



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

OBTENCION DE UNA TECNICA DE BANDEO
CROMOSOMICO Y SU APLICACION EN CITOGENETICA

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de

B I O L O G O

P r e s e n t a

CARLOS MARQUEZ BECERRA

México, D. F.

Junio de 1984



Universidad Nacional
Autónoma de México

UNAM



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.

C O N T E N I D O

	Pag.
I.- Introducción	1
II.- Materiales y Métodos	24
III.- Resultados	32
IV.- Discusión	39
V.- Comentarios	47
VI.- Conclusiones	48
VII.- Bibliografía	49

INTRODUCCION.

LA CELULA. Se considera que la célula es la unidad elemental morfofisiológica y de reproducción de los seres vivos y es a partir de ese nivel de organización cuando se puede hablar con propiedad del fenómeno de la vida (Brachet, 1961). Sin embargo para que esto sea real, la célula debe ser ubicada en el espacio y en el tiempo. En el espacio porque las células están dentro de un medio ambiente con el cual están interactuando siempre y en el tiempo porque sus características estructurales y funcionales se están modificando en cada momento (Carrel, 1931).

Entre las células existen muchas características semejantes, tales son: metabolismo, crecimiento, movimiento, - excitabilidad y reproducción. Pero también existen muchas diferencias de modo que se les ha dividido en procariontes y eucariontes. Son procariontes aquellas cuyo material genético se encuentra libre en el citoplasma que lo contenga, en tanto que son eucariontes aquellas cuyo material genético se encuentra rodeado por una envoltura formada por una doble membrana. Entre estos dos tipos de células existen otras diferencias tales como tamaño, ausencia o presencia de mitocondrias, cloroplastos y centríolos, entre otras (Avers, 1983; Tribe, et al. 1931).

A continuación se mencionarán las principales estructuras de las células eucariontes, aunque debe reconocerse que algunas de estas también las poseen las procariontes. Se omitirán a las células procariontes porque a pesar de que estas tienen un cromosoma este es diferente respecto de los que se encuen-

tran en las eucariontes y es de estos últimos de los que tratará el presente trabajo.

La célula eucarionte posee una membrana plasmática que la rodea, que es selectivamente permeable y está constituida por una bicapa lipídica y proteínas. De acuerdo con el modelo de mosaico fluido esos elementos se mueven (Singer y Nicolson, 1972).

En su interior existe una diversidad de estructuras formadas por membranas. El retículo endoplásmico (RE) es una de esas estructuras; al microscopio electrónico se observan cavidades, vesículas y canales, que tienen por función almacenar, procesar y transportar materiales. En algunas regiones del RE se pueden encontrar unidos los ribosomas. Estas regiones constituyen el denominado retículo endoplásmico rugoso. A las zonas libres de ribosomas se les conoce como retículo endoplásmico liso.

Los ribosomas son organitos que pueden encontrarse libres en el citoplasma o asociados al RE y están constituidos por ARNr y proteínas. Sus precursores provienen de nucléolo, el cual será mencionado posteriormente. Su función es sintetizar proteínas a partir de la información de los ARNm que provienen del interior del núcleo (Avers, 1983).

Una estructura formada por membranas lisas y que por esa razón algunos investigadores la han considerado como una diferenciación del retículo endoplásmico liso es el aparato de Golgi. Este se observa como un apilamiento de sacos, con vesículas cerca de sus bordes laterales y algunas de sus regiones están asociadas ya sea con la envoltura nuclear o con el retículo endoplásmico. Es importante en los procesos de modi-

ficación química de las proteínas destinadas a la exportación, así como en la secreción de éstas. Otra de las estructuras producidas y empaquetadas en las membranas del aparato de Golgi es el lisosoma.

El lisosoma es un recipiente que contiene enzimas digestivas y que participa como una unidad de degradación intracelular de materiales propios de la célula o ajenos a ésta (Avers, 1983).

A través de toda su vida la célula, lleva a cabo infinidad de funciones, pero éstas sólo pueden ser realizadas mediante el consumo de energía. La energía es suministrada por las mitocondrias y los cloroplastos. Las mitocondrias son orgánitos formados por dos membranas, de forma diversa aunque la típica es oval y su principal función es proveer con energía a la célula. La energía se obtiene de un compuesto llamado ATP y es producto de la fosforilación oxidativa (Dyson, - 1977). En las células vegetales además de mitocondrias existen cloroplastos que también producen energía, pero mediante un proceso denominado fosforilación fotosintética. Tanto mitocondrias como cloroplastos poseen ADN y son autorreproducibles (Dyson, 1977; Goodenough y Levine, 1970).

Existe en el interior de la célula un citoesqueleto, que está constituido por los microtúbulos, los microfilamentos, los filamentos denominados intermedios, dado que su diámetro se sitúa entre el de los precedentes y la red microtrabecular; que participa en el desplazamiento celular y en el transporte intracelular de macromoléculas, vesículas y cromosomas (Porter y Tucker, 1981; Brabander, 1983).

En la mayoría de las células eucariontes el orgánito más

prominente es el núcleo. Se encuentra delimitado por la envoltura nuclear y en ella se pueden localizar poros cuya función es poco clara, aunque probablemente sirven para comunicar el citoplasma con el interior nuclear. Adentro del núcleo se localiza la cromatina, que está compuesta por ADN, proteínas y una pequeña cantidad de ARN; organizada en estructuras repetitivas cuyas unidades reciben el nombre de nucleosomas (Kornberg y Klug, 1981).

En el ADN nuclear se encuentra codificada la mayor parte de la información genética de la célula, el resto se encuentra en el ADN de las mitocondrias y cloroplastos.

Dentro del núcleo se puede observar una estructura carente de membrana llamada nucleolo, compuesto por cromatina, numerosos gránulos de ARNr y proteínas; que interviene en la formación de los ribosomas (Dyson, 1977; Avers, 1983).

CICLO CELULAR. Las células eucariontes tienen en su vida dos alternativas, una es que ya no se dividan y que desarrollen una actividad muy especializada o bien, la otra alternativa es que se dividan y originen células potencialmente iguales a la progenitora. Cuando las células siguen el camino de la división tienen que crecer, duplicar la información genética y dividirse. A los dos primeros acontecimientos se les ubica dentro del ciclo de generación celular, en el periodo llamado interfase, que es esencial para que pueda ocurrir el tercero, llamado mitosis o división celular (Masia, 1974; Mitchison, 1971).

La interfase y la mitosis constituyen el ciclo celular y ambas se han subdividido en varias etapas o fases con el fin de facilitar el estudio de la vida celular. Durante la mayor

parte de la interfase la cromatina se encuentra en forma de fibras y empieza a espiralizarse, tendiendo a organizarse en cromosomas, hasta los últimos momentos de la fase G_2 . La interfase se ha subdividido en las etapas G_1 , S y G_2 (Hanawalt, 1974; Mazia, 1974).

En la etapa G_1 la célula se prepara para duplicar el ADN por lo que se sintetizan las enzimas necesarias para este proceso; cinasas, ADN polimerasas y algunas de las proteínas cromatínicas. Es probable que también se sinteticen y se formen algunos organitos celulares. En esta etapa se puede apreciar un incremento en la masa celular (Mazia, 1974; Bradbury et al. 1981; Bostock y Sumner, 1978).

En la etapa S se sintetizan el ADN y la mayoría de las histonas que constituyen la cromatina, que posteriormente conformará a los cromosomas. Aquí es necesario señalar que la síntesis del ADN empleado para reparar el ADN dañado puede llevarse a cabo en otras fases (Bostock y Sumner, 1978; Bradbury et al. 1981).

En la etapa G_2 se realizan los últimos preparativos necesarios para que la célula entre en división, habiéndose detectado la síntesis de algunas proteínas. Una vez que ha terminado G_2 se inicia la mitosis (Bradbury et al. 1981; Mazia, 1974).

La mitosis es un proceso detectable al microscopio y que se ha dividido en varias fases, dependiendo éstas, del alargamiento, forma y disposición de los cromosomas en la célula. Las fases son profase, metafase, anafase y telofase. Algunos autores por conveniencia, las han subdividido de tal manera que la profase puede constar de profase temprana, media y tar-

día; las otras fases pueden ser igualmente subdivididas (Garber, 1975; Stebbings y Hyams, 1983).

En profase la cromatina se organiza para dar lugar a los cromosomas, estos se compactan empezando desde muy largos y delgados hasta llegar a moderadamente acortados y con mayor grosor. La envoltura nuclear y el nucléolo se disocian dispersándose en la célula. Se forma el huso acromático y los microtúbulos que lo constituyen unen a centrómeros con centríolos (Bostock y Sumner, 1978; Garber, 1975; Sáez y Cardoso, 1978).

En metafase los cromosomas están conectados por medio de los centrómeros a los microtúbulos del huso acromático, luego se van alineando en el centro de la célula hasta formar la placa ecuatorial (Bostock y Sumner, 1978; Sáez y Cardoso, 1978).

En anafase las cromátidas hermanas que forman cada cromosoma, se van separando por el centrómero para dirigirse cada una de ellas a un polo (Garber, 1975; Bostock y Sumner, 1978).

La telofase se caracteriza porque las cromátidas han llegado a los polos y empiezan a desenrollarse hasta llegar al estado de fibras de cromatina. Se reestructuran la envoltura nuclear y el nucléolo. Se observa el "cinturón" de división que constriñe al citoplasma hasta dividirlo y da origen a dos células hijas concluyendo así un ciclo celular (Bostock y Sumner, 1973; Sáez y Cardoso, 1978).

Dentro de este marco de información cabe mencionar que la estructura cromosómica está cambiando constantemente a tra-

vés del ciclo celular, lo cual se ha demostrado mediante experimentos de fusión de células en metafase con células en otras fases del ciclo celular y provoca entre otros un fenómeno llamado condensación cromosómica prematura (Mazia, 1974; Rao, 1977; Yanishevsky y Carrano, 1975).

LOS CROMOSOMAS. Ya antes se hablaba de los cromosomas, ubicándolos dentro de algunos momentos de la vida celular. También se mencionaron algunas características de la célula por considerar que para comprender la estructura, funcionamiento e importancia de los cromosomas, éstos deben ser situados dentro de un contexto de estructura y función celular.

A continuación se comentan algunas generalidades sobre la forma y estructura de los cromosomas.

Los cromosomas, como ya se ha señalado en párrafos anteriores, sólo son visibles durante la mitosis y en la interfase aparentemente pierden su individualidad, sin embargo aun estando como fibras de cromatina la mantienen, lo cual ha sido confirmado por diversos trabajos. A esta característica se le llama individualidad de los cromosomas (Hienz, 1975).

Otros aspectos desde hace mucho tiempo conocidos, son que todos los organismos poseen un número cromosómico establecido y que sus cromosomas poseen un tamaño y una forma constantes. Estos principios generales tienen sus excepciones y éstas se mencionarán posteriormente (Hienz, 1975; Sáez y Cardoso, 1978).

El número cromosómico no guarda relación alguna con el nivel de organización de cada individuo, así por ejemplo,

la mosca de la fruta (Drosophila melanogaster) posee 8 cromosomas, el sapo (Bufo spp) 22 cromosomas, el hombre (Homo sapiens) tiene 46, el caracol romano (Helix pomatia) con 54, la mariposa española (Lysandra nivescens) 380 cromosomas, etc. (Robles, 1971; Hienz, 1975).

Aunque las especies cercanas a veces presentan un número cromosómico parecido, esto no indica grado de afinidad ya que especies muy lejanas pueden presentar un número cromosómico parecido, ejemplo: el perro (Canis familiaris) y la gallina (Gallus domesticus) cada una de las cuales tiene 78 cromosomas (la gallina puede tener 77 o 78 cromosomas) y a veces especies muy cercanas pueden presentar un número muy diferente, ejemplo: el ciervo de China (Muntiacus reevesi) posee 46 cromosomas y el ciervo de India (Muntiacus muntjac) presenta 6 cromosomas en hembras y 7 en machos (Bengtsson, 1980; Hienz, 1975; Robles, 1971).

En cuanto a forma y tamaño existen varias excepciones, una de ellas ocurre en los cromosomas que determinan el sexo. En general un sexo tiene un par de cromosomas homólogos y el otro un par de cromosomas heterólogos (Hienz, 1975; Sáez y Cardoso, 1978).

En la mayoría de los vertebrados y en muchos insectos el sexo femenino está determinado por un par de cromosomas "X" y el sexo masculino por un cromosoma "X" y uno "Y". En las aves el sexo masculino está determinado por un par de cromosomas homólogos, a diferencia del sexo femenino que está determinado por un par de heterólogos. En otros organismos el cromosoma "Y" no aparece, por lo que un sexo presenta una cifra impar en el juego cromosómico diploide, mientras que el

otro sexo presenta un par cromosómico sexual homólogo y su número diploide es par (Hienz, 1975).

Otras excepciones a la forma y tamaño en los cromosomas de los organismos de una misma especie están incluidas en lo que se denomina polimorfismo cromosómico. El cromosoma polimórfico es el que puede variar en forma y tamaño y cuyo organismo portador presenta fenotipo y descendencia normales. Como ejemplo de estos polimorfismos se puede citar uno detectado en la rata negra (Rattus rattus) en el cromosoma No 1 en donde este puede ser acrocéntrico o submetacéntrico (Yosida, 1976). Otro caso muy conocido es el que se presenta en el cromosoma "Y" humano en donde éste puede variar tanto en tamaño como en forma (Makino, et al. 1963; Lubs, 1970).

Cuando los cromosomas son estudiados en metafase se pueden observar en ellos diversas regiones que se distinguen por su forma. A lo largo del cromosoma se pueden apreciar estrechamientos o constricciones. La constricción más evidente se llama centrómero o constricción primaria. Esta une a las dos cromátidas hermanas que constituyen a cada cromosoma y en virtud de la posición del centrómero cada cromátida puede subdividirse en dos brazos. En el centrómero existe una zona conocida como cinetocoro y es ahí donde se acoplan las fibras del huso acromático que permitirán que cada una de las cromátidas se desplace hacia un polo (Sáez y Cardoso, 1978), Fig. 1a.

Según la posición del centrómero y el tamaño de los brazos, los cromosomas se llamarán metacéntricos cuando el centrómero está en la mitad y sus brazos son iguales; serán submetacéntricos cuando el centrómero esté desplazado ligeramente hacia un extremo dividiendo a las cromátidas en dos brazos

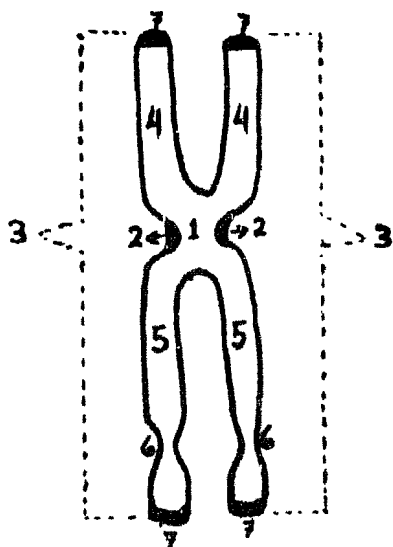
desiguales y serán acrocéntricos cuando el centrómero este desplazado hacia la posición terminal, observándose entonces un brazo largo y otro muy corto que en ocasiones no se ve al microscopio óptico (Garber, 1975), Fig.2.

También pueden apreciarse ocasionalmente algunas constricciones secundarias. Cuando existen son generalmente constantes en su posición y tamaño y se les asocia con el organizador del nucléolo, Fig. 1 a. Esta región del organizador nucleolar se puede localizar por medio de técnicas de hibridación "in situ" utilizando ARNr, marcado con radioisótopos y con otras técnicas que luego se mencionarán (Sáez y Cardoso, 1978).

Existen otras estructuras en los cromosomas llamados satélites. Estos son de forma redonda que parecen estar separados de los cromosomas, pero que se encuentran unidos a ellos por medio de un tallo (Hienz, 1975), Fig. 1 b.

Las regiones terminales de los cromosomas se llaman telómeros; presentan una característica llamada polaridad, que impide que otros segmentos cromosómicos puedan unirse al cromosoma directamente, Figs. 1 a y 1 b.

La descripción anterior está basada en las observaciones realizadas con el microscopio óptico. Con el microscopio electrónico también se han hecho observaciones en cromosomas y en ellos se pueden apreciar en ocasiones madejas o manojos de fibras con regiones alternadas de mayor y menor condensación. En algunas regiones, sobre todo en los telómeros, con frecuencia se ven asas formadas por las fibras de cromatina. En general se puede plantear que las fibras están dirigidas hacia todos los sentidos (Burkholder, 1975; Comings, 1975). Algunos




- 1.- Constricción primaria o centrómero.
- 2.- Cinetocero.
- 3.- Cromátidas hermanas.
- 4.- Braze corto.
- 5.- Braze largo.
- 6.- Constricción secundaria.
- 7.- Telómero.

Figura 1a.- Representación idealizada de un cromosoma submetacéntrico, en donde se muestran algunas de sus regiones.




- 1.- Satélite.
- 2.- Tallo.
- 3.- Centrómero.
- 4.- Braze largo.
- 5.- Telómero.


Figura 1b.- Representación idealizada de un cromosoma acrocéntrico, ahí se indican dos de sus regiones más importantes; talles y satélites.



a.- Cromosoma metacéntrico. Tiene por caracterís__
ticas: dos brazos iguales y un centrómero en
la posición central.



b.- Cromosoma submetacéntrico. Sus característic__
as son: un brazo largo y el otro corto aunque pue__
de observarse siempre y un centrómero desplaza__
do hacia un extremo.



c.- Cromosoma acrocéntrico. Posee un brazo largo
y otro pequeño que en ocasiones no se puede
observar; el centrómero se encuentra practica__
mente en un extremo.

Figura 2.- Representación esquemática de los tres tipos de cromo__
somas humanos.

autores como Xu y Wu (1983), plantean que en microscopía electrónica de transmisión (MET) pueden observarse las principales bandas G en cromosomas metafásicos que no han recibido ningún tratamiento específico para este tipo de bandas. Por otro lado Harrison et al. (1983) han observado en microscopio electrónico de barrido a los cromosomas que no han recibido ningún tratamiento para bandas G y estos presentan en la superficie algunas indentaciones, que se ven incrementadas en número en los cromosomas que han sido tratados para obtener bandas. Es atractivo pensar que tales indentaciones quizás correspondan a las bandas que Xu y Wu (1983) han detectado en MET.

COMPOSICION QUIMICA DE LOS CROMOSOMAS. Están constituidos por cromatina, la cual a su vez consiste principalmente de ADN, histonas, proteínas no histónicas y pequeñas cantidades de ARN (Bradbury et al. 1981).

El ADN se presenta como una doble cadena helicoidal, con bases complementarias apareadas en el centro de la doble hélice. Las bases son: adenina, citosina, guanina y timina.

Las histonas son proteínas básicas que se pueden clasificar en 5 tipos: H1, H2A, H2B, H3 y H4. Son responsables de las estructuras repetitivas básicas de la cromatina llamadas nucleosomas. El nucleosoma está conformado por un complejo octamérico de histonas, en el cual están participando dos de cada una de las siguientes moléculas: H2A, H2B, H3 y H4. A tal octámero el ADN le da dos giros completos y la molécula de H1 actúa ligando el lado del ADN que entra al nucleosoma con el lado que sale (Kornberg y Klug, 1981). Las histonas pueden modificarse químicamente después de la síntesis, por fosforilación, acetilación y metilación en algunos sitios específicos. Estas

modificaciones están involucradas en transiciones de conformación de la cromatina (Bostock y Sumner, 1978; Bradbury et al. 1981; Stein et al. 1975).

Las proteínas no histonas también desempeñan un papel importante en las transiciones de conformación de la cromatina y quizás están involucradas en la estructura de la cromatina transcripcionalmente activa (Bradbury et al. 1981; Stein, et al. 1975). En el cromosoma metafásico las proteínas no histonas constituyen una estructura central o medular, que está en toda su longitud y le proporciona sostén (Paulson y Laemmli, 1977; Satya-Prakash, et al. 1980).

La cromatina se ha clasificado en eucromatina y heterocromatina. La heterocromatina puede ser constitutiva o facultativa. La eucromatina es un tipo de cromatina que a través del ciclo celular cambia su estado de condensación; en interfase se encuentra en estado fibrilar, se condensa a medida que avanza el ciclo hasta quedar totalmente condensada formando los cromosomas en la mitosis. Cuando la mitosis llega a telofase la cromatina empieza a descondensarse y vuelve al estado fibrilar típico de interfase (Bianchi, 1978; Sáez y Cardoso, 1978).

En contraste con ese comportamiento algunas regiones de la cromatina generalmente están condensadas, a este tipo de material se le llama heterocromatina, siendo facultativa aquella que resulta de la inactivación del cromosoma "X" y la constitutiva es la que se encuentra en regiones específicas de los cromosomas como centrómeros, telómeros y otras (Bianchi, 1978).

BANDAS CROMOSOMICAS. Hasta aquí todo lo citado corresponde a

la estructura y forma de los cromosomas que no han recibido ningún tipo de tratamiento para su observación. Estos datos corresponden a la primera etapa de la Citogenética moderna, se consideran comprendidos en dicha etapa los siguientes acontecimientos: la aplicación de la colchicina a cultivos de células con el objeto de inhibir la formación del huso acromático y detener la mitosis en metafase, la aplicación del choque hipotónico con el fin de romper las células y obtener cromosomas dispersos y el empleo de cultivo de tejidos. En la Citogenética humana se puede mencionar además la correcta cuantificación del número normal de 46 cromosomas y la aplicación de las lectinas como estimulantes de la división en los linfocitos (Hienz, 1975; Kelly, 1980).

La segunda etapa comienza con el descubrimiento de las bandas en cromosomas humanos realizados por Caspersson, et al. en 1970, quienes emplearon el fluorocromo quinacrina. Desde entonces se ha avanzado rápidamente en el conocimiento de la morfología, ultraestructura y funcionamiento de los cromosomas.

En seguida se indicarán las zonas y estructuras más relevantes de los cromosomas que se pueden apreciar cuando son tratados de diferente manera.

BANDAS Q. Fueron las primeras bandas obtenidas mediante el tratamiento de los cromosomas con mostaza de quinacrina (Caspersson, et al. 1970). Gracias a este método se pudieron identificar por primera vez los pares homólogos de los grupos cromosómicos A, B, C, D, E, F y G, los inconvenientes del método son que las bandas desaparecen después de un tiempo relativamente corto y al hecho de emplearse microscopía de fluorescencia

de la cual no se dispone en todos los laboratorios. Se piensa que las bandas aparecen debido a que en esas regiones hay ADN repetitivo rico en adenina y timina y que probablemente está íntimamente unido a proteínas de carácter básico (Caspersson, et al. 1970; Comings, 1973).

BANDAS G. Este tipo de bandas es análogo a las bandas Q con algunas diferencias, pero para fines prácticos tiene una utilidad semejante. Para obtenerlas existen muchas posibilidades: por tratamientos enzimáticos, empleando tripsina y pronasa (Derr, 1977; Seabright, 1971); tratamientos con soluciones salinas a temperaturas variables aunque generalmente son cercanas a 60°C, empleando un tiempo prolongado (Bhasin y Foerster, 1972; Chaudhuri, et al. 1971) y en último término se pueden señalar técnicas basadas en tratamientos con urea o con soluciones a pH elevado (Patil, et al. 1971). Todas estas técnicas requieren de una tinción con Giemsa aunque ésta puede ser sustituida por otros colorantes. Se han planteado varias hipótesis sobre el mecanismo de aparición de estas bandas, quizás la más aceptada es la que propone que las bandas G se presentan debido a la estructura básica de los cromosomas, formada por la ubicación de los cromómeros y que únicamente requiere resaltarse con los tratamientos. Los cromómeros parecen representar centros de condensación de la cromatina situados a lo largo del cromosoma. Se llegó a la citada hipótesis a partir de diversos reportes tales como en los que se indica que las bandas G aparecen en cromosomas que no han recibido ningún tratamiento o en los que el tratamiento ha sido ligero, también fue importante la información proveniente de los cromosomas en G2, obtenida mediante estudios realizados tanto en microscopía óp-

tica como en microscopía electrónica; así mismo la idea se vió muy apoyada cuando se comprobó que el patrón de bandas G correspondía al patrón de cromómeros de los cromosomas meióticos (Comings, 1973).

BANDAS F. Estas bandas se obtienen por medio de un tratamiento con una solución salina y tiñendo con Feulgen. El patrón de bandas es similar aunque no idéntico a los patrones de bandas G y Q, en este se puede apreciar algunas diferencias situadas en las regiones teloméricas y en ciertas zonas de heterocromatina (Rodman, 1974).

BANDAS R. Las técnicas para obtenerlas son menos numerosas que las empleadas para obtener bandas G. Estas bandas se obtienen principalmente después de tratar los cromosomas con soluciones salinas a elevadas temperaturas y de teñir con Giemsa o naranja de acridina. Su localización es opuesta a la correspondiente a las bandas G y Q y generalmente resalta a los telómeros. Por esta última característica es considerada muy útil puesto que permite reconocer alteraciones pequeñas en las zonas terminales de los cromosomas. En la formación de estas bandas está involucrado ADN rico en guanina y citosina (Dutrillaux, 1977; Comings, 1973).

BANDAS T. Representan una fracción de las bandas R, precisamente la porción terminal de las cromátidas, la cual es la más resistente al tratamiento térmico. Se pueden obtener patrones de bandas intermedios entre R y T, mediante tratamientos graduales y se logran utilizando como técnica base, la empleada para bandas R (Dutrillaux, 1973; Scheres, 1974).

BANDAS C. Se han descrito muchos métodos para obtenerlas,

en los que se utilizan soluciones de hidróxido de sodio, hidróxido de bario, formamida, urea; generalmente a temperaturas altas y seguidos por una tinción con Giemsa (Arrighi y Hsu, 1971; Merrick, et al. 1973; Ozkinay y Mitelman, 1979; Scheres, 1974). Estas bandas se localizan en los sitios donde se encuentra en mayor cantidad la heterocromatina constitutiva; las regiones centroméricas y algunas pericentroméricas de los brazos largos de los cromosomas 1, 9, 16 y Y. Se suponía que la producción de estas bandas se debía a una desnaturalización y renaturalización de ADN altamente repetitivo. Sin embargo existen datos que señalan que esta suposición es incorrecta, puesto que no todas las bandas C contienen ADN repetitivo y además se ha comprobado que las técnicas de bandas C tienen por consecuencia la extracción de hasta el 50% de ADN cromosómico, específicamente el que se encuentra en las bandas claras; en tanto que retienen el ADN de las bandas oscuras. A pesar de estos datos existen otros en los que se obtienen bandas C con tripsina la cual solo actúa sobre proteínas. Por consiguiente el mecanismo de formación de estas bandas no es conocido (Comings, 1978).

BANDAS Cd. Son poco utilizadas y se pueden obtener tratando los cromosomas con soluciones salinas a temperaturas elevadas. Corresponden a estructuras de forma discoidal ubicadas en la zona centromérica y son sitios donde se unen los microtúbulos del huso acromático. Se sospecha que aparecen debido a un complejo ADN-proteína resistente al calor (Eiberg, 1974 a).

BANDAS N. Estas bandas se pueden obtener tratando a los cromosomas con ácido tricloroacético o con ácido clorhídrico y tiñendo con algunas sustancias argénticas y alternativamente

con Giemsa. Indican las regiones organizadoras del nucléolo lo cual ha sido verificado mediante hibridación "in situ" con ARN 18S y ARN 28S marcado con tritio (Howell y Black, 1978; Matsui y Sasaki, 1973).

MÉTODOS DINÁMICOS DE BANDEO. A las técnicas antes citadas que emplean básicamente cromosomas fijados, se pueden añadir varios procedimientos que se fundamentan en la dinámica celular y que consisten en introducir en cultivos celulares un marcador específico del ADN, el que en fase S se incorporará a las nuevas cadenas de ADN y por consiguiente los cromosomas aparecerán marcados.

Obviamente todos estos métodos dinámicos son consecuencia del conocimiento de la célula y sus constituyentes, así como de los mecanismos involucrados en su funcionamiento.

El primero de dichos métodos fue la autorradiografía, utilizándose para ello timidina tritiada. Esto fue establecido por Taylor y colaboradores al final de la década de los 50 (Taylor, 1958; idem, et al. 1957). Poco después se empleó la 5-bromo-desoxiuridina (BrdU) que es un análogo de la timidina, con el objeto de marcar los cromosomas de algunos mamíferos (Djordjevic y Saybalski, 1960; Hsu y Sommers, 1961). Este último método ha sido muy empleado en los últimos 15 años puesto que con él se pueden obtener bandas R, Q e intermedias entre ambas (Dutrillaux, 1977). Además de poder observarse bandas de buena calidad, también se puede evidenciar un fenómeno conocido como intercambio de cromátidas hermanas, gracias al cual se han estudiado los efectos mutagénicos de algunas sustancias y agentes físicos (Nicholas, et al. 1979; Wolff, 1977).

El ciclo celular también se ha logrado estudiar empleando 5-BrdU (Leonard y Decat, 1979; Morimoto y Wolff, 1980).

Existen algunos otros métodos de menor uso; entre estos se pueden citar los que emplean actinomicina D, cicloheximida y heparina que inducen bandas que se aplican antes de iniciar la cosecha (de 2 a 4 horas). Este último grupo no es propiamente dinámico y se le puede llamar de manera general como "Metodología de inducción de bandas en cromosomas prefijados" (Hsu, et al. 1973; Rønne, 1977; Simeonova y Tchacarov, 1980).

IMPORTANCIA Y UTILIDAD DE LOS METODOS DE BANDEO. Cuando se comparan los primeros intentos de clasificación de los cromosomas humanos basados en tamaño, posición de centrómero y relación de brazos (Böök, et al. 1960) con los actuales sistemas de clasificación que también consideran tamaño y posición de centrómero, pero que sobre todo se fundamentan en los patrones de bandas de los pares individuales (ISCN, 1979); queda solamente aceptar que se ha avanzado mucho en este aspecto.

La utilidad de los diversos métodos de bandeo cromosómico, es evidente cuando se considera que por medio de estos se han podido detectar anomalías cromosómicas, en casi todos los cromosomas del cariotipo humano, así como en muchas de sus bandas, pudiéndose establecer correlaciones importantes e interesantes entre fenotipos y cariotipos anormales (Kajii, et al. 1980; Lewandowsky y Yunis, 1975; Mattei, et al. 1981).

De igual modo la utilidad de los procedimientos de bandeo es reconocida en otras áreas del conocimiento, siendo un fuerte apoyo no solo para el citogenetista clínico, sino que también son de utilidad a los genetistas celular y molecular

que intentan aclarar los mecanismos de regulación génica en eucariontes, así como establecer mapas genéticos (Creagan y Ruddle, 1977; Ruddle y Kucherlapati, 1974).

Los oncólogos y virólogos también han usado las técnicas de bandeo cromosómico en sus intentos por identificar los mecanismos que originan diversos tipos de cáncer (Cairns, 1981; Croce y Koprowski, 1978). Asimismo las han aplicado los evolucionistas que establecen las probables trayectorias que han seguido las especies, a través del tiempo y el espacio y que construyen sus relaciones filogenéticas (Dutrillaux, 1977; Egozcue, 1977).

Es deseable que esas técnicas tan útiles estuvieran al alcance de cualquier persona que tuviera la necesidad de emplearlas. Sin embargo, esto no es así, ya que a pesar de que existen muchas técnicas descritas para obtener los diversos patrones de bandas, estas no son siempre reproducibles o son muy lentas, como ejemplo las que emplean soluciones salinas calientes o son rápidas como las enzimáticas, pero en ellas algunos segundos de más o de menos en el tratamiento, pueden producir bandas de mala calidad, por ello inútiles. Los tiempos del tratamiento son variables dependiendo de la marca de la enzima y de la edad de ésta, requiriéndose además, que las diluciones empleadas sean de elaboración reciente. Complica aún más la situación el hecho de que muchas veces esas técnicas no pueden emplearse porque se carece de elementos necesarios como el microscopio de fluorescencia y algunos reactivos.

Pensando en esta problemática que para algunos expertos

puede ser insignificante, pero que, para quienes empezamos a trabajar en este campo, representa un reto metodológico en el que se necesita vencer, se decidió realizar un trabajo que aportara una alternativa práctica. Por tal motivo se analizaron muchos de los reportes sobre bandas G citados en la literatura y se escogieron dos de las técnicas más sencillas y baratas; la de Patil, et al. (1971) y la de Sánchez, et al. (1973).

La técnica de Patil et al. (1971) se basa en la tinción de las preparaciones con una solución que consiste de 2 ml de fosfato de sodio dibásico dodecahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$) 0.14 M ^{2ml de Giemsa} 36 ml de H_2O ajustada a pH 9 con ácido cítrico ($\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) o con hidróxido de sodio (NaOH). El tiempo de tinción que recomiendan es de 5 minutos, aunque también señalan que obtienen bandas con tiempos que van de 4 a 10 minutos. Esta técnica es el resultado de una serie de experimentos en donde se aplicaron soluciones colorantes que tenían un pH de 5 a 12 y únicamente el pH 9 fue eficaz en la producción de las bandas denominadas por ellos G9, pero que equivalen a las bandas G obtenidas mediante otros tratamientos. También se probaron soluciones cuya molaridad varió desde 0.003 M hasta 0.14 M y observaron que esto no produjo ningún cambio cualitativo, sin embargo mencionan que el tiempo de tinción se incrementó de 5 a 30 minutos, sin aclarar a que concentración fue necesario este aumento. Plantean que la incubación de las preparaciones en la solución de fosfatos a pH 9 durante 2 a 30 minutos antes de la tinción, no altera el patrón de bandas. En relación con el grado de contracción de los cromosomas indican que esto es importante, ya que en me-

tafase temprana solo observan un patrón cromomérico discreto y la identificación de los homólogos les parece difícil. En cromosomas de metafase tardía, parece que obtienen resultados poco satisfactorios ya que la identificación de homólogos también les presenta dificultades. Los mejores resultados los obtienen en metafase media en preparaciones de buena calidad.

La técnica antes descrita, según algunos autores como Grace y Bain, (1972) y experiencia nuestra, no es reproducible bajo las condiciones señaladas por Patil et al. (1971). No obstante es pertinente señalar que existen varios reportes en los que se indica la obtención de bandas mediante tratamientos con soluciones a pH alcalino, entre estos se encuentra el trabajo de Meisner et al. (1974), quienes emplearon un tratamiento que consistió en una solución isotónica de KCl o un buffer de fosfatos a pH 9.2 durante 10 a 30 minutos, a temperatura ambiente, para obtener bandas G. No indican otras particularidades del procedimiento. Otros autores también han aplicado el factor pH alcalino, pero solo como una parte de un procedimiento complejo que requiere de otros pasos para obtener bandas G (Georgian, et al. 1974; Drets y Shaw, 1971).

Existen otras técnicas en las que se aplica el principio de pH alcalino para obtener otro tipo de bandas, entre estas se encuentran las reportadas por Bobrow, et al. (1972) y Gagné y Labergé (1972), quienes emplean una solución con pH cercano a 11 para obtener una tinción específica del cromosoma humano No 9.

Por otro lado, la técnica descrita por Sánchez et al. (1973) se fundamenta en teñir las preparaciones de cromosomas con

Giemsa diluída 1:100 en buffer de fosfatos 0.13 M a pH 6.7 durante 20 minutos o bien con Wright diluido 1:4 en el mismo buffer, durante 1 a 2 minutos. Con estos procedimientos obtienen bandas en preparaciones recién elaboradas, pero la calidad es mejor en preparaciones que se han guardado durante tres o más días.

Al considerar los reportes citados, relacionados con la producción de bandas mediante el empleo de soluciones con pH elevado, se pensó en que existía la posibilidad de obtener una técnica para bandas G aplicando este mismo principio y que en caso de obtenerse, ésta podría optimizarse si se combinaran el factor pH elevado con una dilución de colorante semejante a la empleada por Sánchez et al. (1973).

Como las técnicas mencionadas fueron aplicadas en cromosomas humanos obtenidos de linfocitos, nosotros también realizamos los ensayos en ellos hasta conseguir buenas bandas. Posteriormente se intentó probar su eficacia en cromosomas de otros organismos. Lo ideal sería que las pruebas se llevaran a cabo en organismos de varias especies, pero considerando que un trabajo de esta naturaleza llevaría mucho tiempo, del cual no se dispone, entonces solo se ensayó en cromosomas de pez (Tilapia hornorum). Se escogió este pez porque en principio se pretendía probar la eficacia de la técnica y me parece que usar un organismo u otro para este fin particular, es lo mismo. Otra razón es porque se tuvo acceso a varios individuos de esta especie, los que al igual que otros de este mismo género pero de especie diferente (Tilapia mossambicus), poseen un número cromosómico diploide de 44 y sus cariotipos aparentemente son iguales. Por lo tanto aquí existe un problema taxonómico inte-

resante, a cuya solución se puede hacer una aportación, en caso de que la técnica fuese aplicable.

OBJETIVOS.

- 1.- Establecer una técnica de bandas G que sea sencilla, rápida, poco costosa y muy reproducible.
- 2.- Que sea aplicable en diversos campos de la Citogenética.

MATERIALES Y METODOS.

Se trabajó con cromosomas de humanos y de peces.

HUMANO. Los cromosomas humanos se obtuvieron de cultivos de linfocitos realizados de acuerdo a la técnica propuesta por Arakaki y Sparkes, (1963) modificada.

En tubos de ensaye de 9 ml marca Pyrex No 9820 se vertieron: 1 ml de medio Mc Coy 5 a modificado, 3 gotas de fitohemaglutinina M y 1 gota de antibióticos. Las sustancias son de la marca Microlab y las dos últimas se añadieron con una aguja 20X25 mm (1"). Se agregaron a cada tubo 6 gotas de sangre periférica completa sin aguja, la cual fue extraída en condiciones estériles con jeringa heparinizada.

Los tubos se incubaron a 37 °C, con una inclinación de aproximadamente 20° durante 71 horas, al término de este periodo se inició la cosecha agregando a cada tubo, 3 gotas de colchicina marca Merck a una concentración de 4µg/ml y se reincubaron durante 40 minutos a 37°C. Luego se centrifugaron a 1000 rpm durante 8 minutos. Se desechó el sobrenadante empleando pipetas Pasteur con bulbo, dejando aproximadamente 0.5 ml. Se añadió a cada tubo 5 ml de solución de KCl 0.075 M a 37°C, se resuspendió el botón celular y se dejó en incubación durante 15 minutos. Posteriormente se centrifugó bajo las condiciones ya citadas, se desechó el sobrenadante y se agregó al precipitado 5 ml de fijador formado por ácido acético y metanol 1:3, resuspendiendo y manteniendo a temperatura ambiente durante 15 minutos; volviendo a centrifugar y lavar con fijador hasta que el botón quedó de color blanquecino.

Se guardó el material cosechado en refrigeración a 5°C

durante 24 horas y se hicieron preparaciones mediante la técnica de goteo, soplado y secadas a la flama o al aire.

Las preparaciones fueron teñidas con Giemsa diluido 1:20 en cada una de las soluciones de los ensayos A y B.

AI. Soluciones de fosfato de sodio dibásico dodecahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) a las concentraciones 0.01 M, 0.1 M y 0.2 M con pH 3 a 12, durante 3, 5, 10, 15, 20 y 30 minutos a temperatura de 18 a 20°C. El pH se ajustó por medio de ácido cítrico ($\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) o con hidróxido de sodio (NaOH). Con estos ensayos se pretendió reproducir el trabajo de Patil *et al.* (1971). Tabla I.

AII. Solución que contiene 0.02 g de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4), 0.073 g de fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4), 0.3 g de cloruro de potasio (KCl), 8.0 g de cloruro de sodio (NaCl) y 2.0 g de glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) por litro de agua destilada; con 0.2 g de EDTA ($\text{Na}_2\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8 \cdot \text{H}_2\text{O}$), con pH 8 a 12 durante 5, 7, 10, 12, 15 y 20 min a una temperatura entre 18 y 20°C. El pH se ajustó como en AI.*

AIII. Soluciones de: Borato de sodio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$); Tris (hidroximetil) aminometano; Borato de sodio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) mas fosfato de sodio ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$); Borato de sodio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) + EDTA ($\text{Na}_2\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); Tris (hidroximetil) aminometano + Fosfato de sodio ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$); Tris (hidroximetil) aminometano + EDTA ($\text{Na}_2\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Todos a 0.1 M con pH 3 a 12, durante 5, 10, 15 y 20 min a una temperatura de 18 a 20°C. Tablas IIIA y IIIB. Las soluciones de Boratos se ajustaron con ácido Bórico (H_3BO_3) o con Hidróxido de sodio (NaOH).

* Tabla II.

Tabla I.

TINCIONES INDICADAS EN AI Y NUMERO DE REPETICIONES

pH	0.01 M				0.1 M					0.2 M				
3					2R	2R	2R							
4					2R	2R	2R							
5					2R	2R	2R	2R						
6					2R	2R	2R	2R						
7					2R	2R	2R	2R						
8	2R	2R	2R	2R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	2R	2R	2R
9	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R
10	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R
11					2R	2R	2R	2R						
12					2R	2R	2R	2R						

3 5 10 15 3 5 10 15 20 30 3 5 10 15
tiempo (min)

2R= dos repeticiones

3R= tres repeticiones

Tabla II.

TINCIONES INDICADAS EN AII Y NUMERO DE REPETICIONES

pH	Sol. AII con EDTA						Sol. AII sin EDTA					
8	2R		2R		2R		2R		2R		2R	
9	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R
10	2R	2R	2R	2R	2R	2R	2R	2R	2R	2R	2R	2R
11	2R		2R		2R		2R		2R		2R	
12	2R		2R		2R		2R		2R		2R	

5 7 10 12 15 20 5 7 10 12 15 20
tiempo (min)

2R= dos repeticiones

3R= tres repeticiones

Tabla III A.

TINCIONES INDICADAS EN AIII Y NUMERO DE REPETICIONES

pH	Tris 0.1 M				Tris+Na ₂ HPO ₄ 0.1M				Tris + EDTA 0.1 M			
	5	10	15	20	5	10	15	20	5	10	15	20
8	2R	2R	2R									
9	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R
10	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R
11	2R	2R	2R									
12	2R	2R	2R									

tiempo (min)

2R= dos repeticiones

3R= tres repeticiones

Tabla III B.

TINCIONES INDICADAS EN AIII Y NUMERO DE REPETICIONES

pH	Na ₂ B ₄ O ₇ 0.1 M				Na ₂ B ₄ O ₇ +Na ₂ HPO ₄ 0.1M				Na ₂ B ₄ O ₇ + EDTA 0.1M			
	5	10	15	20	5	10	15	20	5	10	15	20
8	2R	2R	2R									
9	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R
10	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R
11	2R	2R	2R									
12	2R	2R	2R									

tiempo (min)

2R= dos repeticiones

3R= tres repeticiones

Las soluciones de Tris se ajustaron con ácido clorhídrico (HCl) o con hidróxido de sodio (NaOH).

- B. Con la solución AII con EDTA a pH 9 y a 18-20°C se tiñeron dos grupos de preparaciones, unas secadas al aire y otras a la flama durante 5, 10 y 15 minutos. Tabla IV.
- C. Se probaron diluciones de Giemsa con la solución citada en AII con EDTA; estas fueron desde 1:10 hasta 1:100 con pH 6.7 y pH 9, durante 3, 5, 10, 15 y 20 minutos. Tabla V.

PEZ. Los cromosomas de pez se obtuvieron del epitelio branquial siguiéndose el procedimiento utilizado por Mc Phail y Jones (1966) y modificado por Uribe-Alcocer (1983); el cual consistió en inyectar intraperitonealmente al pez 1 ml de solución de cloruro de calcio (CaCl) al 1%, manteniéndolo vivo; 2 horas después se le inyectó 1 ml de colchicina al 0.1 %, intramuscularmente en los paquetes anterodorsales. Posteriormente se le sacrificó mediante descerebración y se le extrajeron los arcos branquiales, que fueron colocados en una caja de petri que contenía cloruro de potasio (KCl) al 0.075 M, ahí se rasparon suavemente las branquias con el fin de obtener células, usándose para ello un bisturí. Con una pipeta Pasteur se transfirió la solución que contenía las células a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 800 rpm durante 5 min, se tiró el sobrenadante y se fijó con metanol y ácido acético 3:1. Nuevamente se centrifugó bajo las mismas condiciones, se tiró el sobrenadante y se agregó fijador; se homogeneizó pipeteando, se volvió a centrifugar, se desechó el sobrenadante y se conservó el botón celular. Con ese material se hicieron preparaciones mediante goteo y fueron secadas a la flama.

Tabla IV.

TINCIONES INDICADAS EN B Y NUMERO DE REPETICIONES

pH	Secadas al aire			Secadas a la flama		
	9	3R	3R	3R	3R	3R
	5	10	15	5	10	15

3R= tres repeticiones

Tabla V.

TINCIONES INDICADAS EN C Y NUMERO DE REPETICIONES

pH	Dilución 1:10			Dilución 1:20				Dilución 1:40				
	6.7	2R	2R	2R	2R	2R	2R	2R	2R	2R	2R	2R
9	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R
	3	5	10	3	5	10	15	3	5	10	15	20

pH	Dilución 1:60					Dilución 1:80					Dilución 1:100				
	6.7	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R
9	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R	3R
	3	5	10	15	20	3	5	10	15	20	3	5	10	15	20

tiempo (min)

2R= dos repeticiones

3R= tres repeticiones

Tabla VI.

TINCIONES INDICADAS EN EL METODO PARA PECES Y NUMERO DE REPETICIONES

pH	Dilución 1:20					
	7		1P	1P	1P	1P
9	2R	3R	3R	3R	2R	2R
	3	6	9	12	15	20

tiempo (min)

1P= una preparación

2R= dos repeticiones

3R= tres repeticiones

Con las preparaciones se hicieron dos grupos: un grupo fue teñido con Giemsa diluida 1:20 en la solución AII con EDTA a pH 7 y el otro grupo se tiñó con la misma solución a pH 9, durante un tiempo entre 3 y 20 min a una temperatura entre 18 y 20°C. Tabla VI.

El pH de todas las soluciones se midió con un potenciómetro marca Corning (Scientific Instruments) modelo 5, ajustándose al pH deseado inmediatamente antes de usarse.

Las preparaciones fueron examinadas con un fotomicroscopio Carl Zeiss, modelo 1. Se observaron en las preparaciones buenas aproximadamente 50 mitosis que se encontraban desde profase hasta metafase tardía.

Las microfotografías se tomaron con la cámara integrada en el fotomicroscopio, usando película Technical pan film de Kodak, Asa 100.

El revelado se hizo con Dektol durante 6 min, luego se pasó al fijador Kodak durante 4 min y se lavó durante 30 min en flujo constante de agua. El negativo se secó durante 24 horas a temperatura ambiente.

Las impresiones se hicieron en papel Kodabromide F-3, empleando una amplificadora marca Leitz Focomat Ic. Se revelaron con Dektol durante 1 o 2 min, se fijaron durante 4 min con fijador Kodak y se lavaron durante 30 min en un flujo constante de agua. Para secarlas se empleó una secadora marca Arkay, Corp.

Los cromosomas humanos obtenidos en las impresiones fotográficas se recortaron y con ellos se construyeron cariotipos

siguiendo las indicaciones del sistema internacional de nomenclatura en Citogenética humana (ISCN) de 1978.

RESULTADOS.

Se revisaron experimentalmente los pasos seguidos por Patil *et al.* (1971) probándose así el primer grupo de soluciones (AI) señalado en la metodología, obteniéndose los siguientes resultados (Tabla VII):

Con las soluciones a pH 3 y pH 4 se observó una tinción rosa pálido homogénea. Con pH de 5 a 8 la tinción es semejante a la convencional que se realiza con pH 7; esto es, una coloración homogénea y consistente (Fig. 3). En las preparaciones teñidas con Giemsa a pH 9, se observa una diferenciación de los cromómeros en profase y prometafase, en tanto en metafase media se observó cierta desnaturalización aunque indefinida y en metafase avanzada se presenta una tinción homogénea. Esto ocurre con tiempos de 5, 10 y 15 minutos, con los tiempos restantes la coloración es homogénea. No se apreció ningún efecto de las concentraciones sobre la calidad de lo observado y el tiempo solo modifica la intensidad de la coloración.

Es pertinente señalar que en preparaciones no tratadas y teñidas con Giemsa con pH 6.7 a 7.6 se observan los cromómeros en cromosomas profásicos aunque no tan claros como con la tinción con Giemsa a pH 9. Con pH 10 se obtuvo cierta desnaturalización en algunos cromosomas. Con pH 11 y 12 se observó una tinción homogénea variando la intensidad según el tiempo de tratamiento.

Los datos de los reportes que señalan los efectos del pH alcalino en los cromosomas, fueron parcialmente apoyados por los datos obtenidos a partir de las tinciones con Giemsa a

Tabla VII.

RESULTADO DE LAS TINCIONES CON LAS SOLUCIONES AI.

pH	0.01 M				0.1 M						0.2 M			
3					TH	TH	TH							
4					TH	TH	TH							
5					TH	TH	TH	TH						
6					TH	TH	TH	TH						
7					TH	TH	TH	TH						
8	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH
9	TH	BI	BI	BI	TH	BI	BI	BI	TH	TH	TH	BI	BI	BI
10	TH	TH	TH	TH	TH	TH	DC	DC	TH	TH	TH	TH	DC	DC
11					TH	TH	TH	TH						
12					TH	TH	TH	TH						

3 5 10 15 3 5 10 15 20 30 3 5 10 15

tiempo (min)

TH= tinción homogénea

BI= bandas incipientes

DC= desnaturalización cromosómica

Tabla VIII.

RESULTADO DE LAS TINCIONES CON LAS SOLUCIONES AII.

pH	Sol. AII con EDTA						Sol. AII sin EDTA					
8	TH		TH		TH		TH		TH		TH	
9	BI	CB	CB	CB	TH	TH	BI	CB	CB	CB	TH	TH
10	TH		DC		TH	TH	TH	DC	DC	DC	TH	TH
11	TH		TH		TH		TH		TH		TH	
12	TH		TH		TH		TH		TH		TH	

5 7 10 12 15 20 5 7 10 12 15 20

tiempo (min)

TH= tinción homogénea BI=bandas incipientes

DC= desnaturalización cromosómica

CB= con bandas



Fig. 3. Cromosomas humanos en metafase teñidos homoganeamente.



Fig. 4. Cromosomas metafásicos humanos con bandas G.

pH 9. Ante tales indicios se continuó probando la solución AII (Tabla VIII). Con esta solución a pH 8 la coloración de los cromosomas fue homogénea y consistente, parecida a la tinción con pH 7. Los tiempos cambian solamente la intensidad de la coloración. Empleando pH 9 durante 5 minutos se observó una tinción débil y homogénea aunque en aproximadamente el 25% de profases, prometafases y metafases se insinuó un patrón de bandas. El patrón de bandas se hizo muy evidente con 7, 10 y 12 minutos en un 70% de las profases, prometafases y metafases. Aunque las mejores bandas se observaron en prometafases y metafases medias (Figs. 4, 5, 6), en metafase tardía se observó desnaturalización. Con 15 y 20 minutos la tinción fue homogénea y no se diferenciaron las bandas. El incluir en la solución EDTA o no, parece no afectar la calidad de las bandas. Con pH 10 se provoca desnaturalización cromosómica con los tiempos de 7, 10 y 12 minutos. Cuando la tinción se hizo con soluciones a pH 11 y 12 se observó una coloración homogénea con una intensidad variable que dependió del tiempo.

Con las soluciones de AIII (Tabla IX A y B), tanto de boratos como de Tris a pH 8 se obtuvo una coloración homogénea, en cambio cuando se emplearon soluciones de boratos a pH 9 se logró bandear un porcentaje muy bajo de mitosis, aproximadamente el 10%. La calidad de las bandas fue de regular a mala, a diferencia de cuando se usaron las soluciones de Tris con pH 9, el porcentaje de mitosis bandeada aumentó aproximadamente al 15% y la calidad de las bandas fue ligeramente mejor, aunque en términos generales se puede plantear que la calidad fue inaceptable. Las mitosis restantes no ban-



Fig. 5. Cromosomas metafásicos humanos con bandas G.

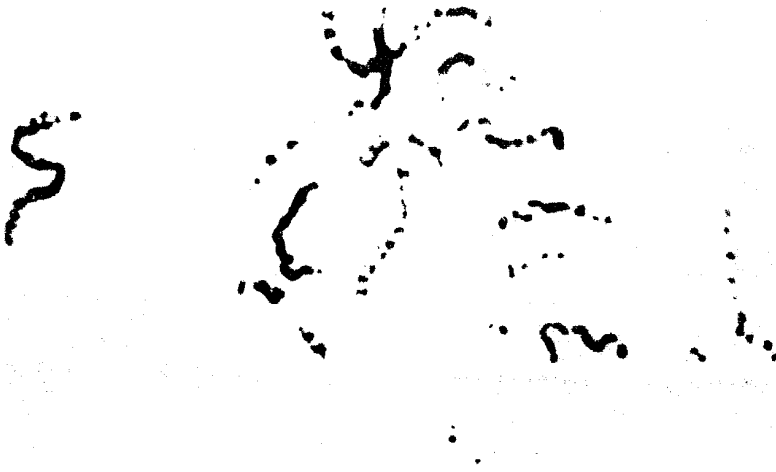


Fig. 6. Cromosomas prometafásicos humanos con bandas G.

Tabla IX A.

RESULTADO DE LAS TINCIIONES CON LAS SOLUCIONES AIII

pH Tris 0.1 M Tris+Na₂HPO₄ 0.1M Tris+EDTA 0.1M

8	TH	TH	TH									
9	CB	CB	CB	TH	CB	CB	TH	TH	CB	CB	CB	
10	TH	DC	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH
11	TH	TH	TH									
12	TH	TH	TH									

5 10 15 20 5 10 15 20 5 10 15 20
tiempo (min)

TH= tinción homogénea

DC= desnaturalización cromosómica

CB= con bandas

Tabla IX B.

RESULTADO DE LAS TINCIIONES CON LAS SOLUCIONES AIII

pH Na₂B₄O₇ 0.1M Na₂B₄O₇+Na₂HPO₄ 0.1M Na₂B₄O₇+EDTA 0.1M

8	TH	TH	TH									
9	BI	CB	TH	TH	BI	CB	TH	TH	CB	CB	TH	TH
10	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH
11	TH	TH	TH									
12	TH	TH	TH									

5 10 15 20 5 10 15 20 5 10 15 20
tiempo (min)

TH= tinción homogénea

BI= bandas incipientes

CB= con bandas

deadas se tiñeron homogéneamente. Las soluciones con pH 10 a 12, tanto con boratos como con Tris, aparentemente no provocaron efecto alguno en los cromosomas y simplemente los tiñeron homogéneamente con intensidades variables que dependieron del tiempo.

En relación con el efecto de la solución AII a pH 9 sobre las preparaciones de cromosomas que fueron secadas al aire o a la flama (ensayo B), aparentemente no existieron diferencias entre ambos grupos, en la cantidad de mitosis bandeadas ni en la calidad de las bandas (Tabla X).

Las pruebas con diversas diluciones del Giemsa en la solución AII a pH 6.7 no mostraron bandas en los cromosomas. Los datos obtenidos solo señalan que se pueden obtener tinciones aceptables con diluciones de 1:10 a 1:70 en tiempos relativamente cortos que oscilan de 3 a 20 minutos. A diferencia de las tinciones débiles obtenidas con diluciones mayores que además necesitaron mas tiempo. Las diluciones en AII, 1:20 y 1:40 a pH 9 inducen buenas bandas en tiempo de 5 y 10 minutos, con otros tiempos la tinción es homogénea. Con las otras diluciones no se pudieron obtener buenas bandas (Tabla XI).

Las preparaciones de cromosomas de pez teñidas con Giemsa, diluída en solución AII a pH 7, adquirieron una coloración homogénea (Fig. 7). En las preparaciones de cromosomas de pez que se tiñeron con Giemsa diluída en solución AII a pH 9, se observó que con 3, 6 y 9 minutos se teñían uniformemente y no se observaron bandas; con 12 y 15 minutos se logró inducir cierto grado de desnaturalización en algunas metafa-

Tabla X.

RESULTADO DEL ENSAYO B

pH	Secadas al aire			Secadas a la flama		
	CB	CB	TH	CB	CB	TH
9	5	10	15	5	10	15

tiempo (min)

TH= tinción homogénea
CB= con bandas

Tabla XI.

RESULTADO DE LAS TINCIONES CON LAS SOLUCIONES C

pH	Dilución 1:10			Dilución 1:20				Dilución 1:40					
	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	
6.7	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH
9	TH	CB	CB	TH	CB	CB	TH	TH	CB	CB	TH	TH	TH

3 5 10 3 5 10 15 3 5 10 15 20

pH	Dilución 1:60					Dilución 1:80					Dilución 1:100				
	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH
6.7	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH	TH
9	TH	TH	CB	BI	TH	TH	TH	BI	BI	TH	TH	TH	TH	TH	TH

3 5 10 15 20 3 5 10 15 20 3 5 10 15 20

tiempo (min)

TH= tinción homogénea
BI= bandas incipientes
CB= con bandas

Tabla XII.

RESULTADO DE LAS TINCIONES EN LOS CROMOSOMAS DE PECES

pH	Dilución 1:20					
		TH	TH	TH	TH	
7		TH	TH	TH	TH	
9	TH	TH	TH	DC	DC	TH

3 6 9 12 15 20

tiempo (min)

TH= tinción homogénea
DC= desnaturalización cromosómica



Fig. 7. Cromosomas metafásicos de pez teñidos homogéneamente.



Fig. 8. Cromosomas metafásicos de pez ligeramente desnaturalizados que muestran algunas regiones teñidas intensamente.

ses y en algunos cromosomas se pudo apreciar una tinción intensa en algunas zonas que al parecer son de heterocromatina, Fig. 8. Con 20 minutos de tinción no se logró diferenciar bandas (Tabla XII). De acuerdo con los datos aquí expuestos, la técnica establecida para cromosomas humanos no es aplicable a cromosomas de pez, sin embargo bajo otras condiciones podría ser empleada.

DISCUSION.

Los resultados obtenidos indican que la técnica de Patil, et al. (1971)-ensayos AI- no es fácilmente reproducible, lo cual no significa que el principio de pH elevado sea incapaz de resaltar las bandas cromosómicas, ya que este mismo principio es apoyado fuertemente por otros trabajos, como los de Bobrow, et al. (1972) y Gagné y Labergé, (1972) quienes emplearon una solución de Giemsa a pH alcalino, aproximadamente 11, para obtener una tinción específica en el cromosoma 9 de humano y lograr diferenciar zonas en otros cromosomas. Estos reportes fueron apoyados posteriormente por Wyandt, et al. (1976). Existen mas trabajos en donde uno de los pasos para obtener bandas G consiste en tratar a los cromosomas con pH alcalino, aunque este paso va acompañado por otros tratamientos (Drets y Shaw, 1971; Georgian, et al. 1974; Meisner, et al. 1974). También Eiberg (1974a) reporta haber incubado los cromosomas en la solución salina balanceada (BSS) de Earle a pH 8.5 o 9, a 85°C, durante 45 minutos con el objeto de obtener bandas Cd. Tal cantidad de información no hace mas que apoyar la posibilidad de que el factor pH alcalino sea capaz de inducir la aparición de bandas en los cromosomas. Sin embargo existen muchos datos que no fueron proporcionados por los autores tales como el tiempo de tratamiento hipotónico, el tiempo que los cromosomas permanecieron en el fijador y la edad de las preparaciones y sin estos la reproducción de la técnica resulta difícil. Estos detalles en algunos artículos son omitidos parcial o totalmente ya que algunos autcrees simplemente no los toman en cuenta (Drets y Shaw, 1971; Alfi, et al.

1971; Bobrow et al. 1972; Chaudhuri, 1971). Sin embargo otros autores si los han considerado importantes (Hatami-Monasa, 1974; Eiberg, 1974a y b; Meisner et al. 1974).

Por considerar las grandes posibilidades que tiene el factor pH elevado para inducir la manifestación de las bandas y reconsiderando algunos detalles importantes que no fueron proporcionado por los autores se trabajó con "tratamientos señalados en la metodología y cuyos resultados ya se han citado.

En cuanto a la información proporcionada por el tratamiento con las soluciones AI a pH menor de 9. coincidimos con Patil et al. (1971), ya que tampoco observaron algún patrón de bandas; a un pH superior a 10 al igual que ellos tampoco se obtuvieron bandas, sin embargo a pH 9, a pesar de que no se obtuvo un patrón de bandas definido, si se logra insinuarlo, por lo que se intentó resaltarlo con alguna solución diferente y debido a esto se probó la solución AII que se utiliza frecuentemente para diluir tripsina.

No se intentó probar concentraciones ya que las ensayadas en AI no indicaron diferencias en los resultados, lo cual apoyó los datos de Patil et al. (1971).

Con la solución AII a pH 8 no se observó ningún patrón de bandas, a pH 10 a 12 sólo se observó ocasionalmente daño cromosómico, en este aspecto también se coincidió con lo reportado por Patil et al. (1971) y con Gagné y Labergé (1972).

Al usar pH 9 se logró obtener un patrón de bandas consistente, entre los tiempos de 5 a 12 minutos. Con estos datos se apoya nuevamente a Patil et al. (1971) y se coincide

con Gagné y Labergé, (1972) en que el pH es uno de los puntos críticos ya que puede o no resaltar algunas bandas cromosómicas. Al igual que Bobrow et al.(1972), consideramos que los tiempos pueden ser determinados empíricamente, aunque comunmente estos se encuentran alrededor de 10 minutos.

Se probó el EDTA ya que se pensó en la posibilidad de que esa sustancia al eliminar la actividad de los iones de calcio facilitaría el proceso de bandeado, tal y como lo señala Comings, (1978). Sin embargo no se vió una diferencia clara entre la calidad de las bandas obtenidas con las soluciones que contenían EDTA y las obtenidas sin ésta, por lo tanto esta apreciación debe tomarse con reserva.

A pesar de que la solución AII resultó ser buena para la obtención de bandas G, esta tiene el inconveniente de no mantener el pH 9 constante sino que tiende a bajarlo. Esto resulta natural ya que las soluciones amortiguadora de fosfatos tienen su intervalo de funcionamiento entre pH 7.2 y 7.6. Por lo tanto es necesario guardar en refrigeración la solución y corregir el pH cada vez que se vaya a usar. Otra posibilidad es congelar inmediatamente la solución y cada vez que se use, descongelar a temperaturas menores de 37°C, porque de este modo se logra mantener constante el pH de 9. Esto último es resultado de las observaciones hechas durante el desarrollo del trabajo. Se pudo apreciar que la calidad de las bandas disminuyó cuando se usaron soluciones viejas aunque no es posible precisar que la disminución en la calidad hubiera sido consecuencia de la solución empleada y no de otros factores. Por esta duda es recomendable usar soluciones recién preparadas; esto también es sugerido por Gagné

y Labergé (1972), sin embargo no es mencionado por otros autores como Patil et al. (1971), Bobrow et al. (1972), Wyandt et al. (1976).

Pretendiendo buscar una alternativa para esta situación, se probaron otras soluciones que mantuvieran constante el pH 9 y estas fueron las del grupo AIII. Se inició esta parte probando primero las soluciones de Tris y Boratos sin fosfatos y sin EDTA, pero se observaron resultados no satisfactorios, por lo que se decidió hacer otras soluciones que tuvieron por base Tris o Boratos, pero complementadas con fosfatos.

La incorporación de fosfatos se decidió ya que los autores que usan Giemsa generalmente la diluyen en soluciones de fosfatos y por otro lado Comings (1975 y 1978) ha señalado que los colorantes tiazina como el azul A, B y C, azul de metileno y tionina, los cuales son componentes del Giemsa, interaccionan iónicamente con los grupos fosfato del ADN y que el máximo de interacciones ocurre cuando existe una molaridad semejante entre el colorante y los grupos fosfatos del ADN.

Al considerar estos datos se pensó que los primeros resultados podrían mejorarse con la adición de fosfatos, lo cual en nuestros ensayos no resultó valioso. Cabe señalar que estas preparaciones eran de mala calidad, por lo que quizás valga la pena intentar trabajar con estas soluciones en preparaciones de mejor calidad.

Con respecto de la parte B de la metodología en donde se señala que se trabajó con dos grupos de preparaciones; uno con preparaciones secadas al aire y el otro con preparaciones

secadas a la flama, se debe aclarar que se hizo debido a que en algunos reportes se hace esta distinción en tanto en otros no. Por ejemplo Patil et al. (1971) y Bobrow et al. (1972) utilizaron preparaciones secadas al aire y no indicaron por qué motivo lo hicieron; Kajii et al. (1972) y Georgian et al. (1974) emplearon preparaciones secadas a la flama y tampoco señalaron razones.

Existen algunos otros trabajos que no señalan que tipo de secado utilizaron (Gagné y Labergé, 1972; Meisner et al. 1974). Sin embargo hay algunos autores que coinciden en que puede haber diferencias entre las preparaciones secadas de un modo u otro por lo que han empleado los dos tipos, entre ellos están Bhasin y Foerster, (1972) quienes omiten señalar si encontraron diferencias entre los grupos por lo que se supone no las hubo. Por otro lado Vass y Sellyei, (1973) emplearon también los dos tipos de preparaciones y obtuvieron buenos resultados en ambos, aunque señalan que emplearon tratamientos diferentes; 2X solución salina de citrato (SSC) a 60°C, para las secadas al aire, mientras que la solución para las preparaciones secadas a la flama fue 4XSSC a 60°C por lo que si hubo alguna diferencia. Entre los dos grupos de preparaciones que se usaron en el presente trabajo no se encontraron diferencias claras ya que hubo buenas bandas en los dos tratamientos.

En la parte C de la metodología se intentó reproducir una vez mas la técnica de Sánchez et al. (1973) lo cual no fue posible; sin embargo también se pretendía encontrar una dilución que permitiera optimizar la técnica. Lo que se puede señalar de esta parte es que solo se lograron obtener datos que permi-

tirán aprovechar mejor el colorante, ya que estos señalan que se pueden obtener tanto tinciones convencionales como bandas de buena calidad, con diluciones de 1:10 a 1:60, en tiempos relativamente cortos que oscilan de 3 a 20 minutos; con diluciones mayores la tinción es débil y el tiempo necesario es considerablemente mayor.

Con respecto de los tratamientos a los cromosomas de pez se puede mencionar que la técnica aplicada a estos cromosomas es prometedora ya que se logró cierto grado de desnaturalización cromosómica así como la diferenciación de algunas regiones aparentemente heterocromáticas en varias metafases, lo cual quizás es un indicio de la formación de bandas. Las bandas no se pudieron obtener debido probablemente a que los cromosomas de pez son demasiado pequeños si se comparan con los cromosomas humanos, este es un detalle que pudiera justificar la carencia de reproducibilidad de la técnica. Por lo tanto es recomendable emplear cromosomas prometáfásicos o de metafases iniciales cuando se pretenda obtener bandas en cromosomas ya que en metafase terminal son pequeños.

Para terminar la discusión sólo deseamos señalar que se hizo un último ensayo en el cual se confrontaron la técnica de Patil, et al. (1971) descrita en la introducción con la técnica modificada por nosotros ya presentada que nos proporcionó buenos resultados (AII, en esta ocasión con EDTA). Se emplearon preparaciones elaboradas con material recién cosechado y con material que se había refrigerado a 5°C durante 24 horas, se secaron a la flama. Se tilaron durante 5, 7 y 10 minutos. Los resultados indican que con la técnica de Patil,

et al. (1971) se produce desnaturalización cromosómica en más del 50% de las mitosis y solo en pocas mitosis se pueden apreciar bandas incipientes. Con 10 minutos la mayoría de las mitosis están teñidas homogéneamente pero con menor intensidad. En cambio la técnica que hemos propuesto produce bandas de buena calidad en aproximadamente el 75% de las mitosis con los tiempos de 7 y 10 minutos. Con 5 minutos el número de mitosis bandeada disminuye hasta aproximadamente el 60% y las bandas son de menor calidad que con 7 y 10 minutos. Con la técnica de Patil, et al. (1971) los cromosomas profásicos y prometafásicos no presentan bandas y en metafase tardía se produce desnaturalización cromosómica; con nuestra modificación sí se observan bandas en todos ellos y en metafase tardía los cromosomas se mantienen en mejor estado. En cuanto a estos últimos resultados y considerando todos los anteriores se puede plantear que el pH 9 no es el único factor que está interviniendo en la inducción de las bandas, aunque sí es importante. Es posible que la composición de la solución y su tonicidad sean los factores que complementan al pH para producir ese tipo de bandas; que tal vez son inducidas debido a la eliminación de alguna o varias proteínas no histonas. Se plantea este posible mecanismo ya que se ha determinado que ciertos procedimientos empleados para obtener bandas G (SSC, urea, NaCl-urea y tripsina) eliminan varias proteínas no histonas (Burkholder y Duczek, 1982). Estos mismos autores también han planteado la posibilidad de que solo sea extraída totalmente una de estas proteínas.

La razón por la cual nosotros pensamos en un efecto similar por parte de la técnica de Giemsa a pH 9 es la siguiente:

si consideramos que los cromosomas son estructuras compuestas por ADN y una mezcla de proteínas y que en un momento dado se ajustara el pH de la mezcla de proteínas hasta el pH isoelectrico de uno de sus componentes, entonces la mayor parte de las proteínas precipitarían, esto es que permanecerían en su conformación nativa, quedando por consiguiente en el cromosoma, mientras que se solubilizarían la(s) proteína(s) cuyo pH isoelectrico se hallara por encima o por debajo de aquel.

Ahora bien, cuando se aplica la técnica con Giemsa a pH 9, quizás primero ocurra la extracción de la(s) no histona(s) de los cromosomas, luego como consecuencia de ello tal vez se presente un rearrreglo de las fibras de cromatina y al mismo tiempo que suceden esos eventos las moléculas del colorante se están adhiriendo al cromosoma, por último se lavará de la preparación el resto de colorante junto con las no histonas solubilizadas.

Después del anterior planteamiento puede surgir la siguiente pregunta ¿Por qué no producen bandas todas las soluciones a pH 9 con que se diluye el colorante Giemsa? La respuesta que se puede plantear al ser consecuente con las explicaciones anteriores, es que para una proteína determinada, en este caso la(s) causante(s) de la inducción de bandas, el pH isoelectrico variará según sea la composición iónica del medio puesto que las proteínas pueden unirse a ciertos aniones o cationes (Lehninger, 1932).

Se consideraron para estas suposiciones solo a las proteínas no histonas ya que existen evidencias de que las histonas no están involucradas en el fenómeno que produce las bandas G (Comings y Avelino, 1974).

COMENTARIOS.

A manera de comentarios podemos mencionar que la técnica que se ha modificado y que nos ha proporcionado buenos resultados es sencilla, barata y requiere poca inversión de tiempo, por lo tanto se puede considerar como una alternativa. Nosotros la estamos aplicando con resultados aceptables en la elaboración de cariotipos de humanos (Fig. 9).

Consideramos que el principio de pH elevado es eficaz en la producción de bandas G, pero es necesario que se elija una solución adecuada. Por consiguiente se recomienda a los interesados en la obtención de este tipo de bandas, pero en otros organismos, que lo tomen en cuenta.

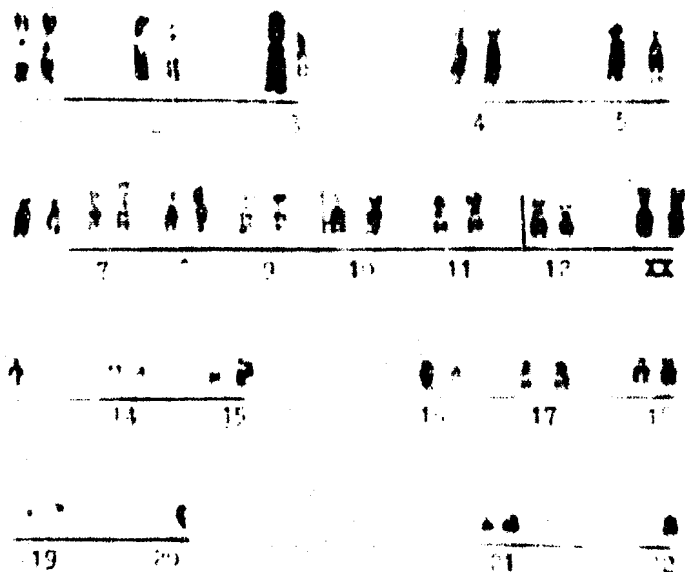


Fig. 9. Cariotipo normal humano femenino teñido por el método de Giemsa a pH 9.

CONCLUSIONES

- Se puede concluir en este trabajo, al igual que en los reportes de otros autores, que el pH elevado es capaz de inducir la aparición de bandas.
- El pH 9 es indispensable en la obtención de bandas G en las técnicas de bandeado con pH alcalino, pero deberá emplearse una solución adecuada como la AII.
- La técnica que aquí se recomienda puede ser reproducida con facilidad en cromosomas humanos obtenidos de linfocitos.
- En peces no se pudo reproducir la técnica que resultó eficaz en humanos. Sin embargo la coloración intensa que adquirieron algunas regiones cromosómicas, pudieran representar evidencias de que si es factible su aplicación.
- La técnica podrá ser considerada como una alternativa ya que es sencilla y requiere de una inversión pequeña en costo y tiempo.

BIBLIOGRAFIA .

- 1.- Alfi, O.S., Donell, G.N. y Derencsery, A. (1973) C-banding of human chromosomes produced by D.N.ase. *Lancet* II(7827):505.
- 2.- Arakaki, D.T. y Sparkes, R.S. (1963). Microtechnique for culturing leukocytes from whole blood. *Cytogenetics* 2:57-60.
- 3.- Arrighi, F.H. y Hsu, T.C. (1971) Localization of heterochromatin in human chromosomes, *Cytogenetics* 10:81-86.
- 4.- Avers, Ch.J. (1983) *Biología Celular*. Ed. Iberoamericana, México, D.F. 532 p.
- 5.- Bengtsson, B.O. (1980). Rates of Karyotype evolution in placental mammals. *Hereditas* 92:37-47.
- 6.- Bhasin, M.K. y Foerster, W. (1972). A simple banding technique for identification of human metaphase chromosomes. *Humangenetik* 14:247-250.
- 7.- Bianchi, N.O. (1978). Duplicación cromosómica y heterocromatina a nivel molecular y citológico. O.E.A., Monografía No 19 Washington, D.C. 98 p.
- 8.- Bobrow, M., Madam, K. y Pearson, P.L. (1972). Staining of some specific regions of human chromosomes, particularly the secondary constriction of No 9. *Nature* 238: 122-124.
- 9.- Böök, J.A. y 13 autores mas. (1960). A proposed standard system of nomenclature of human mitotic chromosomes, Denver Colorado, *Lancet* 1:1063.

- 10.- Bostock, C.J. y Sumner, A.T. (1978). The Eukaryotic Chromosome. Ed. North Holland, N.Y. 525 p.
- 11.- Brabander, M.J. (1983). El citoesqueleto y la vida celular. Mundo Científico (La Recherche, versión castellana). 28:922-933.
- 12.- Brachet, J. (1961) The living cell. Sci.Am. 205:50-61.
- 13.- Bradbury, E.M., Maclean, N. y Matthews, H.R.(1981) DNA, Chromatin and Chromosomes. Blackwell. Sci. Pub. Oxford, G.B. pp.171-201.
- 14.- Burkholder, G.D. (1975). The ultraestructure of banded-G and C-Chromosomes. Exp. Cell. Res. 90:269-278.
- 15.- Burkholder, G.D. y Duczek, L.L. (1982). The effect of chromosome banding techniques on the proteins of isolated chromosomes. Chromosomes 87:425-435.
- 16.- Cairns, J. (1981). The origin of human cancer. Nature 289:353-357.
- 17.- Carrel, A. (1931). The new cytology. Science 73(1930): 297-303.
- 18.- Caspersson, T., Zech, L., Johansson, C. y Modest, E.J. (1970). Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents. Chromosoma 30:215-227.
- 19.- Chaudhuri, J., Vogel, W., Voiculescu, I. y Wolf, V. (1971) A simplified method of demonstrating Giemsa-band pattern in human chromosome. Human-genetik 14:83-84.
- 20.- Comings, D.E. (1975 a). Mechanisms of chromosome banding IV. Optical properties of the Giemsa dyes. Chromosoma 50: 89-110.

- 21.- Comings, D.E. (1973). Mechanisms of chromosome banding and implications for chromosome structure. *Ann. Rev. Genet.* 12:25-46.
- 22.- Comings, D.E. y Avelino, E. (1974). Mechanisms of chromosome banding. II Evidence that histones are not involved. *Exp. Cell Res.* 86:202-206.
- 23.- Comings, D.E. y Okada, T.A. (1975 b). Mechanisms of chromosome banding. VI Whole mount electron microscopy of banded metaphase chromosome and a comparison with pachytene chromosomes. *Exp. Cell. Res.* 93:267-274.
- 24.- Greagan, R.P. y Ruddle, F.H. (1977). New approaches to human gene mapping by somatic cell genetics. En: Yunis, J.J. (Ed.) *Molecular structure of human chromosomes*. Academic Press. New York, pp. 233-261.
- 25.- Croce, C.M. y Koprowski, H. (1978). The genetics of human cancer. *Sci. Am.* 238:117.
- 26.- Derr, R.J. (1977). Two-minute method for banding human chromosomes. *Lancet* 2:1141.
- 26.- Djorkjevic, B. y Szybalski, W. (1960). Genetics of human cell lines. III. Incorporation of 5-bromo and 5-iododeoxyuridine into the deoxyribonucleic acid of human cell its effect on radiation sensitivity. *J. Exp. Med.* 112:509.
- 27.- Drets, M.E. y Shaw, M. (1971). Specific banding patterns of human chromosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 68:2037-2077.
- 28.- Dutrillaux, B. (1973). Nouvelle System de Marquage Chromosomique: Les bandes T. *Chromosoma* 41:395-402.

- 29.- Dutrillaux, B. (1977). New chromosomes techniques. En: Yunis J.J. (Ed.) Molecular structure of human chromosomes. Academic Press, N.Y. pp.233-261.
- 30.- Dyson, R.D. (1977). Principios de Biología Celular. Ed. F.E.I. México, D.F. pp.5-31.
- 31.- Egozcue, J.E. (1977). Evolución cromosómica de los primates. Investigación y Ciencia 9:72:81.
- 32.- Eiberg, H. (1974). New selective Giemsa technique for human chromosomes Cd staining. Nature 248:55.
- 33.- Eiberg, H. (1974 b). Satellite staining of human chromosomes. Lancet II:836-837.
- 34.- Gagné, R. y Labergé, C. (1972). Specific cytological recognition of heterochromatin segment of number 9 chromosome in man. Exp. Cell. Res. 73:239-242.
- 35.- Garber, E.D. (1975). Introducción a la Citogenética. CECSA, México, D.F. pp.32-39.
- 36.- Georgian, L., Moraru, I. y Lenghel, Z. (1974). Chromosome banding in ascitic cell. Lancet 1:208-209.
- 37.- Goodenough, U. y Levine, P.P. (1970). The genetic activity of the mitochondria and chloroplast. Sci.Am.223(5): 22-29.
- 38.- Grace, E. y Bain, A.D. (1972). A simple method for chromosome banding. J. Clin. Pathol. 25:910-911.
- 39.- Hanawalt, P.C. (1974). Cell Growth and Proliferation. Mc Graw Hill. U.S.A. pag.16.
- 40.- Harrison, C.J., Allen, T.D. y Harris, R. (1983). Scanning

- electron microscopy of variation in human metaphase chromosome structure revealed by Giemsa banding. *Cytogenet. Cell Genet.* 35:21-27.
- 41.- Hatami-Monazah, F. (1974). Banding and Chromatid separation in chinese hamster chromosomes. *Nature* 249:327-328.
- 42.- Hienz, H.A. (1975). *Cromosomas*. Ed. Alhambra, Madrid, España, 571 p.
- 43.- Howell, W.M. y Black, D.A. (1978). A rapid technique for producing silver stained nucleolus organizer regions and trypsin Giemsa bands on human chromosomes. *Human Genet.* 43(1):53-56.
- 44.- Hsu, T.C., Pathak, S. y Shafer, D.A. (1973). Induction of chromosomes cross banding by treating cell with chemical agents before fixation. *Exp. Cell. Res.* 79:484-487.
- 45.- Hsu, T.C. y Sommers, C.B. (1961). Effect of 5-bromodeoxyuridine on mammalian chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 47:396.
- 46.- ISCN (1973). An international system for human cytogenetic nomenclature. *Birth Defects* 14, No 3. The National Foundation, New York.
- 47.- Kajii, T., Ferrier, A., Miikawa, N., Takahara, H., Ohama, K. y Avirachan, S. (1980). Anatomic and Chromosomal anomalies in 622 spontaneous abortuses. *Hum. Genet.* 55:87-93.
- 48.- Kajii, T., Ohama, Y., Avirachan, S. y Avirachan, T.T. (1972). Trypsin banding of Giemsa-stained chromosomes.

Lancet II:1311-1312.

- 49.- Kelly, T.E. (1980). Clinical Genetics and Genetic Counseling. Year Book Med. Pub., Chicago. U.S.A. pp-1-21.
- 50.- Kornberg, R.D. y Klug, A. (1981). The nucleosome. Sci. Am. 244 (2):52-64.
- 51.- Lehninger, A. (1982). Bioquímica. 2a. ed. Omega, Barcelona, España. p.166.
- 52.- Leonard, A., Decat, G. (1979). Relation between cell cycle and yield of aberrations observed irradiated human lymphocytes. Can.J. Genet. Cytol. 21:473-478.
- 53.- Lewandowski, R.G. y Yunis, J.J. (1975). New chromosomal syndromes. Am. J. Dis. Child 129:515-529.
- 54.- Lubs, H.A. (1970). Cytogenetic Problems in Antenatal Diagnosis. En: Harris, M. (Ed.) Early Diagnosis of human genetic defects. Scientific and Ethical Considerations. Fogarty Int. Center Proc. No 6, Bethesda, Maryland, pp. 67-79.
- 55.- Makino, S., Sasaki, M.S., Yamada, K. y Kajii, T. (1963). A long Y chromosome in man. Chromosoma 14:154-161.
- 56.- Matsui, S.S. y Sasaki, M. (1973). Differential staining of nucleolus organizers in mammalian chromosomes. Nature 246:148-150.
- 57.- Mattei, J.F., Mattei, M.G., Baeteman, M.A. y Giraud, F. (1981). Trisomy 21 for the region 21 q 223: Identification by high resolution R-Banding patterns. Hum. Genet. 56:409-411.

- 58.- Mazia, D. (1974). The Cell cycle. *Sci. Am.* 230:54-64.
- 59.- Mc Phail, J.D. y Jones, R.L. (1966). A simple technique for staining chromosomes from teleost fishes. *J. Fish. Res. Bd Canada* 23(5):767.
- 60.- Meisner, L.F., Chuprevich, T.H., Inhorn, S.L. y Johnson, C. (1974). Dye-nucleoprotein interactions in giemsa banding. *J. Cell Biol.* 61:248-253.
- 61.- Merrick, S., Ledley, R.S. y Lubs, H.A. (1973). Production of G- and -C banding with progressive trypsin treatment. *Pediat. Res.* 7:39-44.
- 62.- Mitchison, J.M. (1971). *The Biology of the Cell Cycle*. Cambridge University Press, Gran Bretaña, 313 p.
- 63.- Morimoto, K. y Wolff, S. (1980). Cell cycle kinetics in human lymphocyte cultures. *Nature* 288:604-606.
- 64.- Nicholas, A.H., Vienne, M. y Berge, H.V.D. (1979). Induction of sister chromatid exchanges in cultured human cells by an organophosphorous insecticide: Malathion. *Mutat. Res.* 67:167.
- 65.- Ozkinay, C. y Mitelman, F. (1979). A simple trypsin giemsa technique producing simultaneous G- and -C banding in human chromosomes. *Hereditas* 90:1-4.
- 66.- Patil, S.R., Merrick, S. y Lubs, H.A. (1971). Identification of each human chromosomes with a modified giemsa stain. *Science* 173:321-322.
- 67.- Paulson, J.R. y Laemmli, U.K. (1977). The structure of histone depleted metaphase chromosomes. *Cell* 12:317-323.

- 63.- Porter, K.R. y Tucker, J.B. (1931). The ground substance of the living cell. *Sci. Am.* 244(3):40-51.
- 69.- Rao, P.N. (1977). Premature chromosome condensation and the fine structure of human chromosomes. En: Yunis, J.J. (Ed.) *Molecular structure of human chromosomes*. Academic Press, New York, pp. 205-229.
- 70.- Robles, S.R. (1971). *Terminología Fitogenética y Citogenética*. Herrero, México, D.F. 165p.
- 71.- Rodman, T.C. (1974). Human chromosome banding by feulgen stain aids localizing classes of chromatin. *Science* 194:171
- 72.- Rønne, M. (1977). In vitro induction of G-bands with cycloheximide. *Hereditas* 36:107-110.
- 73.- Ruddle, F.M. y Kucherlapati, R.S. (1974). Hybrid cells and human genes. *Sci. Am.* 231(1):36-44.
- 74.- Sáez, F.A. y Cardoso, H. (1978). *Citogenética básica y Biología de los cromosomas*. O.E.A. Monografía No 20 Washington, D.C., 124p.
- 75.- Sánchez, O., Escobar, J.I. y Yunis, J.J. (1973). A simple G-banding technique. *Lancet* II(7323):269.
- 76.- Satya-Prakash, K.L., Hsu, T.C. y Pathak, S. (1980). Behavior of the chromosome core in mitosis and meiosis. *Chromosoma* 31:1-3.
- 77.- Scheres, J.M. (1974). Production of C- and T-bands in human chromosomes after heat treatment at high pH and staining with "stains-all". *Humangenetik* 23:311-314.

- 73.- Seabright, M. (1971). A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* II:971-972.
- 79.- Simeonova, M. y Tchacarov, E. (1980). Prefixation chromosome banding with heparin. *Hum. Genet.* 56:63-66.
- 80.- Singer, S.J. y Nicolson, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175:720.
- 81.- Stebbings, H. y Hyams, J.S. (1983). Movilidad celular. C.E.C.S.A., México, D.F. pp. 177-201.
- 82.- Stein, G.S., Stein, J.S. y Kleinsmith, L.J. (1975). Chromosomal proteins and gene regulation. *Sci. Am.* 232(2):46.
- 83.- Taylor, J.H. (1958). Sister chromatid exchanges in tritium labeled chromosomes. *Genetics* 43:515-529.
- 84.- Taylor, J.H., Woods, P.S. y Hughes, W.L. (1957). The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 43:122-127.
- 85.- Tribe, M.A., Morgan, A.J. y Whittaker, P.A. (1981). The evolution of eukaryotic cells. Edward Arnold, Londres, 60p.
- 86.- Uribe-Alcocer, M., Arreguín-Espinoza, J., Torres-Padilla, A. y Castro-Pérez. (1983). Los cromosomas de Dormidador maculatus (Gobiidae-Peciformes). *An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nacional Auton. México* 10 (en prensa).
- 87.- Vass, L. y Sellyei, M. (1973). Heated giemsa solution for producing more consistent bands on mammalian chromosomes. *Humangenetik* 18:81-83.
- 88.- Wolff, S. (1977). Sister chromatid exchange. *Ann. Rev. Gen.* 11:183.

- 89.- Wyandt, H.E., Wysham, D.G., Minden, S.K., Anderson, R.S. y Hecht, F. (1976). Mechanisms of giemsa banding of chromosomes. I.--Giemsa-11 banding with azure and eosin. Exp. Cell Res. 102:85-94.
- 90.- Xu, X. y Wu, M. (1983). Electron microscopy of G-banded human mitotic chromosomes. Chromosoma 88:237-240.
- 91.- Yanishevsky, R. y Carrano, A.V. (1975). Prematurely condensed chromosomes of dividing and non-dividing cells in aging human cell cultures. Exp. Cell Res. 90:169-174.
- 92.- Yosida, T.H. (1976). Segregation on the No 1 chromosome pair in the black rat (Rattus rattus) maintained in a population room. Proc. Japan Acad. 52:130-133.