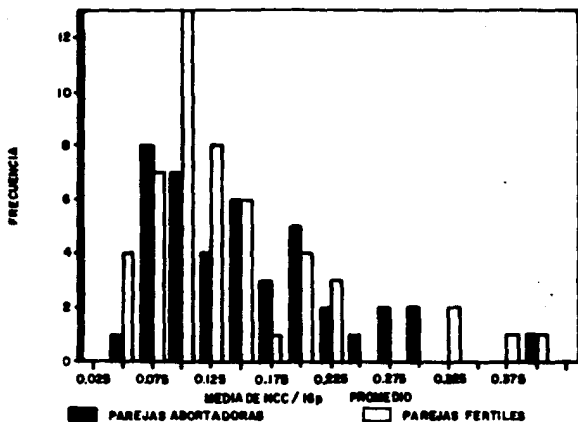


FIGURA 18. HISTOGRAMA DE LOS VALORES CORRESPONDIENTES DEL CROMOSOMA Y

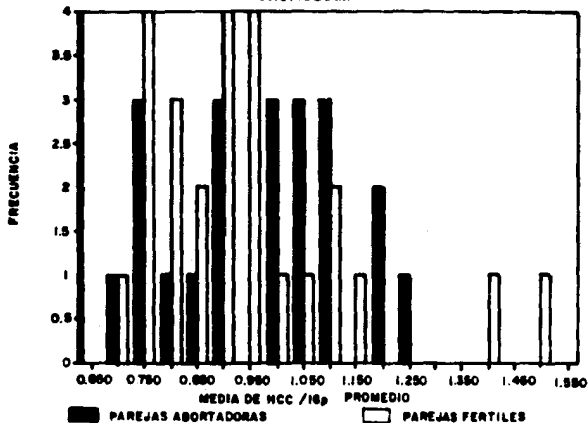


Figura 19. Cariotipos Parciales con Inversión Pericéntrica de la Región 9qh en las Parejas Abortadoras con Técnica de Bandas CBG (Ver Tabla 35).

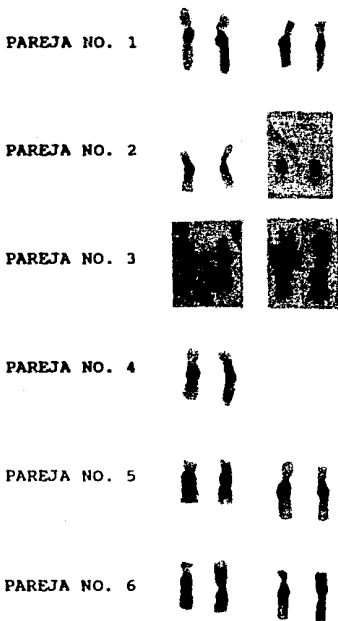


Figura 20. Cariotipo de un Individuo de Sexo Femenino del Grupo Control con Inversión Pericéntrica media de 9qh (Nivel 3 = HI) con Técnica de Bandas CBG.



IX. CONCLUSIONES.

Los HC C son variaciones morfológicas del cariotipo. En éstos se ha visto que tienen una frecuencia particular y están distribuidos en los diferentes grupos étnicos. Contienen secuencias altamente repetitivas, especialmente DNA sat, en diversas proporciones para cada región C. Su composición demuestra que son zonas carentes de actividad génica, con replicación tardía y un elevado porcentaje de asociación con otras regiones similares; no obstante, existen algunas excepciones en la diversidad de las especies.

En las últimas décadas, a estos marcadores no se les consideraba con un rasgo importante que repercutiera en el fenotipo. Sin embargo, los hallazgos citogenéticos y de biología molecular han demostrado que un incremento en la cantidad de HC C en algunos de los cromosomas polimórficos y desórdenes en el desarrollo son el resultado de un mecanismo común, aunque pudieran no estar relacionados como causa y efecto, sino como fenómenos coexistentes.

Los cambios cuantitativos en la HC en los límites del cariotipo normal se relacionan con el fenotipo de cada población. En este estudio, la evaluación de las regiones polimórficas fue realizado por un método de medición, al tomar en cuenta la longitud de cada segmento qh de los pares cromosómicos 1, 9 y 16 y del cromosoma Y. Al parecer los métodos comparativos, principalmente los visuales, son un tanto subjetivos; empero, los resultados exhiben un buen control de calidad de las mediciones.

Los análisis estadísticos de cada región qh demuestran que:

- 1) El aumento en la cantidad de HC C presente en los cromosomas 1 de las PA no es la causa de los AE consecutivos, ya que no existen DES con respecto a las PF. No obstante, se presume que ciertos individuos pueden presentar consecuencias deletéreas. Esto depende de los valores expresados por las cantidades variables de HC C, ya que se encuentran entre los límites de la significancia estadística.

2) El incremento en la cantidad de HC C presente en los cromosomas 9 de las parejas con AH son causa de aborto recurrente, ya que existen amplias DES en relación con las parejas testigo. Esto implica que para estos segmentos, cantidades elevadas de secuencias repetitivas tienen un efecto adverso sobre la aptitud reproductiva del individuo.

3) Las regiones de HC C de los cromosomas 16 no muestran cantidades elevadas, a pesar de tener una ligera DES dentro de los límites estadísticos entre un grupo y otro. Por ello, no es posible afirmar que el contenido de secuencias incrementadas en tales áreas sea el responsable de la pérdida fetal recurrente, sino más bien, por el tipo de secuencias que contiene.

4) La cantidad de HC C del cromosoma Y no es un factor que repercuta en la falla reproductiva de las parejas con AE consecutivos. Los valores de la región Yqh de los varones infértiles y varones sanos no muestra DES evidentes; no obstante, no se descarta la posibilidad que algunas secuencias repetitivas particulares si puedan influenciar la pérdida fetal.

5) Las diferencias de cantidad de HC C entre homólogos de los tres pares cromosómicos 1, 9 y 16 no son causa de AH.

6) La presencia de HM con IP del cromosoma 9 puede influir directamente en la pérdida repentina del embarazo. Se exhiben DES en sus frecuencias entre el grupo de PF y PA. Sin embargo, todo depende de donde ocurran los puntos de ruptura, ya que sólo algunos sitios son vulnerables y pudiera ser que sean los que realmente repercutan en esta patología. Esto se justifica debido a que sólo un individuo del grupo testigo tuvo una IP media (nivel 3), mientras que tres individuos del grupo problema presentaron una IP menor (nivel 2).

Por lo anterior, se asume que los PM C son entidades que pueden repercutir en la fertilidad de las parejas, aunque la cantidad de HC y tipo de secuencias en cada región polimórfica parecería ser crítica. Además, el efecto no es tanto por la diferencia que exista entre homólogos, sino más bien por las elevadas concentraciones de secuencias contenidas en estas zonas

o algún tipo de secuencia particular que determine, cualitativa o cuantitativamente, el riesgo de presentar aborto recurrente en el individuo portador. De igual manera, algunos puntos de ruptura y reunión en donde ocurran las inversiones son quizá trascendentales para producir los AE consecutivos y/o, probablemente, los productos malformados.

Es posible que la presencia de HM pueda interferir con la división celular y generar defectos en el desarrollo por varios mecanismos. Estos últimos pueden ser el resultado de un cambio génico, una mutación en el sitio de ruptura o pequeñas duplicaciones o deleciones. La presencia de grandes áreas heterocromáticas cercanas al cen puede producir disturbios en la segregación de los cromosomas. Las Var menores también pueden influenciar la segregación por vía similar.

Por otro lado, los HM C algunas veces pueden ser un factor trascendental de los defectos congénitos. Los mecanismos propuestos son sólo conjeturas y difíciles de verificar. La especificidad de la distribución de los diferentes DNA sat puede tener una función en el reconocimiento de procesos de recombinación cromosómica y pueden ser críticos para el apareamiento entre homólogos durante meiosis, mitosis o interfase. Un entrecruzamiento desigual entre homólogos durante meiosis o mitosis puede generar cromosomas con cantidades mayores o menores de HC y eventos similares de recombinación pueden suceder entre regiones homólogas y no homólogas. Tales eventos, pueden relacionarse con la aposición de secuencias palindrómicas y ocurrir durante la replicación del DNA; también en células somáticas, son en donde potencialmente pueden originarse HM.

En una gran variedad de plantas y animales, la recombinación meiótica es reducida en la EC que yace en la vecindad de la HC. Pero, por otro lado, la presencia de HC adicional en un sólo cromosoma puede incrementar los valores de recombinación de las regiones aledañas de EC en otros cromosomas. El cen también puede ser gravemente afectado al reducir tal recombinación en la EC adyacente y este efecto podría modificarse si la distancia de esta última al cen es alterada por una IP.

Las variaciones de la HC C parecen ser un rasgo general, no sólo en el humano sino también en los demás eucariontes. Se ha establecido, por un modelo de ICH, que esta variabilidad es más frecuente que las translocaciones en las poblaciones naturales. Celulas tratadas con MMC muestran mucho más ICH, en relación al segmento C, que intercambios intercromosómicos. Aunque raros, estos últimos ocurren y explicarían la dispersión de secuencias repetitivas o de un DNA sat particular en diferentes cromosomas de un cariotipo. Algunas evidencias citogenéticas y moleculares soportan la idea de que los HM C resultan de un intercambio desigual de doble cadena durante la replicación. Así, los HM son tolerados sin consecuencias fenotípicas. Varias de estas secuencias son zonas interdispersas, reconocidas por enzimas de restricción, a intervalos regulares de la estructura del nucleosoma. Estas, podrían mediar el mal entrecruzamiento y resultar en cantidades variables de HC y de DNA sat.

En organismos inferiores (*Drosophila* sp.), alteraciones en la cantidad de HC no solamente influyen las propiedades de recombinación, sino también alteran el potencial de entrecruzamiento de otros cromosomas. Estos mecanismos podrían proporcionar una fuerza selectiva suficiente para la presencia de los HM en cuestión. Se ha observado que como la cantidad de HC centromérica es reducida, también lo es la frecuencia de recombinación de la EC proximal cercana a las regiones C. Los HM C, entonces, repercuten en el aparato meiótico y/o mitótico y tal vez tengan una importante adaptación evolutiva de las secuencias que los contienen. En diferentes especies con cariotipos similares, la falta de diversidad evolutiva se asocia con la escasa cantidad de HC. Esta última, tiende aparentemente a ayudar a la especiación, aunque puede al mismo tiempo proveer cambios cromosómicos en células somáticas con consecuencias deletéreas.

Asimismo, una implicación directa no específica de los HM puede ser su eventual influencia sobre los procesos metabólicos, (procesos embrionarios), así como la evidencia de inestabilidad cromosómica innata, en adición a la susceptibilidad por el ambiente determinante. También, es posible que éstos puedan repercutir a varios niveles, tales como susceptibilidad, resistencia y/o capacidad de integración para ciertos virus.

Cabe señalar que hasta no realizar métodos más unificados de cuantificación y estadísticos de los segmentos de HC C, no se podrá establecer un criterio acertado para correlacionar FM C y la presencia de AH. Para ello, se requeriría de la organización de talleres en donde se definan los parámetros en cuestión.

Es posible que en un futuro no muy lejano, con los adelantos en biología molecular y la elucidación del genoma humano, se descubran las secuencias, las propiedades físicas y químicas, así como las funciones de estas regiones polimórficas. Esto será de gran ayuda para aclarar la asociación de estas Var con alguna enfermedad, especialmente, con la pérdida repentina del embarazo.

I. S U M A R I O.

Los Polimorfismos Cromosómicos son variaciones morfológicas de un cariotipo y se encuentran con frecuencia en la población, los cuales se observaba que no tenían repercusión alguna sobre el fenotipo. Sin embargo, se ha visto que no son variaciones sin sentido y puedan afectar el desarrollo normal del individuo, principalmente, con el riesgo de aborto habitual.

Para confirmar este hallazgo, se estudiaron 21 parejas con aborto recurrente y fueron comparadas con un grupo de 25 parejas fértiles. Ambas del mismo grupo étnico, se sujetaron a las mismas condiciones metodológicas y las preparaciones cromosómicas se realizaron a partir de cultivos de linfocitos de sangre periférica para la determinación de los polimorfismos de los cromosomas 1, 9, 16 e Y por la técnica de bandas CBG.

Los resultados de ambos grupos se compararon con la prueba "U" de Mann-Whitney y se encontró que los cromosomas 1, Y y las tres diferencias entre homólogos no mostraron diferencias significativas. No obstante, los cromosomas 1', 9, 9', 16 y 16' si mostraron diferencias significativas en la distribución de ambos grupos ($p < 0.05$). Asimismo, los resultados de la prueba de χ^2 de las frecuencias por niveles de tamaño fueron obtenidos. No existieron diferencias significativas para las regiones qh de los cromosomas 1, 16 e Y; en cambio, para la región qh del cromosoma 9 si la hubo ($p < 0.005$). Además, se obtuvieron las frecuencias de los tipos de inversión pericéntrica del cromosoma 9 y mostraron nuevamente diferencias significativas entre el grupo de parejas abortadoras (14.29%) y de parejas fértiles (2.0%).

Las regiones qh de los cromosomas 1, 16 e Y y las tres diferencias entre homólogos no se relacionan con la pérdida repentina del embarazo. Espero, la región qh e inversión pericéntrica del cromosoma 9 se asocian estrechamente con el riesgo de aborto habitual. Es probable que cantidades elevadas de secuencias o de un tipo de secuencia particular, así como puntos de ruptura y reunión críticos en estas zonas, perturbe la segregación cromosómica y, por lo tanto, genere los abortos espontáneos y/o productos malformados en las parejas.

XI. BIBLIOGRAFIA.

1. Lewin B (1980). *Gene Expression: Eucariotic chromosomes*. John Wiley y Sons, NY. 1160 p.
2. Lewin B (1987). *Genes III*. John Wiley y Sons, NY. 761 p.
3. Cervantes AP (1983). *Estructura molecular de los cromosomas humanos: su correlación con las técnicas de bandeado y su aplicación a la clínica*. Tesis profesional. Fac. Química, UNAM. 315 p.
4. Bahr GF (1977). *Chromosomes and chromatin structure*. In *Molecular Structure of Human Chromosomes*. Yunis JJ, ed. Academic Press, NY. 143-203.
5. Watson JD, Hopkins NH, Roberts JW, Steitz JA y Weiner AN (1988). *Molecular Biology of the Gene*. Benjamin/Cummings Publishing Co., LA. 1161 p.
6. Stein GS, Stein JS y Kleinsmith LJ (1976). *Las proteínas cromosómicas y la regulación de los genes*. *Investigación y Ciencia*. Sci Am. 1, 32-44.
7. Kornberg RD y Klug A (1981). *The nucleosome*. Sci Am. 244, 48-60.
8. Mc Ghee JD y Felsenfeld G (1980). *Nucleosome structure*. *Ann Rev Biochem*. 51, 89-121.
9. Arrighi FE y Saunders GF (1973). *The relationship between repetitious DNA and constitutive heterochromatin with special reference to man*. In *Modern Aspects of Cytogenetics: Constitutive Heterochromatin in Man* (Pfeiffer FK, ed.). Symp Med Hoechst. Schattauer, Stuttgart. No 6, 113-133.
10. Brown SW (1966). *Heterochromatin*. *Science*. 151, 417-425.
11. Yunis JJ (1973). *Constitutive heterochromatin and the repeated DNA sequences of mammals*. In *Modern Aspects of Cytogenetics: Constitutive Heterochromatin in Man* (Pfeiffer FK, ed.). Symp Med Hoechst. Schattauer, Stuttgart. 6, 5-17.
12. Bianchi MO (1978). *Duplicación cromosómica y heterocromatina a nivel molecular y citogenético*. Monografía. Secret Gral de la OEA, Washington. 45-83.
13. Stahl A y Hargtun M (1981). *L'heterochromatine*. *Ann Génét*. 24, 69-77.
14. Comings DE (1980). *Arrangement of the chromatin in the nucleus*. *Hum Genet*. 53, 131-143.
15. Rao PN (1977). *Premature chromosome condensation and the fine structure of chromosomes*. In *Molecular Structure of*

Human Chromosomes. Yunis JJ, ed. Acad Press, NY. 205-231.

16. Du Pray EJ (1966). Evidence for a "folder fiber" organization in human chromosomes. *Nature*. 209, 577-581.
17. Stubblefield E y Wrang W (1971). Architecture of the chinese hamster metaphase chromosome. *Chromosoma*. 32, 262-294.
18. Bak AL, Jorgensen AL y Zeuthen J (1981). Chromosome banding and compaction. *Hum Genet*. 57, 199-202.
19. Adolph EW, Cheng SH, Paulson JR y Laemmli VK (1977). Isolation of a protein scaffold from mitotic HeLa cell chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 74, 4937-4941.
20. Paulson JR y Laemmli VK (1977). The structure of histone depleted metaphase chromosome. *Cell*. 12, 817-828.
21. Maraden PF y Laemmli VK (1979). Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model. *Cell*. 17, 849-858.
22. Okada TA y Comings DE (1980). A search for a protein cores in chromosome. Is the scaffold an artifact? *Am J Hum Genet*. 32, 814-832.
23. Comings DE (1978). Mechanisms of chromosome banding and implications for chromosome structure. *Ann Rev Genet*. 12, 25-46.
24. Yunis JJ y Bahr GF (1979). Chromatin fiber organization of human interphase and prophase chromosomes. *Exp Cell Res*. 122, 63-72.
25. Heitz E (1928). Das heterochromatin der Moose. I. *Jahrb Wiss Bot*. 69, 762.
26. Babu A y Verma RS (1987). Chromosome structure: Euchromatin and Heterochromatin. *Int Rev Cytol*. 108, 1-60.
27. Lyon MF (1961). Gene activation in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature*. 190, 372-373.
28. Ohno S (1967). Sex chromosomes and sex-linked genes. Springer-Verlag, Heidelberg. Vol. 1. 192 p.
29. Yunis JJ y Yasminah WG (1971). Heterochromatin, satellite DNA, and cell function. *Science*. 174, 1200-1209.
30. Hsu TC (1975). A possible function of constitutive heterochromatin: the bodyguard hypothesis. *Genetics*. 79 (suppl.), 137-150.
31. Pardue ML y Gall JG (1970). Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science*. 168, 1356-1358.

32. Paris Conference (1971). Standardization in human cytogenetics. Birth Defects. Orig Art Ser. 8 (9). Natl Found, NY. 1972.
33. Bobrov N, Madam K y Pearson PL (1972). Staining some specific regions of human chromosomes, particularly the secondary constriction of No. 9. Nat New Biol. 238, 122-124.
34. Bühler EM (1980). A synopsis of the human Y chromosome. Hum Genet. 55, 145-175.
35. Vig BK y Broccoli D (1980). Sequence of centromere separation: differential replication of pericentric heterochromatin in multicentric chromosomes. Chromosoma. 96, 311-317.
36. Yunis JJ, Tsai MY y Willey AM (1977). Molecular organization and function of the human genome. In Molecular Structure of Human Chromosomes. Yunis JJ, ed. Acad Press, NY. 1-33.
37. Britten RJ y Kohne DE (1968). Repeated sequences in DNA. Science. 161, 529-540.
38. Schmid CW y Deininger PL (1975). Sequence organization of the human genome. Cell. 6, 345-358.
39. Saunders GP, Shirakawa SP, Saunders PP, Arrighi PE y Hsu TC (1972). Populations of repeated DNA sequences in the human genome. J Mol Biol. 63, 323-334.
40. Macaya C, Thierry JP y Bernardi G (1977). DNA sequences in man. In Molecular Structure of Human Chromosomes. Yunis JJ, ed. Acad Press, NY. 35-58.
41. Kit S (1961). Equilibrium sedimentation in density gradients of DNA preparations from animal tissues. J Mol Biol. 3, 711-716.
42. Southern E (1973). Repetitive DNA in mammals. In Modern Aspects of Cytogenetics: Constitutive Heterochromatin in Man (Pfeiffer FK, ed). Symp Med Hoechst. Schattauer, Stuttgart. 6, 19-27.
43. Corneo G, Ginelli E y Zardi L (1973). Satellite and repeated sequences in human DNA. In Modern Aspects of Cytogenetics: Constitutive Heterochromatin in Man (FK Pfeiffer, ed). Symp Med Hoechst. Schattauer, Stuttgart. 6, 29-37.
44. Steffensen DM (1973). Human gene localization by RNA: DNA hybridization *in situ*. In Molecular Structure of Human Chromosomes. Yunis JJ, ed. Acad Press, NY. 59-88.
45. Miklos GLG y John B (1979). Heterochromatin and satellite DNA in Man. Properties and Prospects. Am J Hum Genet. 31, 264-280.

46. Arrighi FE, Saunders PP, Saunders GF y Hsu TC (1971). Distribution of repetitious DNA in human chromosomes. *Experientia*. 27, 964-966.
47. Jones KW y Corneo G (1971). Location of satellite and homogeneous DNA sequences on human chromosomes. *Nat New Biol*. 233, 268-271.
48. Saunders GF, Hsu TC, Gets MJ, Sines EL y Arrighi FE (1972). Location of a human satellite DNA in human chromosomes. *Nat New Biol*. 236, 244-246.
49. Hsu TC, Arrighi FE y Saunders GF (1972). Compositional heterogeneity of human heterochromatin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 69, 1464-1466.
50. Jones KW (1977). Repetitive DNA and primate evolution. In *Molecular Structure of Human Chromosomes*. Yunis JJ, ed. Acad Press, NY. 295-326.
51. Gosden JR, Lawrie SS y Gosden CN (1981). Satellite DNA sequence in the human acrocentric chromosomes: information from translocations and heteromorphisms. *Am J Hum Genet*. 32, 243-251.
52. Gosden JR, Gosden CN, Lawrie SS y Mitchell AR (1978). The fast DNA satellite I, II, and III and ribosomal DNA in a familial dicentric chromosome 13, 14. *Hum Genet*. 41, 131-141.
53. Evans HJ, Gosden JR, Mitchell AR y Buckland RA (1974). Location of human satellite DNA's on the Y chromosome. *Nature*. 251, 346-347.
54. Jones KW, Purdom IF, Prosser J y Corneo G (1974). The chromosomal localization of human satellite DNA I. *Chromosoma*. 49, 161-171.
55. Gosden JR, Mitchell AR, Buckland RA, Clayton RF y Evans HJ (1975). The location of four human satellite DNA's on human chromosomes. *Exp Cell Res*. 92, 148-158.
56. Jones KW, Prosser J, Corneo G y Ginelli E (1973). The chromosomal location of human satellite DNA III. *Chromosoma*. 42, 445-451.
57. Hoar NH, Purdom IF y Jones KW (1975). Influence of temperature on the detectability and chromosomal distribution of specific DNA sequences by *in situ* hybridization. *Chromosoma*. 53, 345-359.
58. Chuang CR y Saunders GF (1974). Complexity of human satellite A DNA. *Biochem Biophys Res Commun*. 57, 1221-1230.
59. Chuang CR (1974). The genetic constitution of human nucleoli. *J Cell Biol*. 63, 62a. (abstr.).

60. Saunders GF, Chuang CR y Sawada H (1975). Genome complexity and *in vivo* transcription in human leukemic leucocytes. *Acta Haematol.* 54, 227-233.
61. Frommer M, Paul C y Vincent PC (1988). Localisation of satellite DNA sequences on human metaphase chromosomes using bromodeoxyuridine-labelled probes. *Chromosoma.* 97, 11-18.
62. Schwarzacher-Robinson T, Cram LS, Meyne J y Moyzis RK (1988). Characterization of human heterochromatin by *in situ* hybridization with satellite DNA clones. *Cytogenet Cell Genet.* 47, 192-196.
63. Cooke HJ (1976). Repeated sequence specific to human males. *Nature.* 62, 182-186.
64. Schmidtke J y Schmid M (1980). Regional assignment of a 2.1-Kb repetitive sequence to the distal part of human Y heterochromatin. *Hum Genet.* 55, 255-257.
65. McKay RDG, Bobrow M y Cooke HJ (1978). The identification of a repeated DNA sequence involved in the karyotype polymorphism of the human Y chromosome. *Cytogenet Cell Genet.* 21, 19-32.
66. Bostock CJ, Gosden JR y Mitchell AR (1978). Localization of a male specific DNA fragment to a sub-region on the human Y chromosome. *Nature.* 272, 324-328.
67. Cantù ES, Marsh RD, Boecklen KE y Ostrer H (1988). Selective protection of specific DNA sequences in the heterochromatin of C-banded human Y chromosome. *Am J Hum Genet.* 43, 948-953.
68. Krumina AR, Kroschkina VG, Iurov IUB, Aleksandrov IA y Mitkevich SP (1988). Use of a clone aliphoid repetitive sequence of human DNA in studying the polymorphism of heterochromatin regions of chromosomes. *Genetika.* 24, 937-942.
69. Huntington FW (1985). Chromosome-specific organization of human alpha satellite DNA. *Am J Hum Genet.* 37, 524-532.
70. Delattre O, Bernard A, Malfroy B, Marlhens F, Viegas-Pequignot E, Brossard C, et al. (1988). Studies on the human chromosome 3 centromere with a newly cloned aliphoid DNA probe. *Hum Hered.* 38, 156-167.
71. Greig GM, England SB, Bedford HM y Willard HF (1989). Chromosome-specific alpha satellite DNA from the centromere of human chromosome 16. *Am J Hum Genet.* 45, 862-872.
72. Agresti A, Meneveri R, Siccardi AG, Marozzi A, Corneo G, Gaudi S y Ginelli E (1989). Linkage in human heterochromatin between highly divergent Sau 3A repeats and a new family of repeated DNA sequences (Hae III family). *J Mol Biol.* 205, 625-631.

73. Jones KW y Singh L (1981). Conserved repeated DNA sequence in vertebrate sex chromosome. *Hum Genet.* 58, 46-53.
74. Babu KA y Verma RS (1985). Structural and functional aspects of nucleolar organizer regions (NORs) of human chromosomes. *Int Rev Cytol.* 94, 151-176.
75. Lima de Faria (1973). The specific location of ribosomal genes in the eukaryotic chromosome. In *Modern Aspects of Cytogenetics: Constitutive Heterochromatin in Man* (Pfeiffer FK, ed). Symp Med Hoechst. Schattauer, Stuttgart. 6, 39-44.
76. Pardue ML y Birnstiel ML (1973). Cytological Lokalization of repeated gene sequences. In *Modern Aspects of Cytogenetics: Constitutive Heterochromatin in Man* (Pfeiffer FK, ed). Symp Med Hoechst. Schattauer, Stuttgart. 6, 75-85.
77. Gummerson KS (1972). The evolution of repeated DNA in primates. Ph D. Thesis. J Hopkins University, Balt, Maryland.
78. Paris Conference (1971). Supplement (1975). Standardization in Human Cytogenetics. *Birth Defects. Orig Art Ser.* 2 (9). Natl Found, NY. 1972.
79. Jones KW, Prosser J, Corneo G, Ginelli E y Bobrow M (1973). Satellite DNA, constitutive heterochromatin and human evolution. In *Modern Aspects of Cytogenetics: Constitutive Heterochromatin in Man* (Pfeiffer FK, ed). Symp Med Hoechst. Schattauer, Stuttgart. 6, 45-61.
80. Kohne DE (1970). Evolution of higher organism DNA. *Q Rev Biophys.* 3, 327.
81. Dutrillaux B (1979). Chromosomal evolution in primates: tentative phylogeny from *Microcebus murinus* (Prosimian) to man. *Hum Genet.* 48, 251-314.
82. De Grouchy J (1987). Chromosome phylogenies of man, great apes, and Old World monkeys. *Genetica.* 73, 37-52.
83. Schmid M y Guttenbach M (1988). Evolutionary diversity of reverse (R) fluorescent chromosome bands in vertebrates. *Chromosoma.* 97, 101-114.
84. Walker PMB (1971). Origin of satellite DNA. *Nature.* 229, 306-308.
85. Kurnit DM (1979). Satellite DNA and Heterochromatin variants: the case for unequal mitotic crossing over. *Hum Genet.* 47, 169-186.
86. Ohno S (1973). Evolution reason for having so much junk DNA. In *Modern Aspects of Cytogenetics: Constitutive Heterochromatin in Man* (Pfeiffer FK, ed). Symp Med Hoechst. Schattauer, Stuttgart. 6, 169-173.

87. Tamparillas M (1978). Marcadores, ligamiento y mapas génicos. En *Genética Médica* (Egozcue J, ed). Espaxs, Barcel. 172-185.
88. Pearson PL, Geraedts JPN y Van Der Linden AGJM (1973). Human chromosome polymorphism. In *Modern Aspects of Cytogenetics: Constitutive Heterochromatin in Man* (Pfeiffer FK, ed). Symp Med Hoechst. Schattauer, Stuttgart. 6, 201-213.
89. Verma RS y Dosik H (1980). Human chromosome heteromorphisms: nature and clinical significance. *Int Rev Cytol.* 62, 161-83.
90. Erdtmann B (1982). Aspects of evaluation, significance, and evolution of human C-banded heteromorphism. *Hum Genet.* 61, 281-294.
91. Ghosh PK y Mand R (1982). The role of chromosome in the developmental anomalies. In *Advances in the Study of Birth Defects. Genetic Disorders* (Persaud TVN, ed). AR Liss Inc, NY. 2, 15-26.
92. Shabtai FS y Halbrecht I (1982). Human chromosome polymorphism and congenital defects. In *Advances in the Study of Birth Defects. Genetic Disorders* (Persaud TVN, ed) AR Liss Inc, NY. 4, 37-49.
93. Madan K y Bobrow M (1971). Structural variation in chromosome no. 9. *Ann Génét.* 17, 81-86.
94. Bobrow M, Pearson PL, Pike MC y El-alfi OS (1971). Length variation in the quinacrine-binding segment of human Y chromosomes of different sizes. *Cytogenetics.* 10, 190-198.
95. Schmiady H y Sperling K (1976). Length of human C-bands in relation to the degree of chromosome condensation. *Hum Genet.* 35, 107-111.
96. Balicek P, Zizka J y Skalská H (1977). Length of human constitutive heterochromatin in relation to chromosome contraction. *Hum Genet.* 38, 189-193.
97. Hoehn H, Au K, Karp LE y Martin GM (1977). Somatic stability of variant C-band heterochromatin. *Hum Genet.* 35, 163-168.
98. Friedrich U y Therkelsen AJ (1982). An Attempt to define 1qh+, 9qh+, and 16qh+. *Hum Genet.* 60, 139-144.
99. Lin MS, Latt SA y Davidson RL (1974). Microfluorometric detection of asymmetry in the centromeric region of mouse chromosomes. *Exp Cell Res.* 86, 392-394.
100. Galloway SM y Evans HJ (1975). Asymmetrical C-bands and satellite DNA in man. *Exp Cell Res.* 94, 454-459.
101. Angell RR y Jacobs PA (1975). Lateral asymmetry in human constitutive heterochromatin. *Chromosoma.* 51, 301-310

102. Angell ER y Jacobs PA (1978). Lateral asymmetry in human constitutive heterochromatin: frequency and inheritance. *Am J Hum Genet.* 30, 144-152.
103. Comings DE (1978). Lateral asymmetry of human chromosomes. *Am J Hum Genet.* 30, 223-225.
104. Limon J, Gibas Z, Kaluzewski B y Moruzgala T (1979). Demonstration of two different regions of lateral asymmetry in human Y chromosomes. *Hum Genet.* 51, 247-252.
105. Brito-Babapulle V (1981). Lateral asymmetry in human chromosomes 1, 3, 4, 15, and 16. *Cytogenet Cell Genet.* 29, 198-202.
106. Donlon TA y Magenis RE (1981). Structural organization of the heterochromatic region of human chromosome 9. *Chromosoma.* 84, 353-363.
107. Podugolnikova OA, Parfenova IV, Sushanlo HM y Prokofieva-Belgovskaja AA (1979). The quantitative analysis of polymorphism on human chromosomes 1, 9, 16, and Y. I. Description of individual karyotypes. *Hum Genet.* 49, 243-250.
108. Lelikova GP, Benyush VA y Tsvetkova TG (1977). Quantitative analysis of centromeric heterochromatin polymorphism in human chromosomes. *Genetika.* 13, 2195-2200.
109. Stallard R Browner M y Burday MJ (1979). Objective definition of C-band size. *Am J Hum Genet.* 31, 111A.
110. Patil SR y Lube HA (1977). Classification of qh regions in human chromosomes 1, 9, and 16 by C-banding. *Hum Genet.* 38, 35-38.
111. Sofuni T, Naruto J y Awa AA (1979). Quantitative analysis of C-bands based on area measurement. *Jpn J Hum Genet.* 24, 194.
112. Azumi J, Nakagome Y, Oka S y Matsunaga E (1980). A new approach in the evaluation of chromosome variants in man. II. Pairs without Q and C (qh) variants. *Hum Genet.* 55, 75-79.
113. Staessen C, Kirsch-Volders M y Susanne C (1982). Comparison of two measuring methods for the evaluation of C-heterochromatin in human chromosomes. *Hum Genet.* 61, 68-70.
114. Skawinski W y Parcheta B (1984). Polymorphism of the human Y chromosome: the evaluation of the correlation between the DNA content and the size of the heterochromatin and euchromatin. *Clin Genet.* 25, 125-130.
115. Wall MJ y Butler LJ (1989). Classification of Y chromosome polymorphisms by DNA content and C-banding. *Chromosome.* 97, 296-300.
116. Wegner H y Pawlowitzki IH (1981). Quantification of C-band

- polymorphisms by centromeric elevation (Ce-bands). *Hum Genet.* 58, 302-305.
117. Wahedi K y Pawlowitzki IH (1987). C-band polymorphisms of human chromosome 9: quantification by Ce-bands. *Hum Genet.* 77, 1-5.
 118. Tanabe K, Sofuni T y Awa AA (1979). Densitometric measurements of fluorescent intensity of human chromosomes stained by Q-method. *Jpn J Hum Genet.* 24, 194.
 119. Oka S, Nakagome Y, Azumi J, Matsunaga E y Igrashi Y (1980). A new approach in the evaluation of chromosome variants in man. III. Pairs with established Q or C variable sites. *Hum Genet.* 55, 327-331.
 120. Caspersen T, Zench L y Johansson C (1970). Analysis of human metaphase chromosome set by aid of DNA-binding fluorescent agents. *Exp Cell Res.* 62, 490-492.
 121. Geraedts JPM, Pearson PL, Van Der Ploeg M y Vassepoel AM (1975). Polymorphisms for human chromosomes 1 and Y. *Exp Cell Res.* 95, 1-5.
 122. Schnedl W, Roscher U y Czaker R (1977). A photometric method for quantifying the polymorphisms in human acrocentric chromosomes. *Hum Genet.* 35, 185-191.
 123. Verma RS y Babu A (1989). *Human chromosomes. Manual of basic techniques.* Pergamon Press, NY. 240 p.
 124. Caspersen T, Zench L, Johansson C y Modest EJ (1970). Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents. *Chromosoma.* 30, 215-227.
 125. ISCN (1985). *An International System for Human Cytogenetics Nomenclature.* Birth Defects. Orig Art Ser. 21 (1). March of Dimes Birth Defects Foundation, NY. 1978.
 126. Sumner AT (1982). The nature and mechanisms of chromosome banding. *Cancer Genet Cytogenet.* 6, 59-87.
 127. Petrovic V (1988). A new variant of chromosome 3 with unusual staining properties. *J Med Genet.* 25, 781-782.
 128. Babu A y Verma RS (1986). Heteromorphic variants of human chromosome 4. *Cytogenet Cell Genet.* 41, 60-61.
 129. Verma RS y Dosik H (1979). Frequencies of centromeric heteromorphisms of human chromosomes 3 and 4 as detected by QFQ technique: Can they be identified by RFA technique? *Can J Genet Cytol.* 21, 109-113.
 130. Bardhan S, Singh DW y Davis K (1981). Polymorphism in chromosome 4. *Clin Genet.* 20, 44-47.

131. Spedicato FS, Di Comite A y Tohidast-Akrad M (1985). An unusual variant chromosome 9 with an extra C-negative, G-dark segment in the short arm. *Clin Genet.* 28, 162-165.
132. Thompson PW y Roberts SH (1987). A new variant of chromosome 16. *Hum Genet.* 76, 100-101.
133. Wachtler F y Musil R (1980). On the structure and polymorphism of the human chromosome no. 15. *Hum Genet.* 56, 115-118.
134. Chen TR, Kao ML, Marks J y Chen YY (1981). Polymorphic variants in human chromosome 15. *Am J Hum Genet.* 9, 61-66.
135. Bernstein R, Dawson B y Griffiths J (1981). Human inherited marker chromosome 22 short-arm enlargement: investigation of rDNA gene multiplicity, Ag-band size, and acrocentric association. *Hum Genet.* 58, 135-139.
136. Barker PE, Mohandas T y Kaback MM (1977). Chromosome polymorphism in karyotypes from amniotic fluid cell cultures. *Clin Genet.* 11, 243-248.
137. Wahlström J (1971). Are variations in length of Y chromosome due to structural changes? *Hereditas.* 69, 125-128.
138. Soudek D y Laraya P (1976). C and Q bands in long arm of Y chromosome; or they identical? *Hum Genet.* 32, 339-341.
139. Arrighi FE y Hsu TC (1971). Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics.* 10, 81-86.
140. Sumner AT (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res.* 75, 304-306.
141. Comings DE, Avelino E, Okada TA y Wyandt HE (1973). The mechanism of C- and G-banding of chromosomes. *Exp Cell Res.* 77, 469-493.
142. Pathak S y Arrighi FE (1973). Loss of DNA following C-banding procedures. *Cytogenet Cell Genet.* 12, 414-422.
143. De Braekeleer M, Keushing M y Lin CC (1986). A high-resolution C-banding technique. *Can J Genet Cytol.* 28, 317-322.
144. Verma RS, Rodríguez J y Dosik H (1984). Chromatin of h regions human chromosomes at high resolution. *Experientia.* 40, 878-879.
145. Lubs HA y Ruddle FH (1970). Application of quantitative karyotype to chromosome variation in 4,400 consecutive newborns. In *Human Population Cytogenetics* (Jacobs PA, Price WH y Law P eds). Pfizer Medical Monographic 5. Edinburgh, Univ Press. 120-142.
146. Mikelsaar AVN, Tüür SJ y Käosaar ME (1973). Human karyotype

- polymorphism. I. Routine and fluorescence microscopic investigation of chromosomes in a normal adult population. *Humangenetik*. 20, 89-102.
147. Friedrich O y Nielsen J (1973). Chromosome studies in 5049 consecutive newborn children. *Clin Genet*. 4, 333-343.
 148. Ferguson-Smith HA (1974). Autosomal polymorphism. In *Medical Genetics Today* (Rimoin DL y Schinke RN eds.). Birth Defects: Orig Art Ser Natl Found, NY. 1972.
 149. Ghosh PK y Sing IP (1975). Morphological variability of the human chromosomes in two Indian populations - Rajputs and Punjabis. *Humangenetik*. 29, 67-78.
 150. Craig-Holmes AP y Shaw NW (1971). Polymorphism of human constitutive heterochromatin. *Science*. 174, 702-704.
 151. Craig-Holmes AP y Shaw NW (1973). Polymorphism of human C-band heterochromatin. I. Frequency of variants. *Am J Hum Genet*. 25, 181-192.
 152. Iinuma K, Matsunaga E y Nakagome Y (1973). Polymorphism of C and Q bands in human chromosomes. *Ann Rep Nat Inst Genet*. 23, 112-114.
 153. Bochkov NP, Kuleshov NP, Chebotarev AN, Alekhin VI y Midian SA (1974). Population cytogenetic investigations of newborns in Moscow. *Humangenetik*. 22, 139-152.
 154. Park J y Antley BN (1974). C-band chromosomal polymorphism in orientals. *Am J Hum Genet*. 26, 65.
 155. Hamerton JL, Canning N, Ray M y Smith S (1975). A cytogenetic survey of 14,069 newborn infants. Incidence of chromosome abnormalities. *Clin Genet*. In Press.
 156. Nielsen J y Sillesen I (1975). Incidence of Aberrations among 11,148 newborn children. *Humangenetik*. 30, 1-12.
 157. Ghosh PK y Sing IP (1976). Morphological variability of the human chromosomes: polymorphism of constitutive heterochromatin. *Hum Genet*. 32, 149-154.
 158. Kim MA (1973). Polymorphismus des konstitutiven heterochromatins bei menschlichen A 1-metaphasechromosomen. *Humangenetik*. 18, 213-217.
 159. Tüür S, Käosaar M y Nikelsaar AV (1974). 1q+ variants in a normal population (one with a pericentric inversion). *Humangenetik*. 24, 217-220.
 160. Seabright M, Gregson MM y Johnson M (1980). A familial polymorphic variant of chromosome 5. *J Med Genet*. 17, 444-46.

161. Sofuni T, Tanabe K, Ohtaki K, Shimba H y Awa AA (1974). Two new type of C-band variants in human chromosome (6ph⁺ and 12ph⁺). *Jpn J Hum Genet.* 19, 251-256.
162. Madan K y Brunsas E (1973). C-banded polymorphis in human chromosome no. 6. *Clin Genet.* 15, 193-197.
163. Callen DF, Eyre HJ y Ringenbergs ML (1990). A dicentric variant of chromosome 6: characterization by use of in situ hybridisation with the biotinylated probe p306. *Clin Genet.* 37, 81-83.
164. Spak DK, Johnston K y Donlon TA (1989). A non-centromeric C band variant on chromosome 11q23.2. *J Med Genet.* 26, 532-534.
165. Madan K y Bobrow N (1974). Structural variation in chromosome no. 9. *Ann Génét.* 17, 81-86.
166. Hansmann I (1976). Structural variability of human chromosome 9 in relation to its evolution. *Hum Genet.* 31, 247-262.
167. Pinal I, Díaz de Bustamante A, Urioste N, Felix V, Ureta A y Martínez-Frías ML (1988). An unusual variant of chromosome 16. *Hum Genet.* 80, 194.
168. Crossen FE (1975). Variation in the centromeric banding of chromosome 19. *Clin Genet.* 8, 218-222.
169. Müller H, Klinger HP y Glasser N (1975). Chromosome polymorphism in a human newborn population. II. Potentials of polymorphic chromosome variants for characterizing the idiogram of an individual. *Cytogenet Cell Genet.* 15, 239-255.
170. Podugolnikova OA, Parfenova IV, Sushanlo NM y Prokofieva-Belgovskaja AA (1979). The quantitative analysis of polymorfism on human chromosomes 1, 9, 16, and Y. II. Comparison of the C segments in male and female individuals (group characteristics). *Hum Genet.* 49, 251-260.
171. Podugolnikova OA, Parfenova IV, Sushanlo NM y Prokofieva-Belgovskaja AA (1980). Variability of heterochromatic regions of human chromosomes 1, 9, 16, and Y. *Genetika.* 16, 720-726.
172. Podugolnikova OA (1979). The quantitative analysis of polymorphism on human chromosomes 1, 9, 16, and Y. III. Study of relationships of C segments' lengths in individual karyotypes. *Hum Genet.* 49, 261-268.
173. Verma RS, Dosik H y Lubs HA (1978). Size and pericentric inversion heteromorphisms of secondary constriction regions (h) of chromosomes 1, 9, and 16 as detected by CBG technique in Caucasians: classification, frequencies, and incidence. *Am J Med Genet.* 2, 331-339.

174. Gerald PS y Walzer S (1970). Chromosome studies of normal newborns infants. In Human Populations Cytogenetics (Jacobs PA, Price WH y Lav P eds). Edimburgh, Univ Press. 143-51.
175. Lubs HA y Ruddle FH (1971). Chromosome polymorphism in american negro and white populations. Nature. 233, 134-136.
176. De la Chapelle, Schröder J, Stenstrand K, Fellman J, Harva R, Saarmi M, et al. (1974). Pericentric inversions of human chromosome 9 and 10. Am J Hum Genet. 26, 746-766.
177. Mayer M, Matsuura J y Jacobs P (1978). Inversions and other heteromorphisms detected by C-banding. Hum Genet. 45, 43-50.
178. Dutrilaux B y Lejeune J (1971). Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. C R Acad Sci (D) (Paris). 272, 2638-2640.
179. Verma RS y Lubs HA (1975). A simple R banding technique. Am J Hum Genet. 27, 110-117.
180. Comings DE (1978). Mechanisms of chromosome banding and implications for chromosome structure. Ann Rev Genet. 12, 25-46.
181. Verma RS y Lubs HA (1975). Variation in human acrocentric chromosomes with acridine orange reverse banding. Humangenetik. 30, 225-235.
182. Verma RS, Dosik H y Lubs HA (1977). Frequency of RFA colour polymorphisms of human acrocentric chromosomes in caucasians: interrelationship with QFQ polymorphisms. Ann Hum Genet. 41, 257-267.
183. Verma RS, Dosik H y Lubs HA (1977). Size variation polymorphisms of the short arm of human acrocentric chromosomes determined by R-banding by fluorescence using acridine orange (RFA). Hum Genet. 38, 231-234.
184. Matsui SI y Sasaki M (1973). Differential staining of nucleolus organizers in mammalian chromosomes. Nature. 246, 148-150.
185. Goodpasture C y Bloom SE (1975). Visualization of nucleolar organizer regions. III. Mammalian chromosomes using silver staining. Chromosoma. 23, 37-50.
186. Schnedl W (1978). Structure and variability of human chromosomes analyzed by recent techniques. Hum Genet. 41, 1-9.
187. Howell WM y Black DA (1978). A rapid technique for producing silver-staining nucleolus organizer regions and trypsin-giemsa bandas on human chromosomes. Hum Genet. 43, 53-56.
188. Bianchi MS, Bianchi NO, Pantelias GE y Wolff S (1985). The

- mechanism and pattern of banding induced by restriction endonucleases in human chromosomes. *Chromosome*. 91, 131-136.
189. Callen DF, Eyre HJ y Ringenbergs ML (1990). A dicentric variant of chromosome 6: characterization by use of *in situ* hybridization with the biotinylated probe p308. *Clin Genet*. 37, 81-83.
 190. Babu A, Verma RS y Patil SR (1987). Alu-resistant chromatin of chromosome 18: classification, frequencies and implications. *Chromosome*. 95, 163-166.
 191. Callen DF, Ringenbergs ML, Fowler JCS, Freemantle CJ y Haan EA (1990). Small marker chromosomes in man: origin from pericentric heterochromatin of chromosomes 1, 9, and 16. *J Med Genet*. 27, 155-159.
 192. Dale S, Earle E, Voullaire L, Rogers J y Choo KH (1989). Centromeric alpha satellite DNA amplification and translocation in an unusually large chromosome 14p+ variant. *Hum Genet*. 82, 154-158.
 193. Earle E, Dale S y Choo KH (1989). Amplification of satellite III DNA in an unusually large chromosome 14p+ variant. *Hum Genet*. 82, 187-190.
 194. Babu A y Verma RS (1986). Characterization of human chromosomal constitutive heterochromatin. *Can J Genet Cytol*. 28, 631-644.
 195. Gosden JR, Lawrie SS y Cooke HJ (1981). A cloned repeated DNA sequence in human chromosome heteromorphisms. *Cytogenet Cell Genet*. 29, 32-39.
 196. Yurov YB, Mitkevich SP y Alexandrov IA (1987). Application of cloned satellite DNA sequences to molecular-cytogenetic analysis of constitutive heterochromatin heteromorphisms in man. *Hum Genet*. 76, 157-164.
 197. Trask B, Engh G, Mayall B y Gray JW (1989). Chromosome Heteromorphism quantified by high-resolution bivariate flow karyotyping. *Am J Hum Genet*. 45, 739-752.
 198. Babu A, Agarwal AK y Verma RS (1988). A new approach in recognition of heterochromatic regions of human chromosomes by means restriction endonucleases. *Am J Hum Genet*. 42, 60-5.
 199. Buys CHCN, Ypma JMN y Gouw WL (1979). Complete deficiency of constitutive heterochromatin on a human chromosome 9. *Hum Genet*. 49, 129-132.
 200. Madan K (1978). An extra band in human 9qh+ chromosomes. *Hum Genet*. 43, 259-264.
 201. Schweizer D (1980). Simultaneous fluorescent staining of R

- bands and specific heterochromatic regions (DA/DAPI bands) in human chromosomes *Cytogenet Cell Genet.* 27, 190-193.
202. Gosden JR, Spowart G y Lawrie SS (1981). Satellite DNA and cytological staining patterns in heterochromatic inversions of human chromosome 9. *Hum Genet.* 58, 276-278.
 203. Babu A, Macera MJ y Verma RS (1986). Intensity heteromorphisms of human chromosome 15p by DA/DAPI technique. *Hum Genet.* 73, 298-300.
 204. Lin MS, Zhang A, Wilson MG y Fujimato A (1988). DA/DAPI-fluorescent heteromorphism of human Y chromosome. *Hum Genet.* 79, 36-38.
 205. Oka S, Nakagome Y, Matsunaga E y Arima M (1977). LBA technique in the detection of chromosome variants. I. Chromosomes with known sites of Q variants. *Hum Genet.* 39, 31-37.
 206. Nakagome Y, Oka S y Matsunaga E (1977). LBA technique in the detection of chromosome variants. II. Chromosomes except for those with Q variants. *Hum Genet.* 38, 307-314.
 207. Azumi J, Nakagome Y, Oka S y Matsunaga E (1980). A new approach in the evaluation of chromosome variant in man. *Hum Genet.* 55, 75-79.
 208. Palmer CG y Schroeder J (1971). A familial variant of chromosome 9. *J Med Genet.* 8, 202-207.
 209. Fitzgerald PH (1973). The and inheritance of an elongated secondary constriction on chromosome 9 in man. *Cytogenet Cell Genet.* 12, 404-413.
 210. Mckenzie WH, Hostetter TL y Lubs HA (1972). Y family study: heritable variation in the length of the human Y chromosome. *Am J Hum Genet.* 24, 686-693.
 211. Beltran IC, Robertson FW y Page BM (1979). Human Y chromosome variation in normal and abnormal babies and their fathers. *Ann Hum Genet.* 42, 315-325.
 212. Brown T, Robertson FW, Dawson BM, Hanlin SJ y Page BM (1980). Individual variation of centric heterochromatin in man. *Hum Genet.* 55, 367-373.
 213. Phillips RB (1974). Q and C band chromosomal polymorphisms in families. *Genetics.* 77 (suppl. 1), 51s.
 214. Phillips RB (1977). Inheritance of Q and C band polymorphisms. *Can J Genet Cytol.* 19, 405-413.
 215. Craig-Holmes AN, Moore FB y Shaw MW (1975). Polymorphism of human C-band heterochromatin. II. Family studies with suggestive evidence for somatic crossing over.

Am J Hum Genet. 27, 178-189.

216. Robinson JA, Buckton KE, Spowart G, Newton M, Jacobs PA, Evans HJ y Hill R (1976). The segregation of human chromosomes polymorphisms. Ann Hum Genet. 40, 113-121.
217. Carnevale A, Blanco BI y del Castillo V (1976). The segregation of C-band polymorphisms on chromosomes 1, 9, and 16. Am J Hum Genet. 28, 412-416.
218. Balicek P, Zizka J y Skalska H (1978). Variability and familial transmission of constitutive heterochromatin of human chromosomes. Evaluation by method of linear measurement. Hum Genet. 42, 257-265.
219. Simi S y Tursi F (1982). Polimorphism of human chromosome 1, 9, 16, and Y: variations, segregation, and mosaicism. Hum Genet. 62, 217-220.
220. Webb GC, Krumins EJM, Eichenbaum SZ, Voullaire LE, Earle E y Choó KH (1989). Non C-banding variants in some normal families might be homogeneously staining regions. Hum Genet. 82, 59-62.
221. Van Dyke DL, Palmer CG, Nance WE y Yu P (1977). Chromosome polymorphism and twin zigosity. Am J Hum Genet. 29, 431-447.
222. Viégas J y Salzano FM (1978). C-bands in chromosomes 1, 9, and 16 of twins. Hum Genet. 45, 127-130.
223. Mc Craken AA, Daly PA, Zolnick MR y Clark AM (1978). Twins and Q banded chromosome polymorphism. Hum Genet. 45, 253-258.
224. Podugolnikova OA y Korostalev AP (1980). The quantitative analysis of polymorphism on human chromosomes 1, 9, 16, and Y. IV. Heterogeneity of a normal population. Hum Genet. 57, 58-63.
225. McKenzie WH y Lubs HA (1975). Human Q and C chromosomal variations: distribution and incidence. Cytogenet Cell Genet. 14, 97-115.
226. Buckton KE, O'riordan ML, Jacobs PA, Hill R y Evans HJ (1976). C- and Q-band polymorphisms in the chromosomes of three human populations. Ann Hum Genet. 40, 99-112.
227. Potluri VR, Singh IP y Bhasin MK (1985). Human chromosomal heteromorphisms in Delhi newborns. II. Analysis of C-band size heteromorphisms in chromosomes 1, 9, and 16. Hum Hered. 35, 333-338.
228. Mutchinick O, Sánchez F, Lisker R, Armendares S, Calójero J y Ruth L (1987). Heterochromatin C sizes distribution of chromosomes 1, 9, 16, and Y in a sample of the Mexican population: comparison of two quantitative methods of

- measurement. *La Rev Invest Clin (México)*. 39, 123-130.
229. Lubs HA, Kimberling WJ, Hecht F, Patil SR, Brown J, Gerald P y Summitt RL (1977). Racial differences in the frequency of Q and C chromosomal heteromorphisms. *Nature*. 268, 631-633.
 230. Verma RS, Rodriguez J y Dosik H (1981). Human chromosome heteromorphisms in american blacks. II. Higher incidence of pericentric inversions of secondary constriction regions (h). *Am J Med Genet*. 8, 17-25.
 231. Lubs HA y Patil RS (1975). Mediterranean origin of the long Y chromosomes in caucasians. *Am J Hum Genet*. 27, 60A.
 232. Verma RS, Dosik H, Scharf T y Lubs HA (1978). Length heteromorphisms of fluorescent (f) and non-fluorescent (nf) segments of human Y chromosome: classification, frequencies, and incidence in normal caucasians. *J Med Genet*. 15, 227-231.
 233. Erdtmann B, Salzano FM, Mattevi MS y Flores RZ (1981). Quantitative analysis of C-bands in chromosomes 1, 9, and 16 of brazilian indians and caucasoids. *Hum Genet*. 57, 58-63.
 234. Erdtmann B, Salzano FM y Mattevi MS (1981). Size variability of the Y chromosome distal C-band in brazilian indians and caucasoids. *Ann Hum Biol*. 8, 415-424.
 235. Cavalli IJ, Mattevi MS, Erdtmann B, Sbalqueiro IJ y Maia NA (1985). Equivalence of the total constitutive heterochromatin content by an interchromosomal compensation in the C band sizes of chromosomes 1, 9, 16, and Y in caucasian and japanese individuals. *Hum Hered*. 35, 379-387.
 236. Yamada K y Hasegawa T (1978). Types and frequencies of Q-variant chromosomes in a japanese population. *Hum Genet*. 44, 89-98.
 237. Sofuni I, Tanabe K y Awa AA (1980). Chromosome heteromorphisms in the japanese. II. Nucleolus organizer regions of variant chromosome in D and G groups. *Hum Genet*. 55, 265-270.
 238. Ibraimov AL, Mirrakhimov MM, Nazarenko SA, Axenrod EI y Akbanova GA (1982). Human chromosomal polymorphism. I. Chromosomal Q polymorphism in mongoloid populations of Central Asia. *Hum Genet*. 60, 1-7.
 239. Ibraimov AL, Mirrakhimov MM, Nazarenko SA y Axenrod EI (1982). Human chromosomal polymorphism. II. Chromosomal C polymorphism in mongoloid populations of Central Asia. *Hum Genet*. 60, 8-9.
 240. Hsu LYP, Benn PA, Tannenbaum HL, Perlis TE y Carlson AD (1987). Chromosomal polymorphisms of 1, 9, 16, and Y mayor ethnic groups: A large prenatal study. *Am J Med Genet*. 26, 95-101.

241. Fogle TA, Namboodiri KK, Elston RC, Mckenzie WH y Hanes CG (1980). Linkage relationships of biochemical markers to Q- and C-band variants in a large black kindred. *Hum Genet.* 55, 353-356.
242. Nakagome Y, Kitagawa T, Iinuma K, Matsunaga E, Shinoda T y Ando T (1977). Pitfalls in the use of chromosome variants for paternity dispute cases. *Hum Genet.* 37, 255-260.
243. Davidenkova F, Verlinskaya DK y Tyschnjuk S (1974). The clinical aspects of human chromosomal diseases and the role of heterochromatin of additional chromosomes. *Genetika.* 10 152-162.
244. Nielsen J, Friedrich U, Hreidarsson B y Zeuthen E (1974). Frequency of 9qh+ and risk of chromosome aberrations in the progeny of individuals with 9qh+. *Human Genetik.* 21, 211-216.
245. Holbek S, Friedrich U, Lauritsen JG y Therkelsen AJ (1974). Marker chromosomes in parents of spontaneous abortuses. *Human Genetik.* 25, 61-64.
246. Funderburk SJ, Klisak I, Sparkes RS y Westlake J (1980). C-band polymorphism: comparison between trisomy 21 cases and mentally retarded controls. *Am J Med Genet.* 5, 2625-269.
247. Wang HS y Hamerton JL (1979). C-band polymorphisms of chromosomes 1, 9, and 16 in four subgroups of mentally retarded patients and a normal control population. *Hum Genet.* 51, 269-275.
248. Podugolnikova OA, Grigorjeva MN y Blumina MG (1984). Relationship of chromosomes 1, 9, 16, and Y to some anthropometric characteristics in children with encephalopathies of unknown etiology and in children with Down syndrome. *Hum Genet.* 68, 254-257.
249. Gardner RJM, McGreanor HR, Parslow NI y Veale AMO (1974). Are 1q+ chromosomes harmless? *Clin Genet.* 6, 383-393.
250. Kunze J y Mau G (1975). A1 and C9 marker chromosomes in children with combined minor and major malformations. *Lancet.* 1, 273.
251. Halbrecht I y Shabtay F (1976). Human chromosome polymorphisms and congenital malformations. *Clin Genet.* 10, 113-122.
252. Funderburk SJ, Guthrie D, Lind RC, Muller HM, Sparkes RS y Westlake JR (1978). Minor chromosome variants in child psychiatric patients. *Am J Med Genet.* 1, 301-308.
253. Nielsen J, Hansen KB, Sillensen I y Videbæk P (1981). Chromosome abnormalities in newborn children. Physical aspects. *Human Genet.* 59, 194-200.

254. Podugolnikova OA y Blumina MG (1983). Heterochromatic regions on chromosomes 1, 9, 16, and Y in children with some disturbances during embryo development. *Hum Genet.* 63, 183-8.
255. Videbech P, Nielsen J, Wohlert M, Eriksen G, Hansen KB, Hvidman L y Krag-Olsen B (1984). The impact of large Y chromosome on pregnancy, foetus and birth. *Clin Genet.* 26, 281-288.
256. Lubs H, Patil W, Kimberling J, Brown M, Cohen P, Gerald F y cols. (1973). Correlations between low IQ, race and variations in Q and C banding. *Am J Hum Genet.* 25, 47A.
257. Nielsen J, Friedrich U, Hreidarsson AB y Zeuthen E (1974). Frequency and segregation of 16qh+. *Clin Genet.* 5, 316-321.
258. Nielsen J, Friedrich U y Hreidarsson AB (1974). Frequency and genetic effect of 1qh+. *Humangenetik.* 21, 193-196.
259. Soudek D y Sroka H (1978). Inversion of fluorescent segment in chromosome 3: a polymorphic trait. *Hum Genet.* 44, 109-115.
260. Matsuura J, Mayer M y Jacobs P (1978). A cytogenetic survey of an institution for the mentally retarded. II. C-band chromosome heteromorphisms. *Hum Genet.* 45, 33-41.
261. Soudek D y Sroka H (1979). Chromosomal variants in mentally retarded and normal men. *Clin Genet.* 16, 109-116.
262. Nielsen J y Friedrich U (1972). Length of the Y chromosome in criminal males. *Clin Genet.* 3, 281-285.
263. Soudek D y Laraya P (1974). Longer Y chromosome in criminals. *Clin Genet.* 6, 225-229.
264. Benezech N, Noël B, Travers E y Mottet J (1976). Conduite antisociale et longueur du chromosome Y. *Hum Genet.* 32, 77.
265. Atkin NB (1977). Chromosome 1 heteromorphism in patients with malignant disease: a constitutional marker for a high-risk group? *Br Med J.* 1, 358.
266. Atkin NB y Pickhall VJ (1977). Chromosomes 1 in 14 ovarian cancers. *Hum Genet.* 38, 25-33.
267. Atkin NB y Baker MC (1977). Pericentric inversion of chromosome 1: frequency and possible association with cancer. *Cytogenet Cell Genet.* 19, 180-184.
268. Atkin NB y Baker MC (1977). abnormal chromosomes and number 1 heterochromatin variant revealed in C-banded preparations from 13 bladder carcinomas. *Cytobios.* 18, 101-109.
269. Atkin NB y Baker MC (1979). Chromosome 1 in 26 carcinomas of the cervix uteri. *Cancer.* 44, 604-613.

270. Shabtai F y Halbrecht I (1979). Risk of malignancy and chromosomal polymorphism: a possible mechanism of association. *Clin Genet.* 15, 73-77.
271. Kivi S y Mikelsaar AV (1980). Q- and C-band polymorphisms in patients with ovarian or breast carcinoma. *Hum Genet.* 56, 111-117.
272. Aguilar L, Lisker R, Ruz L y Mutchinick O (1981). Constitutive heterochromatin polymorphisms in patients with malignant diseases. *Cancer.* 47, 2437-2439.
273. Berger R y Bernheim A (1977). Anomalie de fréquence du chromosome 1 qh+ dans la leucémie myéloïde chronique. *CR Acad Sci, Paris.* 285, 1183-1185.
274. Berger R, Bernheim A, Le Coniat M y Vecchione D (1979). C-banding studies in various blood disorders. *Cancer Genet Cytogenet.* 1, 95-101.
275. Atkin NB y Brito-Babapulle V (1985). Chromosome 1 heterochromatin variants and cancer: a reassessment. *Cancer Genet Cytogenet.* 18, 325-331.
276. Ranni NSM, De Vinuesa ML, De Pargament MM, Slavutsky I y Larripa I (1987). Heterochromatin variants and their association with Noplasias: III. Multiple myeloma. *Cancer Genet Cytogenet.* 28, 101-105.
277. Kivi S y Mikelsaar AV (1987). C-band polymorphisms in lymphocytes of patients with ovarian or breast adenocarcinoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 28, 77-85.
278. Murty VVS, Mitra AB, Singh IP y Luthra UK (1987). Heteromorphisms of C-bands in patients with precancerous and cancerous lesions of the cervix uteri. *Oncology.* 44, 164-168.
279. Kristoffersson U, Bernheim A, Berger R, Nilsson B, Heim S, Mandahl N y Mitelman F (1989). Constitutional C-band polymorphism in lymphocytes from patients with chronic myeloid leukemia. *Hereditas.* 110, 145-148.
280. Nielsen J y Nordland E (1975). Length of Y chromosome and activity in boys. *Clin Genet.* 8, 291-296.
281. Yamada K, Ohta M, Yoshimura K y Hasekura H (1981). A possible association of Y chromosome heterochromatin with stature. *Hum Genet.* 58, 268-270.
282. Fryns JP, Azou M, Jaeken J, Eggemont E, Pedersen JC y Van den Berghe. Centromeric instability of chromosomes 1, 9, and 16 associated with combined immunodeficiency. *Hum Genet.* 57, 108-110.
283. Maraschio P, Zuffardi O, Fior TZ y Tiepolo L (1988).

Immunodeficiency, centromeric heterochromatin instability of chromosomes 1, 9, and 16, and facial anomalies: the ICF syndrome. *J Med Genet.* 25, 173-180.

284. Arrighi A y Cogorno M (1989). Infertilidad. En Esterilidad e Infertilidad Humanas (Tozzini RI, ed). Panamericana, Buenos Aires. 352-368.
285. Egozcue J y Antich J (1977). Infertilidad y esterilidad de origen genético. Aspectos citogenéticos de los abortos. En Genética Médica (Egozcue J, ed). Espaxs, Barcelona 345-358.
286. Käosaar ME (1971). Studies of chromosomes in cases of recurrent abortions. *Genetika.* 7, 117-122.
287. Kulashenko VP, Laziuk GI, Levchenko NN, Savenko LA, Uscev S, Kotovich LG, Zhukova TV y Podleschuk LV (1972). Chromosome aberrations found in parents in cases of recurrent spontaneous abortions. *Genetika.* 8, 154-164.
288. Boué J y Boué A (1973). Chromosomal analysis of two consecutive abortuses in each of 43 women. *Humangenetik.* 19, 275-280.
289. Käosaar ME y Mikelsaar AVN (1973). Chromosome investigation in married couples with repeated spontaneous abortions. *Humangenetik.* 17, 277-283.
290. Tsenghi C, Mataxotou-Stavridaki C, Strataki-Benetou M, Kalpini-Maurou A y Matsaniotis N (1976). Chromosome studies in couples with repeated spontaneous abortions. *Obstet Gynecol.* 47, 463-468.
291. Sulovic V, Markovic S y Diklic V (1977). Parents' chromosome anomalies and spontaneous abortions. *Fert Steril.* 28, 368.
292. Kajii T y Ferrier A (1978). Cytogenetics of aborters and abortuses. *Am J Obstet Gynecol.* 131, 33-38.
293. Heritage DW, English SC, Young RB y Chen ATL (1978). Cytogenetic of recurrent abortions. *Fert Steril.* 29, 414-417.
294. Tsvenkova TG y Yankova MF (1979). C-stained polymorphic variant of chromosomes. *Genetika.* 15, 1870-1879.
295. Holbek S, Friedrich U, Lauritsen JG y Therkelsen AJ (1974). Marker chromosomes in parents of spontaneous abortuses. *Humangenetik.* 25, 61-64.
296. Hemming L y Burns C (1979). Heterochromatic polymorphism in spontaneous abortions. *J Med Genet.* 16, 358-362.
297. Blumberg BD, Shulkin JD, Rotter JI, Mohandas TK y Kaback MM (1981). Chromosomal variants in habitual abortion. *Pediatr Res.* 15, 559.

298. Nordenson I (1981). Increased frequencies of chromosomal abnormalities in families with a history of fetal wastage. *Clin Genet.* 19, 168-173.
299. Carothers AD, Buckton KE, Collyer S, De May R, Frackiewicz A y Smith L (1982). The effect of variant chromosomes on reproductive fitness in man. *Clin Genet.* 21, 280-289.
300. Blumberg BD, Shulkin JD, Rotter JI, Mohandas T y Kaback MM (1982). Minor chromosomal variants and major chromosomal anomalies in couples with recurrent abortion. *Am J Hum Genet.* 34, 948-960.
301. Tho SPT, Byrd JR y McDonough PG (1982). Chromosome polymorphism in 110 couples with reproductive failure and subsequent pregnancy outcome. *Fertil Steril.* 38, 688-694.
302. Ford JH, Callen DF, Jahnke AB y Roberts CG (1982). With pair differences of human chromosome 9 C-bands associated with reproductive loss. *Hum Genet.* 61, 360-363.
303. Ford JH, Callen DF, Roberts CG y Jahnke AB (1983). Interactions between C-bands of chromosomes 1 and 9 in recurrent reproductive loss. *Hum Genet.* 63, 58-62.
304. Maes A, Staessen C, Mens L, Vamos E, Kirsch-Volders M, Lauwers MC, Defrise-Gussenhoven E y Susanne C (1983). C-heterochromatin variation in couples with recurrent early abortions. *J Med Genet.* 20, 350-356.
305. Rodriguez-Gómez MT, Martín-Sempere MJ y Abrisqueta JA (1987). C-band length variability and reproductive wastage. *Hum Genet.* 75, 56-61.
306. Patil SR y Lubs RA (1974). Spontaneous abortions and long Y chromosomes. *Am J Hum Genet.* 26, 66A.
307. Patil SR y Lubs RA (1977). A possible association of long Y chromosomes and fetal loss. *Hum Genet.* 35, 233-235.
308. Nielsen J (1978). Large Y chromosome (Yq+) and increased risk of abortion. *Clin Genet.* 13, 415-416.
309. Genest P (1979). Chromosome variants and abnormalities detected in 51 married couples with repeated spontaneous abortions. *Clin Genet.* 16, 387-389.
310. Diklic V, Kozanovic M, Sulovic V, Garzicic L, Nikolic J, Ljuba L y Dukic S (1981). The variant Y chromosome in individuals with reproductive failures. *Clin Genet.* 19, 499-500.
311. Blumberg BD, Shulkin JD, Rotter JI, Mohandas T y Kaback MM (1980). Habitual abortion and heterochromatic chromosomal polymorphisms. *Am J Med Genet.* 32, 63A.

312. Robertson RD, Leddet I, Punderburk SJ y Sparkes RS (1981). Chromosomal variants and abnormalities in couples with repeated spontaneous pregnancy loss. *Clin Genet.* 29, 116A.
313. Westlake JR, Robertson R, Leddet I, Punderburk SJ y Sparkes RS (1983). Y chromosome length related to fetal loss. *Clin Genet.* 24, 413-419.
314. Verp MS, Rzeszotarski MS, Martin AO y Simpson JE (1983). Relationship between Y-chromosome length and first-trimester spontaneous abortions. *Am J Obstet Gynecol.* 145, 433-438.
315. Verma RS, Shah JV y Dosik H (1983). Size of Y chromosome not associated with abortion risk. *Obstet Gynecol.* 6, 633-634.
316. Genest P y Genest FB (1985). The influence of the length of the human Y chromosome on spontaneous abortions. A prospective study in family lines with inherited polymorphic Y chromosomes. *Ann Génét.* 28, 143-148.
317. Krumina AR, Kroshkina VG y Reshtnikov AN (1987). Q-band polymorphisms in couples with reproductive failure. *Genetika.* 23, 544-548.
318. Fryns JP, Kleczkowska A, Smeets E y Van den Berghe H (1988). A new centromeric heteromorphism in the short arm of chromosome 20. *J Med Genet.* 25, 636-637.
319. Ray M y Pearson J (1979). Nucleolar organizing regions of human chromosomes. *Hum Genet.* 48, 201-210.
320. Boué J, Tailleux JL, Mazaël-Massieux P, Léonard C y Boué A (1975). Association of pericentric inversion of chromosome 9 and reproductive failure in ten unrelated families. *Humangenetik.* 30, 217-224.
321. De la Chapelle A, Schroder A, Stenstraud K, Fellman J, Herva R, Saarmi M, Antolainen I, Tallila I, Tervila L, Tallquist G, Robson ED, Cook RJL y Sanger R (1974). Pericentric inversions of human chromosomes 9 and 10. *Am J Hum Genet.* 26, 746-766.
322. Howard-Peebles FW y Stoddard GR (1977). Inversions of chromosome 9 and associated risk for reproduction. *Am J Hum Genet.* 29, 56A.
323. Howard-Peebles FW (1978). Familial pericentric of chromosome 1 with a note on reproductive risks. *Hum Genet.* 45, 123-125.
324. Alessandro ED, Vaccarella CDM, Re NLL, Cappa F, D'Alfonso A, Discepoli S, Panna MRD y Del Porto G (1988). Pericentric inversion of chromosome 19 in three families. *Hum Genet.* 80, 203-204.
325. Moorhead PS, Nowell RC, Mellman WS, Battips DM y Hungerford

- DA (1960). Chromosome preparations of leucocytes cultured from peripheral blood. *Exp Cell Res.* 20, 613-616.
326. Wang MC y Fedoroff S (1972). Banding in human chromosomes treated with trypsin. *Nat New Biol.* 235, 52-54.
327. Siegel S (1976). *Estadística No Paramétrica*. Trillas, México. 346 p.
328. Ford JH y Lester P (1978). Chromosomal variants and nondisjunction. *Cytogenet Cell Genet.* 21, 300-303.
329. Zhang A, Ming SL y Wilson MG (1987). Effect of C-banded heterochromatin on centromere separation. *Hum Hered.* 37, 285-289.
330. Kaluzewski B, Jokinen A, Horting H y Chapelle A (1978). A theory explaining the abnormality in 45,X/46,XY mosaicism with non fluorescent Y chromosome. Presentation of three cases. *Ann Génét.* 21, 5-11.
331. Vig BK (1981). Sequence of centromere separation: analysis of mitotic chromosomes in man. *Hum Genet.* 57, 247-252.
332. Moorhead IS (1976). A closer look of chromosomal inversions. *Am J Hum Genet.* 28, 294-296.
333. Ballesta F, Fernández E y Mila M (1980). Infertility and chromosomal variations. *Clin Genet.* 17, 87.
334. Bortotto L, Baccichetti C, Lensini E, Tenconi R, Dalendi M y Caufin D (1980). Cytogenetic survey of couples with habitual abortion and other reproductive wastage. *Clin Genet.* 17, 56.
335. Serra A, Bova R, Meri G, Brahe C y Tedeschi B (1980). Potential effects of pericentric inversion of the heterochromatic region of chromosome 9 on reproductive fitness. *Clin Genet.* 17, 87.
336. Ward BE, Henry GP y Robinson A (1980). Cytogenetics studies in 100 couples with recurrent spontaneous abortions. *Am J Hum Genet.* 32, 549-554.
337. Gagné R, Luciani JN, Devictor-Vuillet M y Stahl A (1974). C9 heterochromatin during the first meiotic profase of human foetal oocyte. *Exp Cell Res.* 85, 111-116.
338. Stahl A, Luciani JN, Devictor-Vuillet M, Capodono AM y Gagné R (1975). Constitutive heterochromatin and micronucleoli in the human oocyte at the diplotene stage. *Hum Genet.* 26, 315-327.
339. Atkin NB y Brito-babapulle V (1981). Heterochromatin polymorphism and human cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 3, 261-272.