

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA



**ESTRUCTURA MOLECULAR DE LOS CROMOSOMAS
HUMANOS; SU CORRELACION CON LAS TECNICAS
DE BANDEO Y SU APLICACION A LA CLINICA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A:

ALICIA BEATRIZ CERVANTES PEREDO

1 9 8 3



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.	El cariotipo humano	3
	1. Antecedentes históricos	3
	2. El cariotipo humano	7
	3. Eucromatina y Heterocromatina	16
III.	Organización molecular y funciones del Genoma	
	Humano	19
	1. Contenido de ADN y Número de genes	19
	2. Secuencias del ADN Humano	20
	3. Patrones de arreglo secuencial	23
	4. Fracciones del genoma humano	25
	5. ADN _s satélite	27
	6. Localización cromosómica de secuencias específicas de ADN	29
	A. Localización de ADN satélite	29
	B. Localización de secuencias moderadamente repetitivas	30
	C. Localización de genes específicos	31
	7. Funciones del genoma	34
	A. Funciones del ADN satélite	34
	B. Papel funcional de los patrones de arreglo secuencial	37
	a) Funciones evolutivas	37
	b) Funciones regulatorias	38
	C. Modelo de la estructura génica eucarionte ..	42
	a) Promotores eucariontes	43
	b) Secuencias líder	43
	c) Exones, intrones y secuencias flanqueadoras	45
	d) Secuencias homólogas en el extremo 3' ..	47
	e) ARNm, "caps" y sitios de unión a ribosomas	47
	f) Colas de poliadenina (poliA)	48
	8. Mapeo de genes en el humano	49
	A. Estudios familiares	50
	B. Estudios utilizando células somáticas híbridas	52
	C. El mapa genético humano	56
IV.	Estructura molecular de los cromosomas humanos ..	71
	1. Componentes de la cromatina	72
	A. Ácido desoxirribonucleico (ADN)	73
	B. Histonas	74
	a) Histonas ricas en lisina	75
	b) Histonas ricas en arginina y ligeramente ricas en lisina	76
	c) Evolución de las histonas	76
	d) Modificación de histonas	77

C. Proteínas no histónicas	79
2. Naturaleza fibrosa de la cromatina	82
3. El nucleosoma. Unidad estructural básica de la cromatina	85
A. Evidencias de la existencia de una estructura periódica en la cromatina	86
a) Estudios de la cristalografía de rayos X	86
b) Digestión con endonucleasas	86
c) Visualización de la partícula	87
B. Estructura del nucleosoma	88
a) Conformación de las histonas	88
b) Conformación del ADN	89
c) Estructura de la partícula central (core)	93
d) El nucleosoma. Participación de H1..	95
C. Relación secuencias de ADN/Nucleosomas (Phasing)	97
D. Interacciones entre Nucleosomas. Estructuras de orden superior	98
4. Cromatina en interfase	102
A. Estructura de la cromatina en interfase (G1 y G2)	102
B. Replicación de la cromatina	104
C. Cromatina en transcripción	106
D. Orden en el núcleo	110
5. Arreglo de la cromatina en los cromosomas..	113
A. Condensación de la fibra de cromatina ..	114
B. Modelos de la estructura cromosómica ...	117
V. Correlación entre los diferentes patrones de bandas y la estructura cromosómica	128
1. Mecanismos de Producción de bandas	129
A. Acción de los colorantes fluorescentes..	129
B. Bandas Q	132
C. Bandas R y Bandas T	137
D. Patrones de replicación del ADN en relación a bandas Q/G y R	141
E. Tinción con Giemsa	144
F. Bandas C	145
G. Bandas G	147
H. Bandas NOR	152
I. Función de las proteínas cromosómicas en la producción de bandas	154
a) Histonas	156
b) No histónicas	159
2. Tipos de cromatina demostrados por los diferentes patrones de bandas	161
3. Relación del bandeo cromosómico con la estructura cromosómica	164

VI. Metodología	172
1. Métodos para producir bandas Q.....	172
2. Métodos para demostrar heterocromatina constitutiva (Bandas C)	175
3. Métodos para bandas G	178
A. Métodos utilizando álcalis (NaOH) y calor	178
B. Métodos con soluciones salinas y mé- todos por variación de pH	181
C. Métodos utilizando digestión enzima- tica	183
D. Otros métodos	189
4. Métodos para producir bandas R y T	186
5. Técnicas para la demostración de organi- zadores nucleolares	188
6. Comparación entre los diferentes méto- dos de bandas y uso de varias técnicas en la misma preparación	192
7. Otros métodos de bandas	195
A. Métodos que involucran el uso de nue- vos colorantes con afinidad por ba- ses específicas (AT ó GC).	195
B. Técnicas por contratinción para in- crementar patrones de bandas	197
C. Métodos dinámicos con BUdR	201
a) Bandas R con BUdR	201
b) Bandas Q con BUdR	202
c) Bandas intermedias	202
d) Bandas H	202
e) Asimetría cromatídica con bandas R	203
f) Asimetría cromatídica sin bandas..	203
g) Asimetría cromatídica con bandas Q	204
h) Asimetría cromatídica y bandas R de las dos cromátidas	204
8. Métodos de bandeado de alta resolución ...	205
9. Metodología empleada en el laboratorio de citogenética del servicio de Genéti- ca del Hospital General de México S.S.A.	212
A. Sexocromatina (cromatina X) en célu- las de descamación de la mucosa - - oral	213
B. Métodos para obtener preparaciones - cromosómicas	214
a) Cariotipo en linfocitos de sangre periférica	214
b) Cariotipo en Médula ósea	215
c) Meiosis masculina en biopsia de testículo	216

C. Métodos de bandeo.....	217
a) Bandas G	217
b) Bandas C	218
VII. Aplicaciones clínicas	219
1. Síndromes secundarios a anomalías cromosómicas	222
2. Implicaciones de los polimorfismos cromosómicos en la genética clínica	233
3. Aberraciones cromosómicas en enfermedades con patrones de herencia Mendeliana	244
4. Citogenética y cáncer	248
5. Utilización de tecnología de ADN recombinante en genética clínica	259
6. Estadística del Servicio de Genética del Hospital General de México S.S.A. - -- (1980-1982)	264
VIII. Discusión y conclusiones	287
IX. Bibliografía	293

I. INTRODUCCION

El estudio de los cromosomas humanos ha inquietado a los científicos desde que la existencia de estas pequeñas estructuras fue descubierta. Desde el punto de vista molecular, el conocimiento de la existencia de secuencias de ADN repetitivas y de copia única ha permitido estudiar extensivamente los patrones de arreglo secuencial dentro del genoma, así como su potencial de transcripción y su significado funcional. La estructura de la cromatina y la de los cromosomas se ha investigado en base a nuevas técnicas de microscopía electrónica, cromosomas de condensación prematura e hibridación in situ, que junto con metodología bioquímica han permitido establecer nuevos modelos de la estructura cromosómica, incluyendo la existencia de una unidad repetitiva básica: el nucleosoma. Además, mediante el uso de diferentes colorantes y tratamientos, los cromosomas mitóticos pueden ahora visualizarse con patrones de bandas característicos, lo que facilita su identificación individual y pone de manifiesto estructuras diferentes con funciones probablemente diferentes. Por otra parte, el mapeo genético humano se ha acelerado gracias a los métodos bioquímicos, al uso de células híbridas roedor-humano, a los nuevos métodos de bandeado de alta resolución y al uso de tecnología de ADN recombinante (ingeniería genética) y polimorfismos de sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, lo que ha permitido la localización regional de un gran número de genes.

Desde el punto de vista médico, el conocimiento de la organización molecular y funciones del genoma humano permitirá un mejor entendimiento de las enfermedades genéticas, facilitará su diagnóstico y en un futuro, el uso de la ingeniería genética permitirá la corrección de los defectos a nivel de ADN.

Esta tesis es una revisión de los adelantos mas recientes en el conocimiento de la estructura y función del genoma humano, tratando de establecer una relación con la genética clínica, principalmente en lo que se refiere a la comprensión de las enfermedades genéticas y su diagnóstico, incluyendo un compendio de las nuevas técnicas de bandeado cromosómico. Además se presentan las estadísticas de tres años de trabajo en el Servicio de Genética del Hospital General de México S.S.A. (1980-1982); en donde la citogenética es de suma importancia para establecer un diagnóstico y proceder al consejo genético adecuado. Es propósito de esta tesis que todos aquellos interesados en el conocimiento del genoma humano encuentren algo de valor en ella.

II. EL CARIOTIPO HUMANO

I. ANTECEDENTES HISTORICOS

El desarrollo de la Citogenética fue una consecuencia de la evolución de las técnicas microscópicas. Las células fueron identificadas en 1665 por Robert Hooke y pasaron casi dos siglos para que fueran aceptadas como unidades estructurales de los tejidos animales, gracias a la descripción histológica de J.J. Lister (1827) usando un microscopio compuesto acromático con resolución de $1\mu m$. La evolución posterior de las técnicas microscópicas dependió en gran parte del desarrollo de métodos de fijación, corte y tinción adecuados, resolviéndose esto durante la primera mitad del siglo XIX. En 1858 Virchow describió el proceso de la división celular, mostrando que las células siempre provienen de otras células, quedando establecido el principio de la continuidad genética. En 1874, el científico húngaro von Török observó los diferentes estadios de la división celular; sin embargo, los primeros estudios detallados de las cromosomas humanos fueron realizados por el anatomista alemán Arnold en 1879. El término "cromatina" fue utilizado para definir la porción teñible del núcleo por Flemming, en 1882, al estudiar células en "mitosis" de la córnea humana, describiendo la transformación del material nuclear en haces longitudinales. El término "cromosoma" fue introducido en 1888 por Waldeyer. Al mismo tiempo (1887) Weisman predijo la división reduccional en la gametogénesis, siendo observada por Boveri y llamada posteriormente meiosis (1,2,3).

A fines del siglo XIX los elementos citológicos y los -

mecanismos responsables de la continuidad genética habían sido identificados, pero su papel en la herencia no fue apreciado sino hasta que el trabajo de G. Mendel (1865) fue redescubierto por Correns, de Vries y en otros en 1900, permitiendo relacionar la transmisión regular de los cromosomas y la herencia de caracteres biológicos, lo cual llevó a la formulación de la Teoría Cromosómica de la Herencia, la Hipótesis de Sutton-Boveri(1903), con la cual resurge la Citogenética a principios del siglo XX (1,2,3).

Evidencias que apoyan la Teoría Cromosómica se acumularon durante los siguientes 30 años. Contribuciones importantes fueron: la correlación de los cromosomas sexuales con la determinación del sexo; la demostración de que cromosomas específicos llevan genes específicos y la observación del arreglo lineal de los genes en los cromosomas. En 1909, Janssens interpretó los quiasmas observados durante la meiosis como la evidencia citológica de la recombinación y, en 1931 Creighton y Mc Clintock demostraron que el intercambio de regiones homólogas identificables estaba acompañado de un intercambio de genes asignados a esas regiones (2,4,5).

Los primeros estudios de Citogenética se hicieron casi exclusivamente en plantas y animales invertebrados; los conceptos básicos fueron derivados de los estudios clásicos de los años 30 en la mosca de la fruta Drosophila melanogaster y en la planta india de maíz, Zea mays (1,2,6,7). Durante este período, el trabajo en organismos superiores estaba estancado por las dificultades técnicas que involucraba.

A partir de que los cromosomas fueron reconocidos como estructuras bien definidas, se iniciaron trabajos para determinar el número cromosómico en el hombre. Aparentemente, Hansemann (1891) fue el primero que lo intentó, sin embargo

el primer dato significativo fue el de von Winiwarter en 1912 al contar 47 cromosomas en una metafase de espermatogonia y 23 pares en un espermatocito, concluyendo que el número cromosómico era 48 en la mujer y 47 en el hombre y que el mecanismo determinante del sexo era la presencia de uno o dos cromosomas X. En 1917 Wieman reporta la presencia de cromosomas X y Y en el humano y un año después Evans describe 48 cromosomas en células somáticas (2,3). El siguiente estudio relevante fue realizado por Painter (1921,1923) quien trabajando con material testicular reconoció el cromosoma Y, y dedujo correctamente el mecanismo determinante del sexo masculino; el número de cromosomas en mitosis de espermatogonias indicaban que estaba entre 45 y 48. En su primer artículo - Painter favorece el número diploide de 46, pero dos años más tarde se decide en favor de 48 para ambos sexos (8,9). A pesar de que von Winiwarter mantenía la opinión de que no existía el cromosoma Y, su presencia fue confirmada por Koller - en 1937 estudiando el comportamiento de los cromosomas sexuales durante la meiosis (3,10).

Los trabajos siguientes se continuaron realizando principalmente con material testicular, los cuales apoyaban casi siempre las conclusiones de Painter. Los estudios en mitosis de células somáticas eran poco satisfactorios por las dificultades técnicas y la mala calidad que presentaban, conduciendo a un período estático, hasta que en 1956 Tjio y Levan, estudiando mitosis de células somáticas (fibroblastos de embrión) reportaron un número diploide de 46 cromosomas, la calidad de sus preparaciones era muy superior a todo lo que se había hecho anteriormente debido a los adelantos técnicos a los que se había llegado (11). Su trabajo fue confirmado rápidamente por C. E. Ford y Hamerton (1956) en preparaciones de túbulos seminíferos (12) y posteriormente en otros tejidos por otros investigadores, quedando bien establecido que el número cromosómico en el humano es 46, con un complemento

cromosómico femenino 46, XX y masculino 46, XY.

Entre los adelantos técnicos que hicieron posible el avance de la citogenética humana sobresalen:

- a) El uso de Colchicina, una sustancia extraída del azafrán (Autumn crocus), la cual tradicionalmente se ha empleado en el tratamiento de la gota. Esta droga tiene el efecto específico de detener las células en mitosis durante la metafase, al inhibir la formación de las fibras del huso acromático. De esta manera se acumulan metafases en el cultivo y hay una mayor contracción de los cromosomas, lo cual facilita su visualización (2,3).
- b) El pretratamiento de las células mitóticas con una solución hipotónica, lo que produce distensión celular y permite la separación individual de los cromosomas (2,3).
- c) El uso de las técnicas de "squash", derivadas de las técnicas para células vegetales, las cuales son dependientes del uso de fijadores fuertes como el ácido acético o las combinaciones acético-etanol y acético-metanol, lo que llevó a las preparaciones de secado al aire (2,3).

Los trabajos de Tjio y Levan y los de Ford y Hamerton no sólo demostraron el número correcto de cromosomas, sino que además iniciaron el desarrollo de técnicas para obtener preparaciones cromosómicas de alta calidad. Otro hecho de suma importancia es el descubrimiento de Nowell (1960) de que la fitohemaglutinina, obtenida del frijol rojo Phaseolus vulgaris preparada como mucoproteína o proteína, tiene efecto mitogénico en linfocitos in vitro (13), lo cual permitió el desarrollo de métodos más rápidos (72 h) y sencillos para obtener cromosomas humanos, siendo relevante la microtécnica

de Moorhead y colaboradores (1960) (14).

En los últimos años la citogenética ha avanzado considerablemente, permitiendo la identificación individual de los cromosomas, primeramente por métodos autorradiográficos (15) y posteriormente mediante el uso de diferentes técnicas que producen patrones específicos de bandas a lo largo de los cromosomas, siendo iniciados por Casperson y cols (1970), mediante el uso de colorantes fluorescentes (16,17). Actualmente la citogenética ha llegado al nivel molecular, quedando aún mucho por entender y descubrir.

2. EL CARIOTIPO HUMANO

Los cromosomas son estructuras que se tiñen intensamente con colorantes básicos y son visibles en células en mitosis y meiosis.

Los cromosomas mitóticos humanos cuando están duplicados tienen una forma similar a una X. Las cromátidas hermanas se mantienen unidas en una región de constricción llamada centrómero o constricción primaria, la cual es el sitio de unión a las fibras del huso. La posición del centrómero es variable; si se encuentra en la parte media del cromosoma, los cromosomas son metacéntricos; si se encuentra desplazado hacia un extremo (dando brazos de diferente tamaño), produce cromosomas submetacéntricos; si está cerca del extremo final, serán acrocéntricos y si es terminal telocéntricos (Figura 1). En el humano existen normalmente cromosomas de los tres primeros tipos, no existiendo telocéntricos, los cuales se observan en otros animales, como por ejemplo el ratón (1,18).

Una constricción secundaria puede ser observada en cualquiera de los cromosomas, pero generalmente se encuentran en sitios específicos. El tipo de constricción secundaria más común es la que producen los satélites citológicos y los encontramos en los cromosomas acrocéntricos humanos.

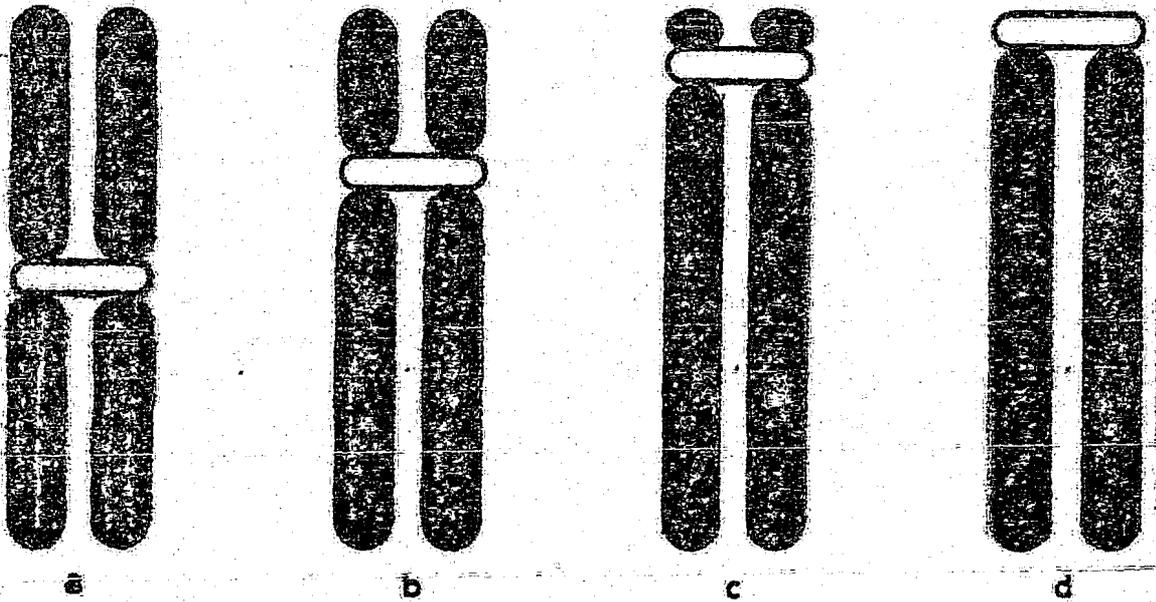


Figura 1. Tipos de cromosomas por posición del centrómero: (a) Metacéntrico, (b) submetacéntrico, (c) acrocéntrico y (d) telocéntrico (1)

El término "cariotipo" se refiere al arreglo sistemático del complemento cromosómico de una célula (Figura 2 A y B). Si el cariotipo es representado en forma diagramática o matemática se obtiene un "idiograma" (Figura 3).

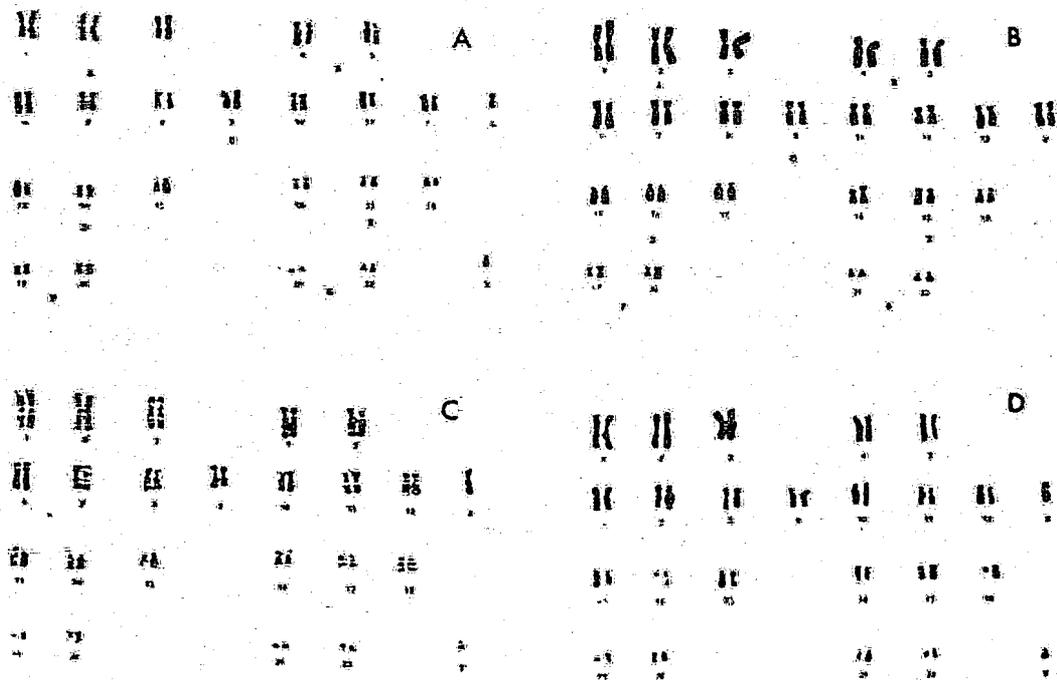


Figura 2 .- El cariotipo humano normal. A .-Cariotipo masculino técnica habitual. B .- Cariotipo femenino técnica habitual. C .- Cariotipo masculino técnica bandas G . D .- Cariotipo femenino técnica bandas G.

La clasificación básica de los cromosomas humanos en metafase fue derivada de conferencias en Denver (Denver Report, 1960), Londres (London Report, 1963) y Chicago (Chicago Conference, 1966). Se acordó numerar los autosomas en pares del 1 al 22 de acuerdo al tamaño decreciente y posición del centrómero principalmente. Los cromosomas sexuales fueron designados X y Y y se arreglan separadamente cuando es posible o en la vecindad de los grupos de autosomas que son similares en tamaño y morfología. Los 22 pares de autosomas se dividen en 7 grupos (A - G) los cuales son fácilmente distinguibles con tinciones comunes (18,19,20).

Tres parámetros son importantes para la caracterización morfológica básica de un cromosoma: (a) tamaño relativo, (b) índice de brazo cromosómico definido como la relación del brazo más largo (designado con la letra q) al brazo más corto (p), (c) índice centromérico definido como la relación del brazo más corto al largo total del cromosoma, el cual determina la posición relativa del centrómero. Además los cromosomas pueden ser caracterizados por otros métodos de estudio, tales como autorradiografía, tinciones o medidas especiales. Una característica morfológica importante son las constricciones secundarias y en los cromosomas acrocéntricos los satélites (19,20).

EL CARIOTIPO HUMANO consiste de los siguientes grupos:

Grupo A. - Cromosomas 1-3: cromosomas grandes metacéntricos y submetacéntricos, claramente distinguibles entre sí. El cromosoma 1 es el cromosoma metacéntrico de mayor tamaño del cariotipo. Una constricción secundaria está presente frecuentemente cerca del centrómero en la parte proximal del brazo q y puede producir variaciones en su longitud. El cromosoma 2 es el cromosoma submetacéntrico más largo. El cromosoma 3 es el segundo cromosoma metacéntrico en tamaño y es aproxima

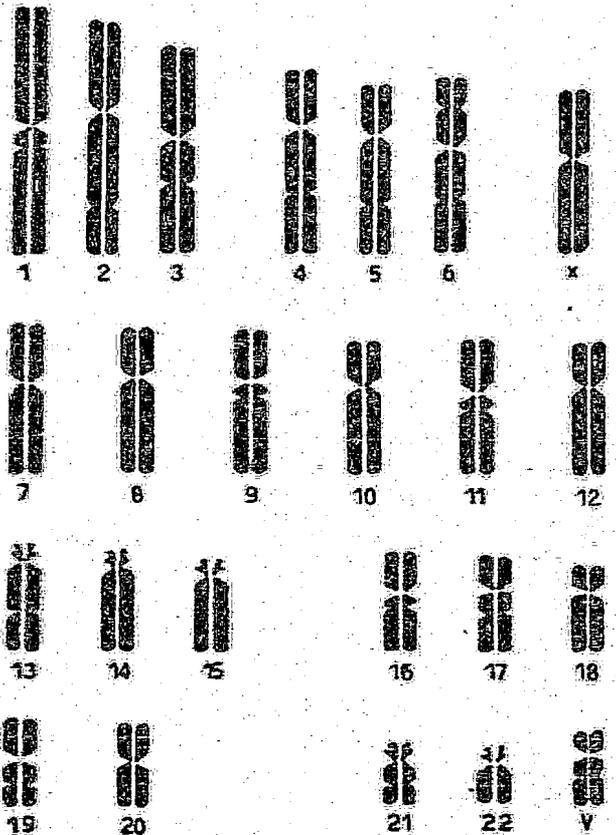


Figura 3. El idiograma humano normal: una representación diagramática del cariotipo humano incorporando las 22 constricciones secundarias más frecuentes.

damente 20% más corto que el 1. Sus índices de brazo y centromérico ayudan a distinguir el brazo largo del corto.

Grupo B. - Cromosomas 4-5: cromosomas submetacéntricos grandes difíciles de distinguir entre sí, sin embargo el 4 es ligeramente más largo.

Grupo C. - Cromosomas 6-12 y X: cromosomas de tamaño mediano, submetacéntricos, los cuales no pueden distinguirse entre sí claramente. De acuerdo con la Convención de Londres, los pares 6, 7, 8, 11 y el X son relativamente submetacéntricos, lo cual sirve para aparear probables homólogos. El cromosoma

6 es el más largo del grupo, aunque no mucho más que el 7 y el X. Frecuentemente se encuentra una constricción secundaria en la parte proximal de los brazos largos del 9.

Grupo D. - Cromosomas 13 - 15: cromosomas de tamaño mediano, acrocéntricos con satélites en los brazos cortos. Difieren poco en tamaño, lo cual dificulta su identificación individual.

Grupo E. - Cromosomas 16 - 18: cromosomas relativamente pequeños, metacéntricos y submetacéntricos. El cromosoma 16 puede distinguirse de los otros, pues es metacéntrico o ligeramente submetacéntrico; tiene una considerable variación individual en tamaño debido a una constricción secundaria en la parte proximal del brazo largo. Los cromosomas 17 y 18 pueden distinguirse en buenas preparaciones por su largo y posición del centrómero. El 18 es 5 - 10% más corto que el 17.

Grupo F. - Cromosomas 19 - 20: cromosomas metacéntricos más pequeños no distinguibles uno de otro.

Grupo G. - Cromosomas 21 - 22 y Y: cromosomas acrocéntricos pequeños con satélites al final de los brazos cortos. El de menor tamaño es el designado con el número 21. El cromosoma Y es similar a estos cromosomas pero no tiene satélites, generalmente es un poco mayor, tiene frecuentemente una constricción secundaria en sus brazos largos, los cuales típicamente divergen menos que los de los otros cromosomas.

La identificación específica de cada uno de los cromosomas fue posible en 1970 cuando Casperson y cols. (16,17) demostraron que los cromosomas teñidos con colorantes de quinacrina producen patrones característicos y reproducibles de bandas haciendo posible la identificación de cada cromosoma en el cariotipo humano. A partir de entonces numerosas técnicas

que producen patrones de bandas en cromosomas en metafase han sido reportadas.

A los métodos publicados para demostrar bandas a lo largo de los cromosomas utilizando mostaza de quinacrina o dihidrocloruro de quinacrina para producir un patrón fluorescente, se les llamó métodos de tinción Q y a las bandas resultantes bandas Q. Otras técnicas que demuestran bandas idénticas usan Giemsa para teñir a los cromosomas dando lugar a bandas G (Fig. 2 C). Sin embargo, algunas técnicas de Giemsa, dan patrones opuestos en intensidad de tinción, se les llama métodos reversos o bandas R. También con colorantes fluorescentes pueden obtenerse bandas R (18,19,20).

Las técnicas de bandeo se dividen en dos grupos principales: (a) aquéllas que dan bandas distribuidas a lo largo del cromosoma, tales como las bandas Q, G y R, incluyendo las que demuestran patrones de síntesis de ADN y (b) aquéllas -- que tienen un número restringido de bandas o estructuras específicas que incluyen los métodos que revelan las bandas centroméricas constituidas por heterocromatina constitutiva -- (Bandas C), bandas teloméricas (Bandas T) y regiones de organización nucleolar (Bandas NOR) (20).

Los patrones obtenidos con los diversos métodos de bandas C no permiten la identificación de cada cromosoma, pero pueden usarse para identificar cromosomas específicos como el 1, 9 y 16 por sus regiones heterocromáticas, así como la porción distal de los brazos largos del Y. (Figura 20).

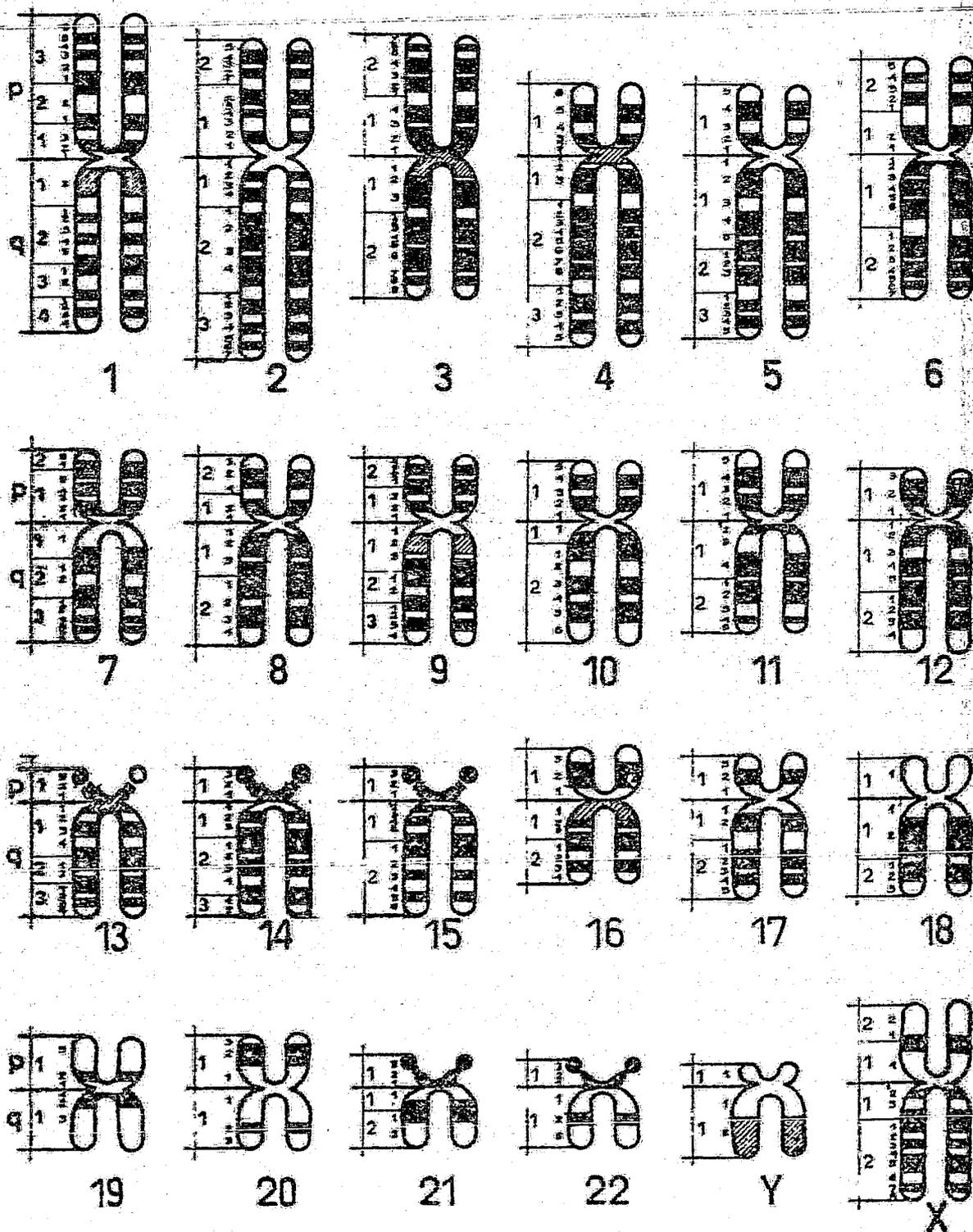
Dados los adelantos en la citogenética humana fueron necesarios nuevos acuerdos con respecto a la nomenclatura y clasificación a emplear; estos ocurrieron en París (1971, -- 1975) y en Estocolmo (1977) (19).

Una banda es definida como aquella parte de un cromosoma que es claramente distinguible de su segmento adyacente --

por apariencia más oscura o más clara con una o más técnicas de bandeado. Hay bandas que tienen claras con un método y oscuras con otros. Los cromosomas son visualizados como formados de una serie continua de bandas claras y oscuras, y por lo tanto, por definición, no existen "interbandas".

La clasificación inicial de los cromosomas de acuerdo a los patrones de bandas (Q y G) está basada en los patrones de bandas Q como los dieron Casperson y cols. (1971); quienes se basaron en el tamaño e índice centromérico usados para los cromosomas no bandeados, tratando de asignar a cada cromosoma el número correspondiente, cuando fuera posible, al asignado anteriormente. Después de considerar sus características morfológicas, se tomaron en cuenta patrones de replicación y medidas especiales. Por razones históricas, el cromosoma que es trisómico en el Síndrome de Down continuó designándose 21 a pesar de que el 22 es ligeramente más largo (21). En la figura 4 se muestra la representación diagramática de los patrones de bandas Q, G y R de acuerdo a la conferencia de París (1971) (19).

Algunos cromosomas pueden presentar formas variantes en la población normal. Estas variantes o polimorfismos están usualmente representadas por un tamaño diferente o intensidad de tinción de una banda específica.



Bandas Q y G Negativas o Tinción pálida
 Bandas R Positivas

Bandas Q y G Positivas
 Bandas R Negativas

Bandas Variables

Figura 4 .- Identificación de las bandas cromosómicas del cariotipo de acuerdo con el sistema de la conferencia de París (1971) (19).

3. EUCROMATINA Y HETEROCROMATINA

En varios estadios de la mitosis y meiosis, particularmente en interfase y profase, ciertos cromosomas o segmentos de cromosomas se tiñen más intensamente que otros debido a que están relativamente más contraídos. Este fenómeno de condensación diferencial es referido como heteropicnosis y el término fue introducido en 1904 por Montgomery al observar que los cromosomas X de una línea celular germinal de ciertos insectos se condensan prematuramente y se presentan densamente teñidos. A estos cromosomas les llamó heterocromosomas, mientras que a los cromosomas normalmente teñidos los llamó euromosomas (2,22)

Heitz (1928) definió la heterocromatina como cromosomas o segmentos cromosómicos que se encuentran condensados en interfase, exhiben una sorprendente heteropicnosis en profase y no se desenrollan en telofase como el resto del material cromosómico (euromatina) (23).

La heterocromatina así definida es probablemente derivada de la euromatina por el paso posterior a un estado permanente o semipermanente de condensación (Coleman, 1943). Los estudios de microscopía electrónica indican que no hay diferencia en la estructura básica de la cromatina en las regiones eu y heterocromáticas, cualquier diferencia en apariencia es debido a la gran condensación del material en las áreas heterocromáticas (2).

En los años siguientes se acumularon trabajos sobre heterocromatina, sin embargo no es sino hasta 1966 en que Brown definió los diferentes tipos de heterocromatina, cuando se unificaron los criterios y se sentaron las bases para estudios posteriores (24).

La heterocromatina se divide en facultativa y constitutiva. Tradicionalmente se ha considerado a ambos tipos como genéticamente inertes e inactivos en síntesis de ARN y por estudios de autorradiografía, de replicación tardía en inter fase, en comparación con la eucromatina (1).

La heterocromatina facultativa es la que resulta de la inactivación de uno de los cromosomas X en los individuos fe meninos. Los trabajos de Ohno (1959) y Lyon (1961), así como sus trabajos subsecuentes (25,26,27), han dado las bases para el entendimiento de este tipo de cromatina la cual comprende el 2.5% del genoma femenino normal y adquiere una for ma condensada en la embriogénesis temprana, es metabólicamente inactiva y provee un mecanismo efectivo para igualar la cantidad de ADN activo entre ambos sexos (23).

La heterocromatina constitutiva es la que está presente en regiones cromosómicas homólogas y muestra diferentes grados de heteropicnosis. Gall y Pardue (1970) (28) con sus experimentos de hibridación ADN/ARN in situ demostraron que existe en todos los genomas de mamíferos. Arrighi y Hsu (29) aplicando estos métodos al genoma humano pusieron de mani fiesto sus regiones heterocromáticas. En los mamíferos están preferencialmente localizadas alrededor de los centrómeros y de los organizadores nucleolares.

Los patrones de heterocromatina constitutiva en el ca riotipo humano se ponen de manifiesto mediante las técnicas para producir bandas C. (Figura 2 D). Todos los cromosomas en metafase contienen heterocromatina constitutiva en cantidades variables en el área centromérica. Grandes porciones se encuentran en los cromosomas 1, 9 y 16 en los cuales ésta se extiende de la región centromérica a los brazos largos. La porción de mayor variabilidad en tamaño se encuentra en los brazos largos del cromosoma Y (porción distal) a pesar -

de que en el centrómero hay muy poca cantidad.

Yunis y Yasmineh (1969) (22,23) iniciaron la elucidación molecular de la heterocromatina constitutiva demostrando que contenía ADN altamente repetitivo y lo llamaron ADN "satélite" por separarse del resto del ADN en gradientes de centrifugación. En el capítulo siguiente se ahondará sobre la composición molecular de la heterocromatina y sus posibles funciones dentro de la organización y expresión del genoma.

III. ORGANIZACION MOLECULAR Y FUNCIONES DEL GENOMA HUMANO.

1. CONTENIDO DE ADN Y NUMERO DE GENES

Uno de los obstáculos principales para el estudio de los genomas eucariontes lo constituye la gran cantidad de material genético en sus células. El genoma de un procarionte - (E.coli) contiene únicamente 3.2×10^6 pares de bases, que - codifican para aproximadamente 3,000 genes; en cambio en genoma humano contiene 2.7×10^9 pares de nucleótidos, por lo que es posible suponer que contiene ADN suficiente para unos 3 millones de genes, aún cuando no se requiera tal cantidad (30).

Podría considerarse que el contenido de ADN en un organismo es proporcional a su complejidad, sin embargo, hay una gran diversidad en cuanto al contenido de ADN en eucariontes superiores y por ejemplo la mayoría de los anfibios tienen más ADN que aves y mamíferos, incluyendo al hombre (31).

Por otra parte, es posible considerar que la cantidad mínima de ADN para una rama filogenética dada, codifique, en su totalidad, para genes informacionales y el aumento en el tamaño del genoma podría originarse por la adición de secuencias que cumplan con otras funciones o duplicaciones de las ya existentes (31).

Experimentalmente, resulta difícil calcular cuantos genes contiene el genoma de un eucarionte, para ello es necesario utilizar métodos indirectos como son: la medición de sus productos (ARNs y proteínas) y/o por rangos de mutación.

La medición del número de genes por medio de sus productos, se hace principalmente identificando ARNs mensajeros -- (ARNm) y para tener una idea real de su cantidad es necesario efectuarlo en todos los tipos de células y en todas las etapas del desarrollo de un organismo. En base a estos estudios se sabe que únicamente de 1 - 2 % del genoma eucarionte representa genes informacionales (30,32,33). Sin embargo, estudios recientes con ARNs heteronucleares (ARNHn) indican -- que aproximadamente 30 - 40% del ADN es transcrito, pero sólo una pequeña porción de éste es traducido (ARNm) (34-36).

2. SECUENCIAS DEL ADN HUMANO

El primer paso para tratar de explicar la gran cantidad de material genético en eucariotes fue la demostración de la presencia de secuencias repetitivas de nucleótidos de su ADN por Britten y Kohne (1968) en varios organismos (38).

El hallazgo de estas secuencias se realizó por estudios de denaturalización-renaturalización. La fracción de ADN detectada como repetitiva depende en gran medida de las condiciones en que se realice el estudio. El ADN repetitivo es cinéticamente definido como la fracción de ADN que reasocia bajo condiciones de concentración de catión monovalente y tiempo, sin permitir ninguna reasociación de secuencias no repetitivas. Bajo condiciones estrictas, las cuales requieren un apareamiento casi perfecto para que los "duplex" sean estabilizados, sólo secuencias de marcada repetición se reasocian. En ocasiones, otras secuencias son clasificadas como repetitivas o viceversa. Esto significa que la definición cinética de una secuencia repetitiva es empírica porque el -

grado de exactitud de las repeticiones en los diferentes ADNs con secuencias repetitivas es variable y las condiciones pueden ser tales que pocas secuencias aparezcan como repetitivas (39).

El análisis del ADN genómico es usualmente conducido bajo condiciones de concentración de sal y temperatura que llevan a la reasociación de casi todo el ADN, y cuya medida es una función del producto de la concentración inicial de ADN en moles por litro y el tiempo de incubación en segundos (Análisis Cot) (38).

La frecuencia de repetición de una familia específica de secuencias de nucleótidos determina su rango de reasociación. Secuencias de nucleótidos de repetición relativamente alta reasociación rápidamente (valores Cot muy bajos), mientras que las secuencias no repetitivas o de copia única lo hacen lentamente (valores Cot elevados) (31).

Los experimentos de renaturalización realizados con un gran número de ADNs animales y vegetales, han mostrado proporciones relativamente constantes de secuencias repetitivas y únicas (38,40,41). En mamíferos, por ejemplo, las secuencias repetitivas constituyen de 30-40% del genoma, mientras que el restante 60 - 70% corresponde a secuencias únicas (30).

Estudios de renaturalización en el genoma humano muestran que las cantidades relativas de secuencias repetitivas y únicas son las mismas que para otros animales, reportándose 35% de secuencias repetitivas y 65% de secuencias únicas (36,42).

A pesar de que las secuencias repetitivas frecuentemente exhiben un amplio espectro de frecuencias de repetición -

en el genoma, para propósitos descriptivos se consideran como componentes discretos, definidos básicamente en 3 componentes cinéticos: uno de renaturalización muy rápida, otro de renaturalización intermedia y un tercero de renaturalización lenta (41).

El componente del ADN de renaturalización rápida contiene secuencias repetidas un enorme número de veces, en el orden de 10^6 por genoma (ADN satélite). También en este componente pueden encontrarse secuencias de repetición invertida o secuencias palindrómicas; en el humano constituyen 6% (36). Palíndromos cortos sirven como sitios de reconocimiento para muchas endonucleasas de restricción bacterianas, lo que ha facilitado el análisis de la estructura del genoma animal a nivel de secuencias (43).

El ADN que renatura con rango intermedio contiene secuencias repetidas en el orden de $10^1 - 10^5$ veces, pudiendo, en el hombre ser dividido en varias subclases. Las secuencias de este tipo se encuentran extensamente intercaladas con las no repetitivas (36,41).

Los componentes del genoma de renaturalización lenta contienen secuencias que, en general, están presentes sólo una vez por genoma (ADN de copia única). Si consideramos el concepto de que los "genes clásicos" están presentes sólo una vez por genoma, esta porción contendrá los genes informativos, aún cuando debe recordarse que únicamente el 5% de este ADN represente genes informativos (37), lo que implica que la función de una gran cantidad de este ADN se desconoce. Es importante señalar la existencia de un componente de muy baja repetición que renatura con propiedades de copia única, el cual ha sido descrito en el hombre (36).

3. PATRONES DE ARREGLO SECUENCIAL

El arreglo en el genoma de las secuencias repetitivas y no repetitivas ha sido descrito en términos de longitudes — aproximadas y puesto que están cinéticamente definidas terminan cuando limitan con secuencias de diferente grado de repetición. Esto podría significar que una secuencia simple no repetitiva, estuviera funcionalmente subdividida, además las secuencias repetitivas pueden estar en forma aislada o como racimo de repetición.

Se conoce como "interposición" a las secuencias repetitivas y no repetitivas alternadas (34). La interposición de secuencias repetitivas cortas (0.2 - 0.4 kb) con secuencias no repetitivas cortas (<2kb) ha sido encontrada en la mayoría de los genomas (interposición de período corto). También en un gran número de genomas se han detectado porciones de secuencias largas no repetitivas (algunas kilobases) intercaladas con secuencias repetitivas de largo indefinido y finalmente, en algunos organismos se han observado un arreglo secuencial de período largo, en el cual tanto las secuencias repetitivas como las no repetitivas se extienden por algunas kilobases.

El período corto fue estudiado principalmente en *Xenopus* y en el erizo de mar, aunque también en estos organismos se encuentran secuencias largas no repetitivas con repetitivas de largo indefinido, mientras que el período largo corresponde al genoma de *Drosophila* (34,35,44).

En el hombre, Schmid y Deininger (1975) han reportado — un patrón de secuencias repetitivas, no repetitivas y repeticiones invertidas intercaladas en 80% del genoma. Aproxima-

damente 52% consiste en interposición de secuencias de copia única con un promedio de 2 kb de largo con secuencias repetitivas de aproximadamente 0.4 kb. Una segunda porción del genoma está ocupada por un arreglo intercalado de secuencias largas de copia única (≥ 20 kb) con repeticiones de largo indefinido, comparables a los de *Xenopus* y el erizo de mar y que constituyen 20% del ADN (36). se ha propuesto que los períodos largos de repetición generalmente representan racimos de períodos cortos o ADNs satélite. En el hombre, la principal porción de secuencias repetitivas largas se ha demostrado que está formada por secuencias satélite (36).

En el genoma humano se encuentran además 5% de secuencias de repetición invertida, llamado ADN de orden cero, la estructura de los cuales está arreglada de tal manera que una secuencia de bases corta está covalentemente unida a su complemento, permitiendo el apareamiento intracadena de fragmentos de una sola hélice. Estas secuencias se encuentran en grupos de 2 a 4, localizados separadamente, dispersos por todo el genoma, en una forma no al azar, sino adyacentes a secuencias específicas (45). Se ha sugerido que las secuencias invertidas no deben considerarse como una subclase de secuencias repetitivas, ya que se encuentran intercaladas con secuencias repetitivas y de copia única, siendo el arreglo de éstas similar en cualquier parte del genoma (36). Estas secuencias se encuentran en el ARNHn pero no en el ARNm (45).

Existen componentes de repetición intermedia dispersos a lo largo del genoma y también componentes que intercalan secuencias moderada y altamente repetitivas en el genoma humano (46,47,48).

4. FRACCIONES DEL GENOMA HUMANO

Las fracciones del ADN nativo de doble hélice obtenidas por gradientes de densidad de sales de cesio han permitido nuevos aportes al estudio del genoma eucarionte. El uso de esta metodología se inició al encontrarse componentes menores de ADN que diferían en sus densidades de flotación con respecto a la de la masa total de ADN, al centrifugar en un gradiente neutro de CsCl (49). Estos componentes menores fueron llamados ADNs satélite y se observaron en el ratón, cuyo y ternera.

Estas técnicas recibieron un mayor interés a partir de los trabajos de Filipski y cols (1973) que mostraron que el ADN de ternera podía separarse en tres componentes que bandean a densidades discretas en CsCl (1.697, 1.704 y 1.709) y representan 50, 25 y 10% del ADN, respectivamente (50).

La mayor cantidad de información que se puede obtener a partir de equilibrios de sedimentación en gradientes de densidad se logra mediante la combinación de gradientes de $\text{Ag}^+ - \text{Cs}_2\text{SO}_4$ y CsCl. De esta forma el ADN humano puede ser resuelto en 4 componentes principales, 4 componentes menores y 3 satélites (51). En la tabla 1 se muestran sus densidades y porcentajes relativos.

TABLA 1
COMPONENTES DEL ADN (51).

Principales		Menores		Satélites	
ρ	%	ρ	%	ρ	%
1.697	16	1.712	0.7	1.6875	0.15
1.699	49	1.7135	1.5	1.6955	1.2
1.704	18	1.716	1.3	1.6995	0.5
1.709	11	1.78	0.3		

El uso combinado de fraccionamiento por gradientes de densidad y técnicas de renaturalización han permitido una mejor caracterización de las diferentes fracciones del ADN.

Así, sabemos que los ADNs satélite se caracterizan por estar compuestos de pequeñas secuencias de nucleótidos (6 a 30 pb) repetidas varios millones de veces, teniendo valores Cot en mamíferos de 10^{-5} a 10^{-2} y los cuales raramente constituyen más de 10% de genoma (30,51). En relación a los componentes menores del ADN es posible que alguno de ellos corresponda a ADN ribosomal (ADNr) (51).

Yunis y cols. reportaron una técnica de hibridación con gradiente de densidad de CsCl que llevó a la identificación de la disposición de densidades de los componentes nativos del ADN conteniendo secuencias repetitivas. El uso combinado de hibridación en gradientes de CsCl y separación por gradientes de Ag^+ - Cs_2SO_4 ha permitido el fraccionamiento del ADN humano en 7 componentes que bandean a 1.698, 1.700, 1.702, 1.705, 1.708, 1.711 y 1.715 respectivamente en CsCl neutro (30).

En el hombre, utilizando ADN cortado, libre de secuencias invertidas, se han encontrado fracciones que contienen ADN moderada y altamente repetitivo, que sedimenta en 5 grupos en gradientes de CaCl con Cot de 1.0. Tres de estos grupos poseen propiedades semejantes a ADN satélite (6% del genoma), las restantes bandean a 1.703 y 1.714 y constituyen 7 y 9 % del ADN total respectivamente. Cada una consiste de una cuarta parte de secuencias altamente repetitivas y tres cuartas partes de secuencias moderadamente repetitivas que renaturan con Cot $1/2$ de 14 y 7.2 respectivamente (46).

Corneo y cols han aislado dos fracciones de ADN repetitivo renaturando a valores Cot intermedios. Estos componen-

tes han sido llamados ADN de rapidez intermedia (densidad de flotación 1.703) e intermediario lento (1.707) en base a --- sus propiedades cinéticas. El ADN de rapidez intermedia -- tiene una organización compleja, en una parte en fragmentos arracimados de mas de 24 kb, en una fracción semjante a ADN satélite y una parte en fragmentos que van de 1,800 a 600 pb espaciados con secuencias más complejas. El ADN intermedia- rio lento está finamente disperso a lo largo del genoma (48).

5. ADNS SATELITE

En el ADN humano se han reportado ocho grupos de ADNs - satélite, cuatro de ellos designados cronológicamente I, II, III y IV, encontrados por Corneo y cols. (47) y relativamente bien caracterizados y otros cuatro llamados A, B, C y D por Chuang y Saunders y cols. (22,51).

Es importante señalar que no todos los ADNs satélite re portados fueron aislados por procedimientos y muestras simi- lares. En general se utilizaron tres tipos diferentes de -- gradientes: CsCl, $Ag^+ - Cs_2SO_4$ y $Hg^{2+} - Cs_2SO_4$ con ADN total o - previamente fraccionado, preparaciones de nucleolo, fraccio- nes de cromatina, por columnas de cromatografía MAK o frac- ciones Cot.

Básicamente un ADN satélite es caracterizado de acuerdo con su densidad en CsCl neutro: en CsCl alcalino, donde pue- den analizarse cada hélice por separado y en CsCl neutro des pués de denaturalización renaturalización bajo condiciones - definidas.

En la Tabla 2 se muestran las características de los 4

ADNs satélite aislados por Corneo y cols (47).

TABLA 2

CARACTERÍSTICAS DE ADN SATELITE (47).

	ADN Sat I ^b	ADN Sat II	ADN Sat III	ADN Sat
Nativo en CsCl neutro	1.687	1.693	1.696	1.70
Denaturado x calor en lxssc	1.703	1.704	1.715	1.71
Renaturado a Cot 0.1	1.694	1.696	1.703	1.70
Hélices separadas en CsCl alcalino	1.707 1.730	1.740 1.750	1.740 1.754	1.73 1.74
Diferencia de densidad en- tre hélices separadas	0.31	0.010	0.014	0.01
Cantidad relativa (%)	0.50	2.0	1.5	2.0
Posición en Ag ⁺ -Cs ₂ SO ₄	ligero	pesado	ligero	pesado
Elución en columnas MAK	tardía	temprana	tardía	tempra

Los ADNs satélite A, B, C y D no están aún bien defini-
dos, sus características se describen a continuación:

ADN SATELITE A: Tiene una densidad de 1.710 en CsCl neutro,
no muestra separación de hélices en CsCl alcalino con una -
densidad de 1.775 (22,51).

ADN SATELITE B: Se encuentra en el lado ligero del A, como-
una pequeña prominencia al separarse en Ag⁺-Cs₂SO₄, tiene -
una densidad de 1.726 en CsCl: Chuang y Saunders afirman --
que tiene propiedades de ADN con genes y espaciadores ribo-
somales (51).

ADNs SATELITE C y D. El C se observa como una banda satéli

te en el lado ligero de un gradiente de $\text{Ag}^+ - \text{Cs}_2\text{SO}_4$, con una densidad de 1.703 en CsCl neutro. El D tiene una densidad de 1.720 en CsCl neutro y de 1.782 en CsCl alcalino (51).

6. LOCALIZACION CROMOSOMICA DE SECUENCIAS ESPECIFICAS DE - ADN.

Los estudios de la organización molecular del genoma pueden ser extendidos a nivel cromosómico por medio de la hibridación in situ (28). Esta técnica ha sido aplicada para la localización de ADNs alta y medianamente repetitivos, así como para ARN transcrito de ADN de repetitividad intermedia.

La hibridación in situ consiste en una hibridación ADN-ARN (marcado) realizada sobre laminillas con preparaciones cromosómicas en metafase, las cuales se someten a diversos tratamientos para desnaturalizar el ADN, incubándose posteriormente con el ARN marcado para producir los híbridos, los cuales tendrán una localización específica para cada tipo de ARN que se utilice (52).

A. Localización de ADN satélite:

El ADN satélite parece estar concentrado esencialmente en la heterocromatina constitutiva, particularmente en las regiones pericentroméricas y cerca de los organizadores nucleolares.

Se ha detectado ADN satélite en casi todas las regiones heterocromáticas de los cromosomas, a excepción de 5 de ellos los cromosomas 2,6,8,11 y 12; la cantidad de ADN satélite es variable en cada cromosoma y así existen cromosomas como el 1, 9, 13, 14, 15, 20, 21, 22 y el Y que tienen altas concen-

traciones, siendo los dos cromosomas con mayor contenido de ADN satélite el 9 y el Y. Una extraña anomalía la constituye el cromosoma 16, el cual presenta una gran banda de heterocromatina (Banda C) y sólo contiene ADN satélite II en pequeña cantidad (39,53-56).

La localización de los ADNs satélite en cromosomas acrocéntricos se ha establecido en translocaciones familiares entre ellos, encontrándose en brazos cortos, entre el centrómero y los organizadores nucleolares (54,55).

Es importante señalar que la cantidad de ADN satélite muestra un amplio rango de variación en los cromosomas normales de individuo a individuo. Los satélites citológicos son heterogéneos en contenido de ADN satélite, algunos los contienen, mientras que otros no y su contenido no está relacionado con el tamaño o intensidad de su fluorescencia (55).

El ADN satélite I está preferencialmente localizado en la región pericentromérica del cromosoma 9, los brazos cortos de los acrocéntricos y en la parte media distal de los brazos largos del Y. El II se encuentra principalmente en los cromosomas 1,9 y 16, los acrocéntricos, particularmente el 21 y en el Y. El ADN satélite III se encuentra ampliamente distribuido, localizándose en los cromosomas 1,3,5,7,9, 10,13-18,20-22 y Y. El ADN satélite IV tiene grandes bloques en la parte distal de los brazos largos del Y, encontrándose también en los acrocéntricos y en la banda C del 20. (30, 53, 55, 56).

B. Localización de Secuencias moderadamente repetitivas:

La localización in situ de secuencias moderadamente repetitivas ha sido examinada en algunos organismos, tales como *Drosophila*, *Microtus agrestis* y el erizo de mar, encontrándose generalmente en la heterocromatina intercalar. (23,28,30).

En el hombre, ADNs de secuencias moderadamente repetitivas están preferencialmente localizados en las bandas Q de intensa fluorescencia. Algunos cromosomas como el 13 y el 18 tienen bandas G oscuras grandes, así como grandes cantidades de ADN repetitivo (57).

Las secuencias de repetitividad invertida o palindrómicas, que constituyen 3 - 6 % del genoma, están ampliamente distribuidas por todos los cromosomas (58).

Hibridación in situ con transcripción de secuencias de repetitividad intermedia, usando ARN cromosomal humano marcado con I^{125} , indicó que este ARN nuclear de bajo peso molecular tiene una localización preferencial en las regiones teloméricas y heterocromáticas de los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos, así como una hibridación significativa de las bandas Q fluorescentes/G oscuras (30).

C. Localización de genes específicos:

Transcripciones de genes duplicados sucesivamente, tales como los cistrones para los ARN ribosomales (ARNr) y las histonas, se han tratado de localizar por hibridación in situ.

Los cistrones ribosomales 18 y 28 S se encuentran siempre en las regiones de los organizadores nucleolares (NOR) de todos los eucariontes examinados, siendo mapeados por primera vez en los cromosomas humanos, encontrándose en la región satélite organizadora nucleolar de los cromosomas de los grupos D y G (52,59).

De acuerdo con Bross y Krone (1972) el genoma humano tiene 416 cistrones de ADNr por célula haploide o un promedio de

82 por NOR en metafase (60). Recientemente, (Young y cols., 1976) estimaron en únicamente 50, el número de genes ribosomales (61). No todos los cromosomas D y G tienen el mismo número de genes ADNr. Cromosomas con valores altos siempre presentan satélites grandes.

Los cromosomas acrocéntricos frecuentemente se encuentran asociados en metafase, formando rosetas, lo cual se ha interpretado como un remanente de actividad nucleolar y por lo cual se ha interpretado como un remanente de actividad nucleolar y por lo cual se ven comúnmente implicados en translocaciones.

Los organizadores nucleolares tienen heterocromatina espaciando los cistrones ribosomales, la razón para este tipo de estructura se desconoce, pero se ha postulado que puede proteger a estos genes de cambios evolutivos (30,53,55).

En los eucariontes, a diferencia de las bacterias, los genes ribosomales 5 S no se encuentran cercanos a los 18 y 28 S. En el hombre, estos genes, de los cuales se tienen 2000 copias por genoma haploide, están amplia, pero no exclusivamente distribuidos en el extremo distal de los brazos largos del cromosoma 1 (banda 1q43) (62). En interfase los genes 5 S están frecuentemente asociados con el nucleolo (52).

Los genes para las histonas han sido localizados en *Drosophila*, el erizo de mar y otros organismos. En el hombre, se supone se encuentran repetidos de 10 a 20 veces y en un cromosoma del grupo C (52). Recientemente se han asignado al cromosoma 7 (63).

Se han intentado localizar ARNms en el hombre usando cromosomas en metafase con bandas G en cultivos de linfocitos y

ADN complementario a ARNm total (poli A) de células Wil₂, observándose una distribución preferencial de unión a bandas - claras (64).

El desarrollo de técnicas de hibridación in situ con ADN recombinante ha permitido un incremento en el conocimiento de la organización del genoma, permitiendo el mapeo de secuencias específicas, tales como las secuencias repetitivas que se encuentran en el gen de la β globina humana (65) y aún de la secuencia misma del gen (66).

Las técnicas de bandeo cromosómico con quinacrina y Giemsa pusieron de manifiesto diferencias estructurales a lo largo de los cromosomas de mamíferos. Ya que el genoma del hombre y los mamíferos contienen de 30 a 50% de ADN repetitivo, el cual es poco traducido y se encuentra principalmente en las bandas G oscuras, es posible especular que estas bandas están formadas por ADN sin funciones génicas, mientras que las bandas claras contendrán a la mayoría de los genes informacionales (30). En estudios de material de abortos con trisomias parciales y totales principalmente letales se ha asumido por medio de bandas Q que las bandas no fluorescentes - tienen un mayor contenido de genes estructurales (67).

En el genoma humano haploide se observan 320 bandas - - clara/oscuro en metafase con técnica de bandas G, por lo - que cada banda clara oscuro tendría en promedio 200 genes, así asumimos que el hombre tiene aproximadamente 30,000 genes estructurales (37,68).

En contraste, en el caso de los cromosomas politénicos de *Drosophila* se han identificado 5,000 regiones banda. interbanda (cromómeros) y el análisis genético basado en el número total de mutaciones inducibles sugiere que el número de -

genes informacionales es aproximadamente igual al de cromómeros (69).

Para tener una resolución comparable en el hombre se -- han desarrollado técnicas de bandas G en profase, demostrán-- do que las bandas de los cromosomas en metafase resultan de la coalescencia progresiva de numerosas bandas pequeñas descubiertas en las diferentes etapas de la profase, así en la profase tardía se tienen 1,256 bandas, en la temprana aproximadamente 3,000, por lo que se sugiere que en la profase tar-- día cada banda clara podría tener unos 60 genes estructurales esenciales, mientras que las oscuras, que se presentan -- en la misma proporción que las claras, tendrán pocos o nin-- gún gen estructural (68).

7. FUNCIONES DEL GENOMA

La mayoría de los genes estructurales humanos parecen -- estar presentes en sólo una o pocas copias por genoma, aún -- los genes ribosomales, sin embargo, el genoma de sus cromoso-- mas contiene muchas veces la cantidad de ADN que se requiere codifique para proteínas y es obvio que el material extra -- consiste de secuencias de toda clase de frecuencias, que van desde el altamente repetitivo hasta el ADN de copia única, -- así como que el ADN repetitivo y el de copia única están cer-- canamente intercalados. Por esta razón, se han postulado -- múltiples teorías para explicar el exceso de material genéti-- co, principalmente en cuanto se refiere a los diferentes ti-- pos de secuencias repetitivas y a sus patrones de arreglo -- dentro del genoma.

A. Funciones del ADN satélite:

Debido al corto tamaño de la secuencia repetitiva, de bases no usuales, acumulación de sustituciones de bases, diferencias de especie a especie y a la falta de ARN celular que hibridice al ADN satélite, parece improbable que estas secuencias codifiquen para proteínas. Se sugirió que por su localización preferencial en regiones heterocromáticas, pericentroméricas y perinucleolares podían estar involucrados -- en mantener la estructura centromérica y funcionar protegiendo otras regiones vitales del genoma, tales como los cistrones ribosomales 18 y 28 S. Una tendencia a suprimir entrecruzamientos, a influenciar la conservación de genes ligados y a predisponer a fusión cromosómica en la parte de la heterocromatina rica en ADN satélite, también se han postulado (30).

El hecho de que las diferentes especies posean diferentes componentes satélites también sugiere que éstos estén involucrados en procesos de especiación y sirvan como una barrera efectiva contra la fertilización cruzada entre especies no relacionadas (23,30).

Se ha visto que el ADN de más rápida evolución es el ADN satélite (39). Se cree que este tipo de ADN aparece por la relativamente rápida amplificación de pequeños segmentos de polinucleótidos en una región centromérica o nucleolar y se extiende a otros cromosomas mientras están en cercana asociación durante la meiosis (23,39).

La especificidad de especie puede explicarse por la aparición de nuevos ADN satélite, producidos a partir de un segmento de un viejo satélite, el cual una vez alterado se pierde por rupturas cromosómicas y rearrreglos o bien son mantenidos en la heterocromatina o intercalados en el genoma, dando origen a secuencias con diferente grado de repetitividad (31, 39).

Por su naturaleza cambiante, el ADN satélite puede proteger secuencias adyacentes, ya que el alto grado de repetitividad le permite acumular un gran número de mutaciones, sin que se alteren sus supuestas funciones (39). Además, por los estudios realizados en cromosomas con translocaciones robertsonianas, se ha visto que es en el ADN satélite donde ocurren los puntos de ruptura para el rearrreglo cromosómico, con pérdida de secuencias, lo que lleva a postular que su presencia no es indispensable. De este tipo de estudios también fue posible observar que el ADN satélite está implicado en la formación de rosetas por los cromosomas acrocéntricos y que cromosomas con poco o nada de él no participan en tales asociaciones (54,55).

Un hecho importante es que el ADN satélite únicamente constituye 4% del genoma, por lo que la heterocromatina (20%) tendrá además otros componentes, principalmente repeticiones intermedias, por lo que debe considerarse con cuidado las supuestas funciones del ADN satélite dadas por su localización en la heterocromatina (53). Estas secuencias altamente repetitivas no se transcriben, lo cual es aparentemente coincidente en la heterocromatina y también la heterocromatina constitutiva muestra una amplia variación, usualmente sin efectos fenotípicos, entre miembros de especies dadas, al igual que ocurre con los ADNs satélite (70).

Estudios recientes en Drosophila melanogaster demuestran que el ADN satélite no tiene efectos sobre el apareamiento de los cromosomas en meiosis, ni en la estructuración del centrómero, como inicialmente se había postulado (53,70). Es obvio que en las regiones heterocromáticas no existen quiasmas, aunque no se conocen las bases para esta repulsión (70).

Se ha demostrado que la recombinación mitótica ocurre frecuentemente en la heterocromatina, específicamente en re-

giones satélite, de donde se supone proviene su gran variabilidad (70). Para lo anterior se postulan diferentes mecanismos entre los que destaca la duplicación saltatoria, en la cual se tienen rangos de periodicidad del largo del nucleosoma o múltiplos (31,70).

Por otra parte se han encontrado sitios de reconocimiento para endonucleasas dentro de los ADNs satélite, los cuales están a intervalos regulares como lo revela la estructura del nucleosoma (70).

En los cromosomas sexuales de los vertebrados, se han encontrado secuencias de ADN satélite ampliamente conservadas, habiéndoseles implicado en proceso de diferenciación sexual, los cuales están bien documentados en serpientes, pollos, ratón y otros organismos; en el hombre no se tienen datos precisos (71).

B. Papel funcional de los patrones de arreglo secuencial:

a) Funciones evolutivas

Los diferentes patrones de arreglo secuencial parecen tener importancia evolutiva. La correlación entre un pequeño genoma y la falta de períodos cortos de intercalamiento es consistente con la pérdida de ADN en una transición evolutiva de patrones cortos a largos de interposición (41).

Se ha visto que especies que carecen de períodos cortos de intercalamiento contienen pequeñas cantidades de ADN repetitivo, por lo que una posible pérdida de él originó la formación de arreglos largos de copia única. La generación de secuencias repetitivas largas a partir de las cortas, puede explicarse por una concomitante pérdida de espaciadores de copia única (72), lo cual ha sido observado dentro de procesos de especiación (41). Se ha argumentado que ambos tipos de secuencias, de copia única y repetitivas, intercaladas p

drían servir como elementos promotores de rearrreglos del genoma, incluyendo rearrreglos de regiones de control, lo cual es un prerequisite para un cambio evolutivo (73). Además -- los genomas tipificados por arreglo secuencial de período -- largo pueden derivar de genomas organizados en períodos cortos en el curso de especialización, los genomas que mantienen un período corto de interposición, por otra parte, son los que retienen la flexibilidad evolutiva (41).

Dado que el incremento en el tamaño total del genoma -- refleja adiciones periódicas de secuencias repetitivas en -- rangos diferentes en animales y plantas, mientras que el ADN de copia única se acumula por una gradual divergencia evolucionaria de estas repeticiones, una gran parte del ADN repetitivo así como no repetitivo, no tiene ninguna función dependiente de secuencia. Se ha postulado la existencia de ADN secundario o nucleoesquelético, el cual tendrá un papel funcional en la estática nuclear y quizá también codifique para ARN nucleoesquelético (31,41).

b) Funciones regulatorias

Además de su posible función en los eventos de reorganización del genoma, se ha sugerido que las secuencias repetitivas intercaladas juegan un papel importante en la regulación de la replicación (74) y más notablemente en la regulación de la expresión génica (75).

Una diferencia fundamental en la forma básica de organización entre los genomas eucariótico y procariótico es la localización física de los genes estructurales funcionalmente relacionados. En el genoma bacteriano los genes que codifican para proteínas involucradas en una vía metabólica común están generalmente ligados en un "operón", y el transcrito primario es leído como un mensajero policistrónico (76).

En los eucariontes los genes que están funcionalmente - relacionados están físicamente dispersos a través del genoma. Por ejemplo, en el genoma humano, los genes que codifican para las enzimas que catalizan los 6 primeros pasos del metabolismo de la glucosa mapean en 6 cromosomas diferentes (77), por lo que se requiere de un modelo que explique como son regulados genes que están localizados en sitios diferentes del genoma simultáneamente.

Britten y Davidson han propuesto un modelo que coordina la regulación de las secuencias de genes estructurales no contiguos en eucariontes basados en eventos de control a nivel transcripcional y postranscripcional (75).

En analogía con el modelo de regulación de Jacob-Monod (1961) (76) se sugiere que las baterías de genes que son activados simultáneamente comparten secuencias repetitivas homólogas llamadas "receptoras", las cuales servirían como sitios de unión para secuencias específicas de ARN "activadores" difusibles. El ARN activador es transcrito a partir de genes "integradores", los cuales a su vez están controlados por secuencias "sensoras" a las que se unen agentes inductores de actividad específica del genoma tales como las hormonas (75).

Davidson y Britten (1979) postularon que la mayoría de los genes estructurales son transcritos continuamente en rangos similares en cualquier célula y la cantidad de ARNm citoplasmático es controlada postranscripcionalmente (72).

La unidad de transcripción constitutiva básica se asume que contiene al gen estructural y secuencias cortas de control intercaladas. Las regiones del genoma que se transcriben en forma celular específica bajo un estímulo específico no contienen genes estructurales, sino que están formadas - por elementos repetitivos ya sea intercalados con secuencias

únicas "espaciadoras" o en forma de racimo. Sus transcritos son complementarios a los periodos cortos intercalados que están en ambos extremos de los genes estructurales. Se forman "duplex" ARN/ARN los cuales se cree que protegen al mensaje de nucleasas degradativas o promueven el procesamiento del mensajero (72).

Entre los hechos encontrados que apoyan este modelo se encuentran:

- i) Los patrones de arreglo secuencial de "periodo corto" observados en un gran número de organismos, incluyendo al hombre (36-36), así como su prevalencia a través de la evolución.
- ii) Secuencias cortas de repetitividad intermedia están preferentemente localizadas en la vecindad de genes estructurales. La evidencia que apoya este concepto se encontró en el erizo de mar, al demostrarse que 80 - 100% de las moléculas de ARNm presentes en el embrión son transcritos de secuencias únicas adyacentes a secuencias repetitivas intercaladas en el genoma (40). En otros organismos, tales como el ratón se han reportado hallazgos semejantes (78).
- iii) El hecho de que entre 10 y 30% del ADN sea transcrito en varios eucariontes examinados, aún cuando sólo una pequeña parte de éstos representan mensajes (34,40).
- iv) Las secuencias repetitivas son transcritas en forma teji-do específica. Esto fue demostrado por los estudios de Scheller (1978) y Constantini (1978) al estudiar diferentes secuencias repetitivas clonadas del ADN del erizo de mar frente a ARN total de varios estadios de su desarrollo encontrando diferentes cantidades de cada uno de ellos (79,80).

Es importante notar que casi siempre, ambas hélices del ADN nuclear es fuertemente específico; sin embargo parece ser que el ADN de copia única es transcrito en todos los estadios del desarrollo de un organismo (30,32,41).

Existen datos difíciles de reconciliar con el modelo

propuesto algunos de los cuales señalan funciones estructurales en las que intervendrían todo tipo de secuencias, repetitivas y no repetitivas; entre éstos se encuentran:

- i) La existencia de genomas con diferentes patrones de arreglo secuencial, tales como el de *Drosophila*, que carecerían de los elementos reguladores propuestos (44). Sin embargo - según algunos autores estos elementos aún no han sido detectados con los métodos cinéticos empleados (41,72).
- ii) La ausencia de una parte considerable del genoma conteniendo secuencias moderadamente repetitivas sin consecuencias en algunos organismos de la familia *Microtinae* y en el protozoario *Stylnonychia* (30).
- iii) En el moho de agua *Achylya bisexualis*, cuyo genoma tiene una organización en períodos de intercalamiento largo, las secuencias únicas expresadas en los mensajeros (2,000) difieren en número con las secuencias repetitivas intercaladas -- (250) (81).
- iv) La marcada diferencia entre las secuencias cortas moderadamente repetitivas en especies cercanamente relacionadas como los primates. (39). Ya que si éstas tienen funciones regulatorias, se esperaría que fueran conservadas a través de la evolución.
- v) La existencia de secuencias altamente repetitivas (ADN satélite), que constituyen aproximadamente 10% de los genomas, las cuales no son transcritas y por su localización en regiones pericentroméricas y perinucleolares, han sido implicadas en funciones estructurales (23,30).
- vi) La localización cromosómica de las secuencias moderadamente repetitivas en bloques de heterocromatina constitutiva intercalar aparentemente inactiva genéticamente (30,57).

El conocimiento actual de la organización de secuencias del ADN permite únicamente establecer conclusiones indirectas de los mecanismos que conducen a una expresión génica diferencial en las células eucarióticas. La mayoría de los estudios

definen un grupo de secuencias sin definir sus funciones individuales específicas, por lo que aún queda mucho por descubrir dentro de este campo para poder llegar a un conocimiento integral del genoma eucarionte.

C. Modelo de estructura génica eucarionte:

Una explicación para la discrepancia entre la cantidad de ADN transcrito y la cantidad de ARNm, se encuentra en la existencia del ARNHn, que se caracteriza por su rápida síntesis y degradación, su gran peso molecular, composición de bases semejante a ADN y por el hecho de que nunca deja el núcleo. Tienen de 5 a 10 veces la complejidad de los mensajeros y se transcriben de ADN con diferentes grados de repetitividad. Sus secuencias repetitivas se caracterizan por ser resistentes a ciertas ARNasas, lo cual sugiere la formación de regiones de doble hélice intracadena (30,31).

Los ARNHns fueron propuestos como precursores de ARNm. Esto fue confirmado por el hallazgo dentro de éstos de secuencias virales y de genes de hemoglobina e inmunoglobulinas (30,31).

Se supone que los ARNHns contienen una parte informativa. Esta última permite modificaciones postranscripcionales al servir como sitios de interacción de proteínas reguladoras que activan o suprimen su procesamiento a ARNm (82,83).

Otro dato importante para el conocimiento del genoma eucarionte lo constituye el hallazgo de secuencias de intervención, no codificadoras dentro de los genes estructurales, las cuales son removidas para dar origen a los mensajeros activos. Esto sugiere que los genes eucariontícos se encuentran cortados "split genes" (84,85).

Basándose en las características antes mencionadas se han propuesto modelos de la estructura génica en eucariontes. A continuación se describen los elementos que constituirán el modelo típico de la estructura génica en eucariontes y los cuales se muestran en la Figura 5 .

a) Promotores eucariontes. Un promotor es funcionalmente definido como una secuencia de ADN en el extremo 5' de una unidad de transcripción que sirve como punto de reconocimiento de iniciación para la ARN polimerasa. Los promotores no están definidos universalmente. Generalmente los promotores procariontícos constan de 2 sitios específicos de interacción: el sitio de reconocimiento, situado a unos 35 pb del primer codón del mensajero y la caja Pribnow que precede la iniciación del transcrito por aproximadamente 10 nucleótidos (31, 41, 86).

Se esperaría que los promotores de genes eucariontes tuvieran una localización similar a los de procariontes. Sitios de reconocimiento análogos se han encontrado a aproximadamente 30 nucleótidos del inicio del mensajero, los cuales están formados por 6-7 nucleótidos con la secuencia TATAAAA (caja de Hogness) la cual ha sido descrita en los genes de las histonas del erizo de mar, en histonas de otros organismos y en muchos genes más. Sin embargo, su localización no es siempre la misma y a pesar de ser semejante a la caja de Pribnow en procariontes, se requiere aún de la secuencialización de otros genes para conocer su función, que hasta ahora sólo se ha asignado por analogía con el genoma procarionte. (31, 41, 84, 87).

b) Secuencias líder. Las secuencias líder de genes eucarióticos se definen como secuencias no traducidas que codifican para el extremo 5' del ARNm maduro, precediendo el codón de iniciación (41, 84).

Estas secuencias han sido descritas en algunos ARNm virales en eucariontes (88). Los líderes de los ARNm secuenciados varían considerablemente en longitud y en ocasiones contienen pequeñas secuencias palindrómicas. Sin embargo, en algunos ARNms como los de SV40 y de la globina del germen de trigo estas secuencias no son necesarias para la traducción (89,90).

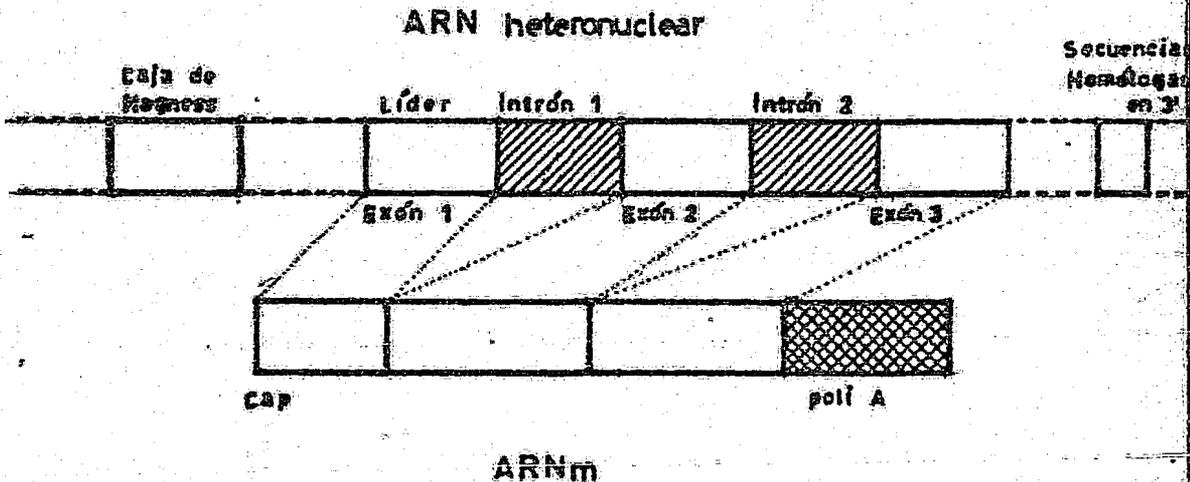


Figura 5. Esquema de un Modelo Génico Eucariote.

El ARNm maduro se genera a partir de un precursor que es colineal con el ADN al que se le agrega pos transcripcionalmente la copia de poli A, metilándose en el extremo 5' y removiéndose las secuencias de intervención (85).

Secuencias líder codificadas en cierta región de genomas virales se han encontrado en mensajeros presentes en otra región del genoma. A este proceso de reunión de secuencias se

le ha llamado empalmado (splicing) (31,85). Este tipo de procesamiento se ha demostrado también en el gen de ovoalbumina (87) y en otros, sugiriendo que se trate de un proceso general ya que las regiones que codifican para proteínas sufren también este tipo de procesamiento.

Independientemente de la función de las secuencias líder en la expresión génica, su procesamiento sugiere que deba ser una característica común de la producción de especies de mensajeros relacionados en las células eucariontes (41).

c) Exones, intrones y secuencias flanqueadoras. Estudios recientes muestran que la mayoría de los genes en eucariontes y en sus virus parecen estar empalmados o cortados (split); es decir que existen fragmentos de ADN que no están presentes en los mensajeros maduros llamados intrones, los cuales interrumpen los exones o partes codificantes de los genes -- (91).

Las bacterias carecen de secuencias de intervención en sus ADNs. En eucariontes su presencia se ha comprobado en genes tan diversos como: los que codifican para ARNr, las globinas, ovoalbúmina, fibroína del gusano de seda, inmunoglobulinas y otros (41, 31, 85, 87, 88).

Debido a que a estas secuencias se les asignó un papel funcional, se asumió que estarían repetidas en varios sitios del genoma. Sin embargo, se demostró que se trata de secuencias únicas pero flanqueadas por secuencias de diferente grado de repetitividad ampliamente distribuidas. Muchos intrones comparten principalmente el dinucleótido GT en el extremo 5' y el dinucleótido AG en el 3' (31,41). Estas similitudes sugieren que el número de enzimas procesadoras debe ser pequeño (84,85).

En los genes de las inmunoglobulinas, la excisión de al menos parte de un intrón, es necesaria para generar el gen de la cadena ligera durante la recombinación somática que tiene lugar en el linfocito diferenciado del ratón (92). El gen resultante se caracteriza por 2 secuencias de intervención y el sitio de reconocimiento para la enzima procesadora es una secuencia palindrómica capaz de formar un asa de estructura invertida (93). Estos datos muestran que eventos de recombinación a nivel de ADN y ARN están implicados en la expresión de los genes de la inmunoglobulinas.

En el ADN ribosomal de *Drosophila* coexisten genes con y sin intrones, dentro de la unidad repetitiva y al parecer sólo se transcriben los genes ininterrumpidos (41). En contraste, los genes de la fibroína de la hormona de crecimiento de rata y las globinas de mamíferos son idénticos tanto en las células que los expresan como en las que no lo hacen. Los intrones son conservados sin importar la fuente celular de ADN (31, 41, 85).

Es posible que los intrones no tengan una misma función dentro del genoma ya que existen los genes eucariontes ininterrumpidos, tales como las secuencias arracimadas que codifican para las histonas en *Drosophila* y en el erizo de mar. Otro hecho que hace dudar de su papel funcional es la pequeña homología que existe entre secuencias de intervención de genes en especies cercanamente relacionadas (genes de la globina en conejo y ratón). Sin embargo, se encontró una alta similitud entre las regiones codificadoras adyacentes a las secuencias de intervención, lo que sugiere que cumplan con un papel funcional (41, 85). Se ha postulado que los exones representan las bases estructurales de las regiones funcionales y que los intrones y el procesamiento han tenido una importante intervención en la evolución del genoma eucarionte (82, 83, 91).

d) Secuencias homólogas en el extremo 3'. Al estudiar el extremo 3' de los genes de histonas del erizo de mar se encontró que aproximadamente 30 pb más allá del codón de terminación existen 2 secuencias altamente conservadas que muestran simetría en parejas. Esto sugiere la formación de estructuras secundarias que sirvan como sitios de reconocimiento para proteínas reguladoras. En otros genes como la globina de pollo, en las α y β globinas de ratón se demostró la conservación de una secuencia flanqueadora que incluye un palíndrome en el extremo 3', lo cual sugiere la regulación coordinada de genes que mapean en cromosomas diferentes (31, 41). Estas secuencias podrían intervenir como señales de reconocimiento para una enzima implicada en síntesis o procesamiento de ARNm ya que las colas de poliadenina son adyacentes a ellas (94).

e) ARNm, "caps" y sitios de unión a ribosomas. El mecanismo de iniciación de la traducción puede o no implicar interacciones entre ARNm y ARNr tales como las observadas en los sistemas procariontícos (95). La complementaridad entre las regiones de iniciación de los ARNms de eucariontes y el ARNr 18 S no siempre es obvia. Se ha propuesto un modelo en el cual la subunidad 40 S del ribosoma interacciona con el extremo 5' del mensajero y se mueve a lo largo de él hasta encontrar el codón de iniciación (AUG) para posteriormente unirse la subunidad 60 S. Este proceso es facilitado por una región llamada "cap" (41, 95).

La mayoría de los ARNms de eucariontes tienen una modificación postranscripcional en su extremo 5', el "cap", que consiste en la metilación de una guanina en la posición 7, unida a través de un enlace pirofosfato 5'-5' a un segundo nucleótido metilado en su posición 2 ($m^7G^{5'} pppXmYm$), también se encuentran adeninas metiladas en la posición 6 en sitios intermedios (31, 95).

Se ha demostrado que el "cap" juega un papel importante en la iniciación de la traducción así por ejemplo, el ARNm de la β globina es de 1,000 a 2,000 veces más efectivo si posee "cap" (41), sin embargo, existen mensajeros que se traducen en forma adecuada aún cuando carecen de "cap" (41,95). Se ha postulado que esa estructura es necesaria cuando el codón AUG se encuentra muy distante del extremo 5' del mensajero y en ciertos sistemas ribosomales que tienen una gran afinidad por secuencias del ARNm (95).

Independientemente de su función dentro de la traducción estas estructuras protegen al mensajero de degradación por - exonucleasas, lo cual permite que sea traducido (95).

f) Colas de poliadenina (poli A). Los ARNms eucarióticos y de sus virus generalmente contienen colas poliadeniladas de 50 - 200 residuos en su extremo 3'. El segmento de poliA es adicionado postranscripcionalmente y puede tener lugar antes o después del procesamiento del mensajero, en el núcleo o en el citoplasma (41,85,95).

Se ha visto que las colas de poliA estabilizan al mensajero, probablemente en interacción con proteínas específicas evitando que el mensajero sea degradado por nucleasas (95). Se ha sugerido que el hexanucleótido que la precede, es el sitio de reconocimiento para la polimerasa encargada de sintetizar esta cola (41).

Por otra parte se ha demostrado que las secuencias no - codificadoras del extremo 3' no intervienen en la traducción (89).

Los ARNms de las histonas carecen de colas poliadeniladas en su extremo 3'. Estas pequeñas moléculas de mensajero se forman durante la fase de síntesis del ciclo celular y -- parecen salir más rápidamente del núcleo que otros mensajeros (31,41,82). Se ha propuesto la existencia de 2 mecanis-

mos para la manufactura y transporte de los ARNms: una vía sin poli A y otra con poli A, siendo al parecer esta última la más común (82,83).

Aún cuando la definición de diferentes elementos de la unidad genética eucarionte ha permitido ampliar nuestros conocimientos acerca de las diferentes funciones que cumplen dentro del genoma, todavía se requiere la integración de estudios prácticos y teóricos para tener un modelo básico de la estructura génica así como de la forma en que funciona.

8. MAPEO DE GENES EN EL HUMANO

El análisis genético convencional en el hombre ha encontrado múltiples obstáculos, tales como familias pequeñas, — tiempos de generación muy largos y carencia de marcadores — cromosómicos o fenotípicos. El mapeo de genes se había basado únicamente en la determinación de herencia autosómica y ligada al cromosoma X de los genes para síndromes heredados y antígenos de grupos sanguíneos.

Los avances de la Citogenética, tales como técnicas de cultivo e identificación de cromosomas; las baterías de marcadores fenotípicos incluyendo isoenzimas y otros polimorfismos proteícos detectables por electroforesis; y el conocimiento de las bases bioquímicas de muchas de las enfermedades genéticas, han permitido un avance en el mapeo de genes humanos. Estas observaciones se realizaron por medio de estudios familiares y por cultivos de células somáticas híbridas roedor-humano.

A partir de los sistemas de células híbridas se han de-

sarrollado nuevos métodos que incluyen: análisis Cot de células híbridas, mapeo cuantitativo usando células humanas irradiadas, transferencia de genes y cromosomas: y análisis de teratomas de ovario. Otro método potencial lo constituye la hibridación in situ, principalmente cuando se combina con técnicas de ADN recombinante (Ver localización cromosómica de secuencias específicas en este mismo capítulo).

A. Estudios familiares (96,97)

Los estudios familiares permiten determinar si el gen para un fenotipo dado debe asignarse a un cromosoma X o a un autosoma no identificado, basándose en que los genes ligados al X no se transmiten de individuos masculinos a individuos masculinos. La primera asignación de un gen al cromosoma X, el de la ceguera al color, fue hecha en 1911, mientras que la primera asignación a un autosoma se estableció hasta 1968.

Los estudios de familias con patrones de polimorfismos en diferentes loci permite la determinación de distancias intergénicas como una medida de la frecuencia de recombinación meiótica.

Por otra parte es posible asignar genes a un cromosoma en forma indirecta, si se demuestra que están ligados a otro gen que ya haya sido asignado a un cromosoma específico.

Los polimorfismos cromosómicos hereditarios pueden utilizarse para asignar locus polimórficos a cromosomas específicos en base a estudios combinados de marcadores cromosómicos y de otro tipo. De esta forma se asignó el primer gen a un autosoma, el grupo sanguíneo Duffy al cromosoma 1, al mos

trar su unión con un incremento en el polimorfismo hereditario en la heterocromatina pericentromérica de este cromosoma. En forma similar se asignó también el gen para la haptoglobina a los brazos largos del cromosoma 16.

Dentro de los estudios familiares ha sido de suma utilidad el dosage génico, ya que en este tipo de estudios con frecuencia se trabaja con material derivado de pacientes con anormalidades cromosómicas. El dosage génico puede ser cualitativo o cuantitativo. Se definen los estudios de dosage génico cualitativo como aquellos que comparan el número de productos diferentes de genes alélicos con el número de genes presente. Los estudios cuantitativos correlacionan el número de genes presentes con los cambios en la cantidad de expresión génica tales como la cantidad de una proteína específica o de cierta actividad enzimática.

Para el dosage cualitativo se han utilizado diferentes aberraciones cromosómicas, como deleciones y trisomias totales y parciales, tratando de correlacionar la presencia de productos con el número de genes alelicos presentes. Este tipo de estudio ha resultado muy útil para un análisis de exclusión y para el mapeo del cromosoma X.

Los estudios cuantitativos han resultado útiles para la asignación de genes principalmente al cromosoma 21, por la accesibilidad a individuos monosómicos, disómicos y trisómicos; aplicándose también para la detección de heterocigotos en casos de enfermedades que se presentan en estado homocigoto. Recientemente han permitido la confirmación de asignaciones efectuadas por otros métodos, permitiendo su localización en regiones subcromosómicas.

Genes cercanamente ligados pueden ser inferidos por detección de proteínas que presumiblemente se forman por combi

nación de dos genes relacionados. De esta forma se sugirió que los genes de las cadenas β y δ de la hemoglobina estaban cercanamente ligados debido al hallazgo de la hemoglobina tipo Lepore que tiene secuencias de aminoácidos que indican recombinación de los genes para las cadenas β y δ . - Un hecho similar se sugiere para las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (97).

B. Estudios utilizando células somáticas híbridas: (31,97).

El mapeo de genes humanos mediante esta metodología consiste en la obtención de una célula híbrida roedor-humano, la cual se forma fusionando células de roedor deficiente en un gen, con células humanas. Para conseguir la fusión se utilizan virus Sendai inactivados y algunos productos químicos.

Un hecho que favorece el mapeo es la pérdida paulatina y selectiva de todos los cromosomas humanos, excepto aquél - que contiene el gen deficiente en el genoma de roedor, ya -- que la célula híbrida requiere de un genoma íntegro para sobrevivir.

La separación de los híbridos de las células progenitoras se logra mediante el uso de sistema selectivo que permite seleccionar los híbridos a favor o en contra de un fenotipo dado. De esta manera pueden relacionarse dichos fenotipos con la presencia o ausencia de un cromosoma específico con la siguiente asignación.

Uno de los sistemas selectivos que mayor uso ha recibido es el medio HAT (Hipoxantina-Aminopterina-Timidina). Los análogos de purinas tales como la 8-azoguanina y 6-tioguanina requieren ser convertidos en nucleótidos por la enzima - -

hipoxantina-guanina-fosforribosil transferasa (HGPRT) para ejercer su efecto tóxico, contándose con líneas celulares resistentes a estos compuestos que no expresan dicha enzima - (por inducción o provenientes de individuos con síndrome de Lesch Nyhan). En forma similar el análogo de timina, el 5-bromo desoxi-uridina (BUdR) puede usarse para la selección de células que carezcan de la enzima timidina cinasa (TK). Las células que carece de HGPRT o TK sobreviven ya que las vías para síntesis de novo están intactas. Por otra parte la aminopterina inhibe a la enzima dehidrofolato reductasa, bloqueando la síntesis de novo de purinas y timina. Las células tratadas con aminopterina sobreviven únicamente si contienen las enzimas HGPRT y TK y si se añade al medio de cultivo hipoxantina y timidina. Utilizando este tipo de sistema se logra asignar el gen de la timidina cinasa al cromosoma 17 humano.

Un problema del medio HAT es que las células progenitoras deben ser HGPRT⁻ o HAT⁻ lo que requiere de un proceso anterior de selección.

La identificación individual de los cromosomas humanos dentro de los híbridos se logra aplicando diferentes técnicas de bandeo, tales como Bandas Q, G, R, C, etc. Un método sumamente útil es el GIEMSA II, ya que permite la tinción diferencial de las células humanas y de ratón quedando los de ratón de color magenta y los humanos de azul. (Bobrow, 1974) -- (98).

Para el mapeo por células somáticas híbridas es muy importante el uso de marcadores genéticos entre los que se incluyen:

- i) Secuencias de bases del ADN
- ii) Productos de transcripción (ARNHn, ARNt, ARNr 45 S, etc)

- iii) Productos de transcripción procesados (ARNm, ARNr 18 S, 28 S, etc.).
- iv) Productos de traducción (proenzimas, enzimas, proteínas estructurales).
- v) Productos de traducción modificados (Enzimas activas, - proteínas estructurales modificadas, glicoproteínas, etc)
- vi) Productos metabólicos de los productos de traducción.
- vii) Eventos o fenotipos complejos que puedan relacionarse - con elementos genéticos (Estructuras de orden superior. fenómenos de regulación y enfermedades).

Los principales marcadores empleados en el mapeo por -- células somáticas híbridas son las diferentes motilidades -- electrofóreticas observadas entre la mayoría de las isoenzimas de ratón y humanas.

La hibridación de células somáticas puede establecer la localización subcromosómica por la correlación de la expresión fenotípica con la presencia de una región cromosómica - particular. Esto es posible mediante el uso de células humanas portadoras de translocaciones o deleciones cromosómicas como progenitoras. Así mismo el uso de híbridos roedor-humano a partir de células irradiadas permite establecer el orden de los genes y las distancias entre ellos.

Las estrategias de mapeo con sistemas híbridos incluyen pruebas de sintenia, asignaciones por selección y asignación por asociación de genes no seleccionables.

En la Figura 6 se muestra en forma resumida como se mapean genes humanos por medio de células somáticas híbridas.

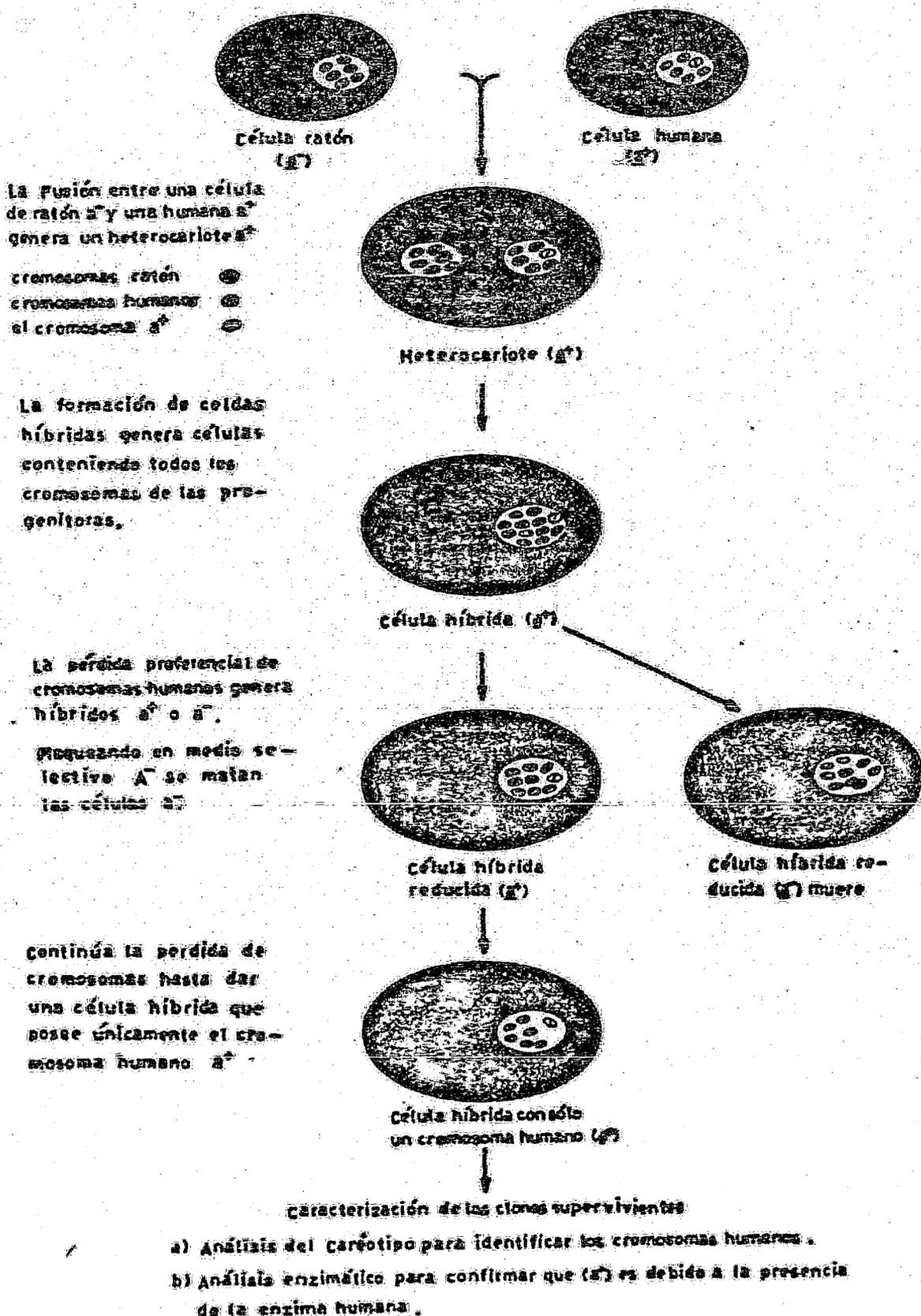


Figura 6 .- Mapeo de genes humanos por células somáticas híbridas ratón-humanas (31) .

C. El mapa genético humano:

El uso combinado de mapeo por estudios familiares, células somáticas híbridas, modificaciones a éstos e hibridación in situ, han permitido el desarrollo actual del mapa genético humano.

El mapa que se presenta a continuación es el recopilado por McKusick (1978) (99)/(Tabla 3). Los hallazgos posteriores (1979-1981) se muestran en la Tabla 4 y fueron obtenidos de la Excerpta en Genética Humana (100).

T A B L A 3

MAPA GENETICO HUMANO

CROMOSOMA 1

(P) lp36-y lp32	(P) Sitio de modificación - cromosómica lp I y II del - Adenovirus 12.
lp34-lp36	Enolasa-1
lp34-lp36	6-fosfogluconato deshidrogenasa
lp	Eliptocitosis-1
lp32-lpter	Grupo sanguíneo Rhesus
(P) lp32-lp34	Alfa-L-fucosidasa
(P) lp	(P) Grupo sanguíneo Scianna
(P) lp32(distal PGM ₁)	Uridina monofosfato cinasa
(P) lp31-lpter(distal PGM ₁)	Adenilato cinasa-2
(I) lp32;lp22.1-lp31.1	Fosfoglucomutasa-1
lp	(L) Aniridia, tipo II Baltimore
lp	(L) Grupo sanguíneo Dombrock
lp	Amilasa pancreática
lp	Amilasa salival
lp	Fenilcetonuria
lp	(I) Retinitis pigmentosa-1
lq2(distal a lqh)	Catarata, pulverulenta zonular
lq21-lq23	Grupo sanguíneo Duffy
	Úridil difosfato glucosa -- pirofosforilasa-1

1q41-1q43
1q42-1q43
1q42-1qter

(P) 1q31-1q42

(P) 1q42

1q

Peptidasa C

Genes ARNr 5 S

Fumarato hidratasa-S

Fumarato hidratasa-M

Guanilato cinasa-1

Guanilato cinasa-2

(P) Sitio de modificación cromosómica del Adenovirus 12.

(L) Antitrombina III

(L) Transferrina

(L) Pseudocolinesterasa-1

(P) Glucosa deshidrogenasa

(P) UDP galactosa-4-epimerasa

(P) 5-Metiltetrahidrofolato: L-homocisteína S-metiltransferasa.

CROMOSOMA 2

2p23

(P) 2p23-2pter

(I) 2q11, 6 2q32-2qter

2p11-2p22

2q23

(P) 2p

(L) 2q11-8q14

(I) Galactosa 1-fosfato uridil- - transferasa Fosfatasa ácida-1

(P) Uridil difosfato glucosa pirofosforilasa-2

Malato deshidrogenasa, soluble

Isocitrato deshidrogenasa, soluble

(P) Activador enzimático de galactosa

(I) Hemoglobina, alfa o beta

(P) Interferon-1

(P) Sitio de unión de cadenas pesadas de inmunoglobulinas

(P) Aril hidrocarburo hidroxilasa

(I) Galactosa-1-fosfato uridil - - transferasa (represor de acetilcolina

(P) Regulador de Acetilcolinesterasa

CROMOSOMA 3

(I) 3q21-3qter

(P) Glutation peroxidasa-1

(I) Galactosa-1-fosfato uridil- - transferasa

(P) Complemento temperatura sensible (TsAF8)

(P) Sensibilidad a virus Herpes

- (I) Beta Galactosidasa
- (P) Aminoacilasa-1
- (P) Aconitasa-S

CROMOSOMA 4

- 4p14-4p21
 - 4q23-4q27
 - 4q21-4q22
 - 4q11-4q13
 - (P) 4pter-4q21
 - (P) 4pter-4q21
- Fosfoglucomutasa-2
 - (I) Hemoglobina alfa o beta
 - (I) Hemoglobina alfa
 - (P) Componente grupo-específico
 - (P) Albumina
 - Peptidasa S
 - (P) Fosforribosilpirofosfato amidotransferasa

CROMOSOMA 4 ó 5

- (P) Formilglicinamida ribotido amidotransferasa
- (P) Activador de estearasa

CROMOSOMA 5

- (I) Entre 5qter y DTS:
5cen-tq13
 - 5q23-5q31
- Hexosaminidasa B
 - Interferon-2
 - (I) Hemoglobina beta

CROMOSOMA 5

- (P) 5q15-5qter
 - 5p
- Sensibilidad a toxina diftérica aril sulfatasa B
 - (P) Leucil-ARNt sintetasa
 - (P) Estado de depresión antiviral (regulador)

CROMOSOMA 6

- 6p2100-6p22
 - (6cm del centrómero)
 - orden: cen-D-B-C-A
 - con HLA-B
- Complejo principal de histocompatibilidad (MHC)
 - HLA-A
 - HLA-B
 - HLA-C
 - HLA-D
 - (P) HLA-DR
 - Componente-2 del complemento

No entrecruza con C2

6p21-6qter(? en 6q)
SR06p21-6p22
SR06p21-6q16

6q15-6qter; (P) 6q16-6q21

- (P) Componente C3b del complemento, receptor para
- (P) Componente C3d del complemento receptor para
- Componente -4F del complemento
- Componente-4S del complemento
- Factor B de properdina
- Grupo sanguíneo Chido (Ch) - igual a C4S
- Grupo sanguíneo Rogers (Rg) - igual a C4F
- (P) Linfocitos de reacción cruzada húmeda
- (L) Sensibilidad de Ragweed
- Hemocromatosis
- (P) Factor de diferenciación - neutrofilica
- Hiperplasia adrenal III (deficiencia de 21-hidroxilasa)
- Hipertrofia septal asimétrica
- Fosfoglucomutasa-3
- Glioxalasa 1
- Enzima málica, soluble
- OPCA-1, una forma de ataxia espino-cerebelar
- Superóxido dismutasa-2
- (L) Pepsinógeno
- (L) Grupo sanguíneo P
- (L) Enfermedad ósea de Paget
- (P) Activador de plasminógeno
- (I) NADH/diaforasa
- (L) Diabetes mellitus juvenil
- (I) Infección virus Baboon
- (P) Antígeno de superficie (SA6)
- (P) Glutamato oxaloacetato transaminasa, mitocondrial
- (I) Cadena pesada de Inmunoglobulina (Gm)
- (P) Receptor RBC de mono
- (P) Defecto septal atrial, tipo secundum
- (P) Proteína acomplejante de adenosina deaminasa

CROMOSOMA 7

7 pter-7q22

7p22-7q22

(I) 7p13-7cen, 6 7 cen-7q21
7 cen-7qter

- (P) Arginosuccinato liasa
- (P) Uridín fosforilasa
- Malato deshidrogenasa, mitocondrial
- Beta-glucuronidasa
- (I) sitio 7 de integración de SV40

7q
7q(?7q35)

7p12-7pter

- (P) Grupo sanguíneo Colton
- (P) Colágena-1(al 6 a 2)
- (P) Grupos sanguíneos Kidd
- (P) Factor de Hageman
- (P) Hidroxi-acil- CoA deshidrogenasa
- (P) Respuesto quimiotáctica de neutrofilos Histona H4
- (P) Antígeno de superficie (SA7X)
- (P) Antígeno de superficie (SA7Y)
- (P) Cadena ligera kappa de inmunoglobulina

CROMOSOMA 8

8p11
8p21

- (P) Lets, proteína transformación-sensible, externa, larga
- (L) Esferocitosis, tipo Denver
Glutation reductasa
- (P) Factor VII de coagulación
- (I) Cadenas pesadas de inmunoglobulina
- (I) Sitio 8 de integración de SV40

CROMOSOMA 9

SR09p12-9q33
9pter-9q13
9pter-9q33

9q34
Ligados a ABO definitiva o provisionalmente. Ligamiento de grupo asignado al 9 por asignación de AK₁

- Adenilato cinasa-3
- Aconitasa, soluble
- Arginosuccinato sintetasa
- (I) Galactosa-1-fosfato uridil - transferasa

- Grupo sanguíneo ABO
- Adenilato cinasa-1
- Síndrome de Nail-Patella
- (L) Síndrome de Waardenburg-1
- (L) Xeroderma pigmentoso, egipcio

CROMOSOMA 10

10q24-10q26

- Adenosina cinasa
- (L) Epidermolisis vesicular, tipo Ogna
- (L) Glutamato piruvato transaminasa, soluble
- Glutamato oxaloacetato transaminasa, soluble.

10pter-10q34

10pter-10q24

Hexocinasa-1

(P) Síntesis de glutamato-gamma-semialdehído

Pirofosfatasa inorgánica

(P) Promotor de policariocitosis

(P) Proteína 130 de membrana externa

cromosoma 11

11p12.08-11p12.03

11p12-11cen

11cen-11q22

11p13-11pter

11q13-11qter

11q13-11pter

11p

11p3

Lactato deshidrogenasa A

Fosfatasa ácida-2

Esterasa A-4

(P) Antígeno letal:a1

(P) Antígeno letal:a2

(P) Antígeno letal:a3

(P) Antígeno de superficie (SA 11)

(P) Tumor de Wilms.Triada AGR

(P) BVIX (inducción de virus BALB endotrópico)

Agrupación de no alfa globina (NAG)

Hemoglobina gamma 136 glicina

Hemoglobina gamma 136 alanina

Hemoglobina delta

Hemoglobina beta

Polimorfismo de reconocimiento

HpaI

(L) Hemoglobina epsilon

CROMOSOMA 12

12p12.2-12pter

12p12.1-12p12.2

(P) 12p12.2-12pter

(P) 12q21

12pter-12q14(?a1)

Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

Lactato deshidrogenasa B

Triosa fosfato isomerasa-1

(P) Triosafosfato isomerasa-2

Peptidasa B

Enolasa -2

Citrato sintasa, mitocondrial

Serina hidroximetiltransferasa

(L) Esferocitosis, tipo Denver-12p ó 8 cen

(P) Antígeno de superficie (SA 12)

(L) Glicosfingolípido galactosidasa

CROMOSOMA 13

13p12
 (I) 13q3 (13q14)
 (I) 13q12-13q14 (13q21-13q22)

ARN ribosomal
 Estearasa D
 (L) Lipoproteína-Lp
 Retinoblastoma-1

CROMOSOMA 14

14p12
 14q11-14q21 (SRO:q12-q20)
 14q21-14qter

ARN ribosomal
 Nucleosido fosforilasa
 Triptofanil-tARN sintetasa
 (P) Proteína 195 de membrana externa
 (P) Sitio de integración del virus Epstein-Barr

CROMOSOMA 15

15p12
 15q11-15qter
 SRO 15q14-15q21
 15q14-15qter SROq22-qter
 15q14-15qter
 SRO 15q22-15qter
 SRO 15q21-15qter

ARN ribosomal
 (P) * Manosidasa, citoplásmica
 # 2-Microglobulina
 Manosafosfato isomerasa
 Piruvato cinasa-3
 Hexosaminidasa A
 Isocitrato deshidrogenasa, mitocondrial
 (P) BVIN (Inducción de virus BALB,N-trópico)

CROMOSOMA 16

(P) 16cen-16q22
 16q
 16q22
 16q22
 16q22

(L) Pseudocolinesterasa-2
 Adenina fosforribosiltransferasa
 Haptoglobina, alfa
 Lecitin-colesterol aciltransferasa
 (P) Timidina cinasa, mitocondrial
 Hemoglobina alfa

CROMOSOMA 17

17q
 (P) 17q21-17q22

(P) Colágena I (a 6 a2)
 Timidina cinasa, soluble

(P) 17q21-17q22
17q21-17q22

Galactocinasa
Sitio de modificación cromosómica 17 del adenovirus 12
(P) Sitio de integración 17 de SV40
(P) α glucosidasa
(P) Antígeno de superficie SA 17)

CROMOSOMA 18

18q23-18qter

Peptidasa A
(L) Gonadotropina coriónica

CROMOSOMA 19

SRO 19pter-19q13
SRO 19pter-19q13
(P) 19q
(L) 19q

α -D-manosidasa B lisosómica
Glucosafosfato isomerasa
Sensibilidad a virus de Polio
(L) Sensibilidad a Echo 11
Peptidasa D
(I) Infección de virus Baboon
(P) Suceptibilidad a virus GocksackieB-3

CROMOSOMA 20

SRO 20p11-20qter

Adenosina deaminasa
(P) Enzima demosterol a colesterol
Inosín trifosfatasa

CROMOSOMA 21

21p12
(P) 21q21-21qter
21q22.1

ARN ribosomal
Proteína antiviral (receptor de interferón)
Superóxido dismutasa-I
(P) Fosforribosil glicinamida sintetasa

CROMOSOMA 22

22p12
22q13-22qter
(P) 22q12

ARN ribosomal
(I) β Galactosidasa
(P) Leucemia mieloide crónica
Ariil sulfatasa A
(I) NADH/diaforasa-I
Aconitasa, mitocondrial
(P) α Galactosidasa B

CROMOSOMA X

(L) Xp	Grupo sanguíneo Xg
Xp22-Xpter	Sulfatasa de esteroides (ictiosis)
Xq13	Fosfoglicerato cinasa
Xq22-Xq24	Galactosidasa A (enfermedad de Fabry)
Xq22-Xq26	Fosforribosilpirofosfato sintetasa
distal a Xq26	Hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa
Xq25-Xqter	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
Xq	Antígeno de superficie (o de especie) ligado al X (SA X)
(P) Xq	Regulador de tirosina aminotransferasa
Xq	Hemofilia A
Xq	Distrofia muscular tipo Becker
Xq	Ceguera al color
	Receptor de dihidrotestosterona
	Ornitín transcarbamilasa
	Complemento temperatura sensible

CROMOSOMA Y

Yp

Antígeno H-Y

Abreviaturas:

- P = Provisional. Basado en evidencias de un laboratorio o familia
- I = Inconsistente. Resultados de diferentes laboratorios en desacuerdo.
- L = En el limbo o tentativo
- SRO = Región pequeña de sobreposición

Aquellos que carecen de símbolo están confirmados por dos o más investigadores o métodos.

T A B L A 4

ADICIONES RECIENTES AL MAPA GENETICO HUMANO (100)

Cromosoma 1

Succinato deshidrogenasa		Células somáticas híbridas
Grupo sanguíneo Radin (Rd)	entre PGM1 y FUCRM	
Gunilato cinasa I (GUK 1)	1q32-q43 1q31-q42	Dosage génico
RNA r 5 S	1q42-44	Hibridación <u>in situ</u>
Uridil difosfato galactosa 4 epimerasa	1pter-p21	Células somáticas híbridas.
Eliptocitosis		Familiar.
Tetrahydropteroil glutamato metil transferasa (MTR)		
Fenil cetonuria 1 (PKU 1)		

Cromosoma 2

Fosfatasa ácida (ACP 1)	2p23	Familiar. Deleciones
Fosfatasa ácida en eritrocitos	2p25	Dosage génico

Cromosoma 3

Amino Acilasa 1 (ACY 1)	3p21-pter	Células somáticas híbridas
Glutación peroxidasa 1	3p13-q12	Células somáticas híbridas

(GPX 1) Galactosidasa		Células somáticas híbridas
Cromosoma 4		
Grupo sanguíneo MNSS factor X	4q28 o q31	Exclusión y dosage Familiar, Citogenético
Reductasa de dihidropteridina quinoide		Células somáticas híbridas
Cromosoma 5		
Cromosoma 6		
Factor C2 del complemento Fosfoglucomutasa 3 (PGM)	en MHC HLA-B 6q12-qter	Tipificación HLA Células somáticas híbridas.
Glioxalasa (GLO)	6p	
Enzima Mállica soluble (MEL)	6p	
Deficiencia 21 hidroxilasa	entre HLA-A y HLA-D	Tipificación HLA
Cromosoma 7		
Glicoproteína membranal de granulocito		
Arginosuccinato liasa (ASL)		Dosage génico
β glucuronidasa	7q22	Dosage génico
Histonas		Hibridación <u>in situ</u>
Factor epidérmico de crecimiento (EGF)		Células somáticas híbridas

Cromosoma 8

Exclusión de grupo sanguíneos
MNSs, Kidd y glucomutasa

Estudios familiares

Cromosoma 9

Galactosa 1 fosfato uridil
transferasa (GALT)

9p

Células somáticas
híbridas

Aconitasa soluble

9p

Células somáticas
híbridas

Adenilato cinasa-3

9p11-pter

Células somáticas
híbridas

Adenilato cinasa 1

9q34

Células somáticas
híbridas

Uridín fosforilasa (UP)

Células somáticas
híbridas

Uridil tranferasa

Células somáticas
híbridasFolil poli glutamato
intetasa (FPGS)Células somáticas
híbridas

Cromosoma 10

Lipasa ácida A

Células somáticas
híbridas

Fosfofructocinasa tipo F

Células somáticas
híbridas

Cromosoma 11

Catalasa

11p13

Dosaje génico y cé-
lulas somáticas hí-
bridas.

β globina
 δ globina

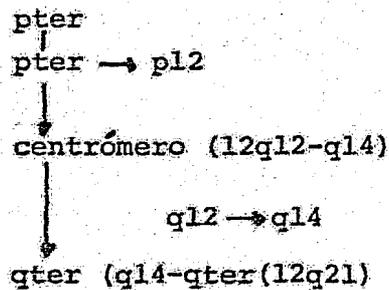
11p1205-p1208

ADN recombinante y
 Células somáticas
 híbridas.
 Endonucleasas res-
 tricción
 Células somáticas
 híbridas.

Insulina

Cromosoma 12

Triosa fosfato isomerasa
 Gliceraldehido 3fosfato
 deshidrogenasa
 Deshidrogenasa láctica B
 Serina hidroxil metil trans-
 ferasa
 Peptidasa B



Cromosoma 13

Estearasa D

13q14

Dosage génico, de-
 lecciones

Retinoblastoma

13q14

Cromosoma 14

Cadenas μ, α y γ de
 inmunoglobulinas

Células somáticas
 híbridas

Nucleósido fosforilasa

14q13

Dosage génico

Creatinina cinasa		Células somáticas híbridas
Cromosoma 15		
Sorbitol deshidrogenasa	15pter-q21	Células somáticas híbridas.
Cromosoma 16		
Lipasa ácida B(lisosómica)		Células somáticas híbridas.
Fosfoglicolato fosfatasa	16qh 6	Células somáticas híbridas
	16p13 ó 16 p12	
Diaforasa 4		Células somáticas híbridas
Cromosoma 17		
Hormona de crecimiento		Células somáticas híbridas
Somatotropina coriónica		ADN recombinante
Procolágena tipo I	17q21-q22	ADN recombinante y células somáticas híbridas
α glucosidasa ácida	17q21-q ter	Células somáticas híbridas
(Glicogenosis II)		
Cromosoma 18		
Peptidasa A	18q23	Dosage génico

Cromosoma 19

Cromosoma 20

Adenosín deaminasa	20q13.2-qter	Dosage génico
Inosín trifosfatasa	20pter-cen	Células somáticas híbridas

Cromosoma 21

Glutati6n peroxidasa

Cromosoma 22

Aconitasa miticondrial (ACO2)	22q11-q13	Células somáticas híbridas
-------------------------------	-----------	----------------------------

Aril sulfatasa A (ARSA)	22q13-qter	Células somáticas híbridas
-------------------------	------------	----------------------------

N-Acetil alfa D galactosa-minidasa (NAGA)	22q13-qter	Células somáticas híbridas
-------------------------------------------	------------	----------------------------

β galactosidasa

Células somáticas híbridas

Cromosoma X

Gen controlador de Ag HY	Xp233	Delecciones
Sulfatasa de esteroides	Xp11-pter	Células somáticas híbridas

Fosforibosil pirofosfato sintetasa		Células somáticas híbridas
------------------------------------	--	----------------------------

Locus Duchenne	Xp21	Estudios familiares
----------------	------	---------------------

Cromosoma Y

Antígeno HY
 Factor de crecimiento
 Espermatogénesis
 Diferenciación testicular
 Maduración testicular

IV. ESTRUCTURA MOLECULAR DE LOS CROMOSOMAS HUMANOS .

El material genético en los núcleos de las células eucariotas se encuentra en forma de redes de cromatina en la interfase y en los cromosomas durante los procesos de división lo cual indica un cambio de estructura a través del ciclo celular de un estado difuso a uno condensado.

La cromatina contiene ADN, ARN y proteínas, considerándose se como un complejo de nucleoproteína, en el que las proteínas interactúan con el ADN y entre ellas.

La estructura de la cromatina, y por consiguiente de los cromosomas, ha constituido uno de los principales problemas de la citogenética molecular habiéndose propuesto varios modelos para explicar la interacción ADN/proteína. En la actualidad mediante la observación de los cromosomas en el microscopio electrónico, el aislamiento y purificación de la cromatina, la cual puede someterse a diversos tratamientos tales como técnicas de difracción de rayos X y neutrones, separación de fracciones de ADN, examen de secuencias y repetición de bases por endonucleasas de restricción e hibridación in situ y por técnicas de bandeo cromosómico que revelan diferencias estructurales a lo largo de los cromosomas, se ha obtenido un avance considerable en el conocimiento de la organización del material genético en la cromatina.

El principal adelanto a nivel molecular lo constituye la existencia de una unidad estructural básica, el nucleosoma, que se encuentra en forma repetitiva y periódica en los cromosomas.

somas mitóticos y en la cromatina en interfase. El hecho de que este tipo de organización no sea dependiente de la secuencia del ADN implica que tanto genes activos como inactivos están empacados en esta forma.

1. COMPONENTES DE LA CROMATINA.

Las proporciones relativas de ADN, ARN y proteínas en la cromatina varían de acuerdo al tejido, organismo y método de preparación. Las proteínas de la cromatina se dividen en dos grupos: proteínas muy básicas, llamadas histonas y las restantes descritas como "no histónicas", las cuales son menos básicas por lo que se les ha llamado "ácidas", lo cual es erróneo ya que sus puntos isoeléctricos son más bajos que los de las histonas pero no propiamente ácidos (31,101).

Generalmente la cantidad de histonas determinada por peso molecular es similar a la del ADN. La proporción de las no-histónicas es más variable pero en general un poco mayor que la de histonas. La masa total de proteínas es por lo tanto aproximadamente dos veces la cantidad de ADN (31,102). El ARN se encuentra en una proporción mucho menor (menos de 10% del ADN) y probablemente comprende cadenas recién formadas que no han sido liberadas, sin poder descartarse que existan moléculas con funciones estructurales (31).

El mecanismo de interacción ADN/proteínas no ha sido totalmente dilucidado aún cuando la interacción ADN/histonas está bien caracterizada, pues estas proteínas están involucradas en la estructura del nucleosoma. Las histonas comprenden 5 tipos de proteínas cuya estructura está altamente conservada a

través de la evolución suponiendo una función estructural --- común en todos los eucariontes (31).

Las proteínas no histónicas no intervienen en la formación del nucleosoma, comprenden mayor número de proteínas con aparentemente especificidad de tejido y especie. Sus funciones no están bien establecidas pero probablemente tengan funciones estructurales y regulatorias de la expresión génica e incluyan las enzimas necesarias para la replicación, reparación y transcripción del ADN (31,101).

A. Acido desoxirribonucleico (ADN)

La participación del ADN en la organización de la cromatina ha estado sujeta a múltiples modelos y especulaciones.

A partir de los estudios en los cromosomas politénicos de *Drosophila* se pensó que el ADN en los cromosomas de mamíferos se encontraba en forma de hebras múltiples de moléculas de doble hélice. Mirsky y Ris (1951) propusieron un modelo en el cual sugieren que cada cromosoma consiste en una estructura longitudinal de proteína a la cual se unen lateralmente moléculas individuales de ADN. Otro modelo fue el propuesto por Freese en 1958 en el cual muchas moléculas "duplex" de ADN son unidas por sus extremos mediante proteínas, cuya interacción sería responsable de la condensación mitótica, además de que la separación entre los "duplex" de ADN permitiría la replicación (2,31,103).

Sin embargo los experimentos de autorradiografía de Taylor (1957) que demuestran que cada cromátida se comporta como un largo "duplex" de ADN y las técnicas de marcado cromosómico con BUdR para determinar intercambio de cromátidas hermanas permiten afirmar que cada cromátida contiene sólo un duplex de ADN. Evidencias de otro tipo, tales como la presencia de genes únicos por cromátida o el hecho de que ocu

rran intercambios de tipo robertsoniano entre cromátidas refuerzan este concepto ya que implican que la polaridad del ADN es continua a través del centrómero (101, 104-106).

Si se extendiera el ADN de un núcleo diploide humano, el cual se encuentra generalmente en configuración B del modelo de Watson-Crick, alcanzaría una longitud de aproximadamente 2 metros. Un núcleo en interfase que tiene un diámetro del orden de 3-5 μm debe contener esta longitud y si lo comparamos organizado en 46 cromosomas, cuya longitud en metafase -- va de 2 -10 μm deberá contener 14,000 μm de ADN el cromosoma más pequeño y aproximadamente 73,000 μm en el más largo. De esta manera el material genético, en su estado más condensado, tendrá una contracción en su longitud de aproximadamente 10,000 veces (31,101,106).

La variación en el largo de los cromosomas es considerable por lo que cualquier modelo para explicar su estructura debe considerar el empaquetamiento extensivo del ADN en los cromosomas mitóticos y los cambios que sufre la cromatina al pasar de estadios extendidos a condensados a través del ciclo celular.

B. Histonas.

Las histonas son proteínas pequeñas con carga positiva, ricas en los aminoácidos básicos arginina y lisina y carentes de triptófano que puede extraerse con ácidos diluidos. Utilizando geles de acrilamida para separarlas por electroforesis se demostraron cinco fracciones de histonas, las cuales están presentes en todas las células eucariontes (107,108). Han sido clasificadas de acuerdo a su contenido relativo de arginina y lisina: El tipo rico en lisina corresponde a H1, las ligeramente ricas en lisina son H2A y H2B y las ricas en arginina son H3 y H4

a) Histonas ricas en lisina.

La Histona H1 es la más básica debido a su elevado contenido de lisina que es de aproximadamente 30%. Su longitud es el doble que la del resto de las histonas y su peso molecular es de 23,000. Puede ser removida selectivamente de la cromatina con ácido perclórico o tricloroacético al 5% (31,109).

Las histonas de mamíferos ricas en lisina pueden ser fraccionadas en subgrupos de proteínas cercanamente relacionadas en secuencia y muestran especificidad de tejido y variaciones especie-específicas.

Se han encontrado racimos de aminoácidos relacionados -- tanto en el extremo amino como en el carboxilo, con una región apolar en el centro aparentemente plegada, la región globular se encuentra en el extremo N y en el extremo C tiene un centenar de aminoácidos formando un copolímero de lisina, alanina y prolina (31,109,110).

Si bien la constitución de las histonas de la cromatina es casi invariable pueden ocasionalmente ocurrir cambios, tales como la sustitución de una variante por otra en diferentes estadios de desarrollo. En los eritrocitos nucleados de peces, aves y reptiles la histona rica en lisina H1 es reemplazada por una nueva especie H5. El contenido de histonas ricas en lisina se mantiene constante dado que H5 aumenta a expensas de H1 hasta eliminarla (31).

Las histonas ricas en lisina sufren fosforilaciones dependientes del ciclo celular.

En algunas especies durante la espermatogénesis, las histonas son reemplazadas por protaminas, las cuales sufren también fosforilaciones (31).

b) Histonas ricas en arginina y ligeramente ricas en lisina (H3, H4 y H2A, H2B).

El peso molecular de estas proteínas varía de 11,000 a 16,000 daltones y aproximadamente el 25% de sus aminoácidos son básicos (arginina, lisina e histidina), la mayoría de estos grupos básicos se encuentran dentro de los 30 a 40 primeros aminoácidos agrupados en el extremo amino de la molécula. Las histonas ricas en arginina, H3 y H4, están marcadamente conservadas en la evolución; las ligeramente ricas en lisina H2A y H2B están menos conservadas, pero mantienen una estabilidad evolutiva en sus porciones no básicas (31,109).

Por estudios de resonancia magnética nuclear se ha establecido que la parte media (no básica) y el extremo carboxilo de estas histonas forman estructuras globulares. Estas regiones parecen ser el sitio para las interacciones histona/histona; mientras que las colas básicas parecen ser immobilizadas por su interacción con el ADN (31,109).

Estas histonas sufren algunas modificaciones en su estructura durante el ciclo celular. En diferentes organismos se han encontrado variantes de H2A y H2B y en el erizo de mar se encontraron al menos 8 variantes de H2B. Para las histonas H3 y H4 no existen formas de transición (31,111).

c) Evolución de las histonas.

El reconocimiento de los mismos 5 tipos de histonas en todos los eucariontes estudiados implica que su evolución fue un evento antiguo. Se supone que las histonas evolucionaron por divergencia de secuencias duplicadas originalmente representando una única proteína de unión a ADN. Todas las histonas tie

nen características comunes, tales como la región altamente básica en el extremo N de la molécula que provee el supuesto sitio de unión al ADN.

Su persistencia en diversas especies implican una alta estabilidad evolutiva. Las histonas ricas en arginina son las proteínas más conservadas con excepción de la tubulina que -- también es una proteína estructural. Las histonas ligeramente ricas en lisina parecen haber evolucionado en su secuencia un orden de magnitud más rápidamente que las ricas en arginina y las ricas en lisina un orden de magnitud aún más rápido (31).

d) Modificación de histonas.

Las histonas sufren modificaciones covalentes que incluyen: acetilación, metilación, ADP-ribosilación y fosforilación y en la histona H2A existe unión covalente a la proteína ubiquitina. La selección de un pequeño número de residuos para modificación en cada histona indica que la reacción es específica y se ha tratado de correlacionar con estadios del ciclo celular y etapas de maduración (31,112).

La acetilación de las histonas ricas en arginina y ligeramente ricas en lisina se lleva a cabo en uno o más residuos de lisina del extremo amino terminal, las modificaciones internas parecen ser inestables. En general la acetilación y metilación de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 ocurren tanto en las preexistentes como en las sintetizadas de novo durante la fase S y en forma simultánea a la replicación del ADN (107). La modificación de las histonas preexistentes debe ocurrir en el núcleo. Se cree que las modificaciones internas de las histonas recién sintetizadas son hechas en el mismo tiempo y lugar, mientras que la adición de los grupos estables N terminal pue

de ocurrir durante su síntesis en el citoplasma. La remoción de los grupos modificantes ocurre sólo en el núcleo durante el ciclo celular y son reemplazados en la siguiente fase S. La acetilación es mayor en H3 y H4 que en H2A y H2B (31,112).

Se han establecido numerosas correlaciones entre la acetilación de las histonas y la actividad génica; sin embargo los reportes de que la hiperacetilación altera los patrones de expresión génica son controversiales y por otra parte la acetilación extensiva de las histonas no parece afectar su afinidad por el ADN (31,112).

H2A, H2B, H3 y H4 son fosforiladas en la región N terminal, la modificación consiste en un éster fosfórico unido a un residuo de serina. H2A y H4 son fosforiladas y desfosforiladas en forma más o menos simultánea a los procesos de acetilación-deacetilación. La fosforilación de H2B se ha correlacionado con el contenido celular de heterocromatina y se incrementa después de estimulación hormonal. La fosforilación de H3 se ha asociado con entrada y salida de los estados condensados de la mitosis (112).

La histona H1 tiene un ciclo de modificación-demodificación diferente al de las otras histonas. Las histonas ricas en lisina no parecen ser acetiladas o metiladas, pero pueden introducirseles un número variable de grupos fosfato. El tiempo de fosforilación no está aún determinado ya que puede ser en S o durante la mitosis. Reportes recientes afirman que una pequeña cantidad de fosforilación ocurren en la fase S, representando la introducción de uno o dos grupos fosfato. Fosforilación más extensiva hasta llegar a un total de 6 grupos fosfato, ocurre en otros sitios de H1 al iniciarse la mitosis y su eliminación sólo se efectúa al final de la división (31, 113).

En todos los eventos es obvio que H1 se encuentra fosforilada durante la mitosis, el nivel de grupos fosfato en H1 está determinado por la acción neta de una fosfocinasa y una fosfatasa. La actividad de fosfocinasa se incrementa en la transición de G2 a mitosis, por lo que el tiempo de fosforilación de H1 parece estar involucrado en la condensación mitótica de la cromatina (31,114).

En el caso de H5 su fosforilación parece ser inmediata a su síntesis y es defosforilada gradualmente (31).

c) Proteínas no histónicas.

Las proteínas no histónicas son definidas como los componentes proteicos que permanecen en la cromatina una vez que las histonas son removidas. Esta definición operacional presenta dificultades obvias, tal como el problema de distinguir los componentes genuinos de la cromatina, de contaminantes derivados del nucleoplasma o del citoplasma. También es necesario distinguir entre las proteínas de la cromatina y aquellas que son parte de sus transcriptos de ribonucleoproteína.

Otra dificultad es conocer si las proteínas han sido obtenidas en su estado nativo, es decir sin degradación, ya que actividades de proteasas se hallan comunmente en la cromatina. Debido a que las proteínas no histónicas pueden tener diferentes características, tales como su afinidad por el ADN, cualquier estimado de las cantidades relativas de especies individuales debe ser hecho teniendo presente que no siempre éstas son extraídas correctamente. La importancia del proceso de extracción puede variar en cromatinas derivadas de diferentes fuentes, dificultando el comparar la constitución de proteínas no histónicas (31,115).

La cantidad de proteínas no histónicas reportada en la cromatina varía mucho, careciendo de un ensayo funcional para la mayor parte de ellas, se puede concluir que su masa es un poco menor que las de histonas, aún cuando se tienen reportes que van de 20 a 200% del contenido de ADN (31,107).

Al separar las proteínas no histónicas en geles de SDS (dodecil sulfato de sodio), se han detectado 12 a 20 bandas con un rango de pesos moleculares entre 10,000 y 180,000 daltones. Su número no debe ser mayor que el número de bandas observado. Otros métodos permiten obtener de 60 a 470 bandas (31,116,117).

Al igual que las histonas las no histónicas se sintetizan fuera del núcleo, en el citoplasma y algunas de ellas inmediatamente después de su síntesis pasan a asociarse al ADN. Otras tardan un tiempo variable en aparecer como componentes de la cromatina. Las proteínas no histónicas muestran una tasa de recambio superior a la de las histonas, con una oscilación considerable en el tiempo de vida de cada una de sus fracciones; unas persisten escasos minutos mientras que otras son tan estables como el ADN. Aún no se conoce si al abandonar su asociación con el ADN, las no histonas se degradan o entran a formar parte de una reserva de proteínas en el núcleo o en el citoplasma. Las proteínas cromosómicas no histónicas están, al menos parcialmente, en estado de flujo dinámico (107).

Una muestra de su gran diversidad funcional es la variedad de sistemas enzimáticos complejos encontrados entre ellas. Hay enzimas tales como las polimerasas implicadas en la síntesis y reparación del ARN y ADN, enzimas implicadas en la síntesis y degradación de las proteínas y enzimas que modifican a los ácidos nucleicos y a las proteínas añadiendo o eliminando grupos acetato, metilo o fosfato y que constituyen de 10-20% de las no histónicas (31,107).

Se han encontrado proteínas celulares estructurales como componentes de las "no histonas", principalmente actina, miosina, tubulina y tropomiosina, siendo difícil determinar si son componentes genuinos o contaminantes. En la cromatina del hígado de rata constituyen 40% de la fracción no histónica, (31, 118).

Hay notables diferencias entre los tipos de proteínas no histónicas encontradas en células de especies distintas. Dado que la información genética codificada por el ADN es única para cada especie, la especificidad de especie observada en las proteínas "no histonas" está de acuerdo con una supuesta -- función regulatoria. Además, en el mismo organismo varían de tejido a tejido, lo cual es coherente con la utilización selectiva de la información genética por parte de los diferentes -- tipos celulares (31,107).

En el timo de ternera se han encontrado proteínas no histónicas conocidas como HMG (abreviatura de grupo de alta movilidad) constituidas por cerca de 20 proteínas, siendo las -- principales HMG1 y HMG2, las cuales se han encontrado también como contaminantes de H1. Tienen pesos moleculares que van -- de 27,500 a 26,000 y son ricas en aminoácidos ácidos y básicos (55%). Tienen en común con las histonas el alto contenido de -- arginina y lisina, pero difieren en su elevado contenido de -- ácidos glutámico y aspártico; cada una está presente en -- aproximadamente 10^5 copias por núcleo. Ambas se unen al ADN dejando libres las regiones más ácidas. HMG2 parece ser la causa de que el ADN tome una forma más compacta y se une menos fuertemente al ADN denaturado que al nativo. HMG1 interacciona con algunas subfracciones de H1, mientras que HMG2 reacciona más fuerte aunque menos específicamente. No se sabe cual es la función de estas proteínas pero su unión al ADN y extracción con HCl sugiere que intervienen en la ultraestructura -- cromosómica (31,119, 120).

Proteínas HMG encontradas en otros organismos son también ricas en arginina y lisina y se unen a ADN, siendo sus secuencias semejantes (31).

Una de las proteínas no histónicas del hígado de rata, la A24, ha sido purificada y caracterizada. Su solubilidad es semejante a la de las histonas. La región C terminal es igual a la de H2A, encontrándose dos tipos de secuencias N terminal, una similar a H2A y otra diferente. Se piensa en una molécula de H2A con un péptido insertado en la posición 119 en un grupo NH_2 de lisina, lo cual la transforma en ubiquitina, una proteína caracterizada por su persistencia en el núcleo de mamíferos. La proteína A 24 está presente en nucleosomas, quedando por establecerse su función específica, aún cuando se le ha implicado en procesos de condensación de la cromatina (31, 121, 122).

2. NATURALEZA FIBROSA DE LA CROMATINA

Cuando los cromosomas en profase se ven al microscopio óptico, cada uno parece consistir de dos cromátidas, que se acortan durante la mitosis, antes de que ocurra esta condensación cada cromátida parece comprender una fibra enrollada, el cromonema. Con la mayor resolución del microscopio electrónico se ha observado que el cromonema está formado por fibras dobladas (2,31).

Ris y Chandler (1963) basados en observaciones de cromosomas extendidos de profase meiótica, postularon que los cromosomas estaban constituidos por varias fibras de cromatina (polinémicos), ya que al observar las fibras en secciones de cromosomas al microscopio electrónico, resulta difícil seguirlas

y determinar su forma; además es necesario considerar los problemas para aislar cromatina y cromosomas y los cambios que en ellos provoca la manipulación por las diferentes técnicas empleadas (2,101,123).

Gall (1966) desarrolló una técnica para aislar fibras de núcleos en interfase y de células en metafase que consiste en hacer estallar células no fijadas y dispersar sus componentes al colocarlos en una superficie de agua destilada o solución hipotónica. Los efectos combinados de hipotonicidad y fuerzas de tensión superficial en la interfase agua-aire, extienden los componentes celulares, para poder tomarlos en las rejillas para microscopía electrónica. Posteriormente se someten a un "secado de punto crítico" con CO_2 líquido para prevenir que se colapsen (124).

Con este método Gall encontró que el núcleo en interfase contiene fibrillas de largo considerable con un diámetro de 150 a 600 Å; posteriormente otros autores, entre ellos Du Praw coincidieron en que el diámetro de las fibras en interfase se encontraba entre 230 y 250 Å (2,124,125,126).

Al observar cromosomas en metafase preparados por este método de extendido, Du Praw mostró que cada cromosoma parece consistir de una fibra con un diámetro entre 20 y 30 nm, bastante apretada e irregularmente doblada en la estructura característica del cromosoma. A pesar de que durante la preparación pueden ocurrir cambios en la apariencia y dimensiones de la fibra, la conclusión más importante de estos análisis es que el cromosoma consiste de una sola fibra de cromatina (125, 127).

Si la fibra es continua en cada cromátida puede asumirse la continuidad en el "duplex" de ADN, lo cual fue confirmado -

por los estudios de los cromosomas "lampbrush" de los anfibios, al demostrar la integridad de su eje, siendo sensible únicamente a ADNasa (2,31).

El alto grado de empaquetamiento del ADN dentro del cromosoma implica que la fibra básica de 30 nm debe consistir de una doble hélice de ADN superenrollada, que por si misma forma la ultraestructura. Los modelos uninémicos implican la existencia de más de un nivel de organización estructural dentro de la cromatina y los cromosomas.

Podemos concluir que el número de fibras de cromatina en una célula no es muy grande ni excede el número de cromátidas siendo en el humano 92.

La apariencia de la fibra de cromatina ha sido descrita como nudosa, irregular, hinchada y abultada a partir de micrografías electrónicas. Las fibras parecen no tener regularidad en diámetro y superficie (101).

Se acepta que el diámetro promedio de las fibras se encuentra entre 200 y 300 Å; las fibras con diámetros mayores se explican por el efecto de la colchicina. Se cree que por efecto de la colchicina y otros venenos mitóticos el exceso de calcio no es quelado al no formarse las fibras del huso acromático. Este exceso de calcio puede actuar en las proteínas contractiles de la cromatina en forma comparable a su función en el músculo. En cambio se pueden obtener fibras más delgadas por un exceso de manipulación. En microscopía electrónica las fibras se estrechan por las fuerzas mecánicas a que son sometidas. La adición de sustancias químicas en forma de soluciones amortiguadoras también tiende a adelgazar las fibras. Por otra parte debe considerarse la pérdida de proteínas durante la extracción, principalmente de las no histónicas (101,115).

La masa seca del núcleo de un linfocito humano se ha calculado en 45×10^{-12} g. Dividiendo esta masa entre la masa de una micra de fibra de cromatina tenemos 76,000 μ m o 7.6 cm de fibra de cromatina por núcleo. Si consideramos el radio ADN: fibra de cromatina, sería de 220 cm: 7.6 cm ó 28.94:1; - podemos concluir que hay aproximadamente 29 largos de ADN en cada largo de fibra de cromatina (101).

3. EL NUCLEOSOMA. UNIDAD ESTRUCTURAL BÁSICA DE LA CROMATINA

Previamente al modelo del nucleosoma se creía que el ADN de la cromatina, en forma de doble hélice, se encontraba cubierto extensivamente por proteínas. Dada la gran afinidad de las histonas por el ADN, éstas serían las responsables de la neutralización de las cargas negativas y de la compactación del ADN dentro del núcleo.

Hechos tales como la elevación de la temperatura de fusión, la reducida transcripción por la ARNpolimerasa y el decremento en la susceptibilidad a ADNasa sugerían que casi todo el ADN de la cromatina estaba cubierto uniformemente por proteína.

El desarrollo del concepto del nucleosoma como subunidad periódica de la cromatina implica un cambio radical de la estructura de los cromosomas eucarióticos. Cada nucleosoma contiene aproximadamente 200 pb de ADN formando un complejo con proteínas histonas. El interior de la partícula lo constituye un octámero de histonas con 2 moléculas de cada uno de 4 tipos diferentes de histonas (H2A, H2B, H3 y H4). El ADN está enrollado alrededor de esta estructura central y la quinta histona, H1, esta generalmente unida al complejo pero no forma parte de la estructura central de histonas.

A partir de este modelo surgen infinidad de dudas acerca de la forma en que interaccionan el ADN y las histonas y respecto a la formación de estructuras de orden superior en los cromosomas a partir de estas subunidades.

A. Evidencias de la existencia de una estructura periódica en la cromatina.

a) Estudios de cristalografía de Rayos X.

El primer indicio de la función de las histonas se obtuvo hace aproximadamente 20 años, a partir de los estudios de difracción de Rayos X efectuados por Wilkins. Los resultados obtenidos mediante este tipo de técnicas analíticas indican la presencia de una estructura repetitiva dentro de la cromatina; la cual se caracteriza por exhibir un diagrama en el que aparece una serie regular de anillos que se repiten a intervalos de aproximadamente 100 \AA (128,129).

La eliminación por medios químicos de las histonas asociadas con el ADN lleva a la desaparición del diagrama de difracción. Estos hechos permitieron a Wilkins proponer un modelo de estructura en el cual las histonas envolvían a la molécula de ADN determinando el enrollamiento sobre si misma y la adopción de una conformación en superhélice (129).

El refinamiento de la difracción de neutrones ha permitido reafirmar los datos de Wilkins y precisar la participación de cada componente de la cromatina; así como el tamaño y la forma del nucleosoma (109,129).

b) Digestión con endonucleasas.

Una evidencia diferente a la anterior fue observada -

por Hewish y Burgoyne (1973) al incubar núcleos de hígado de rata con una enzima endógena para fraccionar el ADN en múltiplos íntegros de una unidad de longitud de aproximadamente 200pb (130). Noll (1974) demostró el mismo resultado al digerir ya sea el núcleo o la cromatina aislada con una nucleasa micrococcica (131). Cuando el ADN digerido es aislado y separado por electroforesis en geles de acrilamida se obtiene una serie de bandas, cuyo tamaño sugiere un grupo de múltiplos y submúltiplos, con un monómero de 200 pb y dímeros y trímeros de 400 y 600 pb (31).

La nucleasa micrococcica y la endógena de hígado de rata introducen rupturas a la doble hélice del ADN; los efectos similares de estas dos enzimas implican que la producción de series multiméricas refleja algunas características intrínsecas de la cromatina nuclear que son mantenidas durante su extracción y no como consecuencia de una actividad enzimática particular (31,128).

Las partículas más pequeñas (200pb) representan nucleosomas y deben tener la longitud del monómero pudiendo concluirse que el "duplex" de ADN debe ir de un nucleosoma al siguiente y es susceptible al ataque de nucleasas entre las partículas (31,112).

c) Visualización de la partícula.

Las subunidades de la cromatina fueron visualizadas por microscopía electrónica como partículas discretas por Olins y Olins (1974) al observar núcleos lisados en interfase por la técnica de extendido en soluciones amortiguadoras de baja concentración salina. Las fibras de cromatina forman partículas esféricas con un diámetro aproximado de 6-8 nm unidas por filamentos de 1.5 nm de diámetro. Estas partículas fueron lla-

masas cuerpos γ (nu) y tienen apariencia similar en cromatina nativa y en cromatina que ha sido reconstituida a partir de sus componentes. Racimos de cuerpos γ , los cuales no pueden resolverse con la técnica empleada dan aspecto de fibras de 10-12 nm y 22-24 nm (31,109,132).

Un estudio detallado de la naturaleza de las partículas efectuado por Oudet y cols., quienes las llamaron "nucleosomas" las describe como masas empacadas compactamente cuando se observan a partir de núcleos lisados. Sin embargo, si las histonas ricas en lisina (H1) se han eliminado de la cromatina pueden verse los nucleosomas dispersos como "cuentas de un rosario". El filamento que las une es ADN como lo demuestra la digestión con la nucleasa micrococcica (31,133).

La presencia de nucleosomas en cromatina libre de H1 implica que las histonas ricas en lisina no forman parte integral de la partícula. Este dato es confirmado por el análisis de las histonas presentes en el nucleosoma y por los estudios de reconstitución a partir de las histonas presentes (H2A, H2B, H3 y H4) empleando adenovirus y ADN del fago lambda, lo que además demuestra que no hay especificidad de secuencia para la formación de la partícula. Los nucleosomas se forman in vitro sólo en presencia de H2A, H2B, H3 y H4 y no se requiere H1 ni proteínas no histónicas (31).

B. Estructura del Nucleosoma.

a) Conformación de las histonas.

Los componentes del nucleosoma fueron inferidos por Kornberg (1974) a partir de las propiedades de los complejos de histonas obtenidos cuando estas proteínas eran extraídas de

la cromatina y separadas en columnas de Sephadex. Las histonas H2A, H2B, H3 y H4 se encuentran en cantidades equimoleculares, en cambio la cantidad de H1 es la mitad de las anteriores. H3 y H4 se encuentran formando generalmente tetrámeros y H2A y H2B constituyen dímeros (134).

Estequiométricamente 100 pb de ADN corresponden a la suma de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4, por lo que si cada nucleosoma contiene 200 pb deben existir dos moléculas de cada una de estas histonas. Con estos datos Kornberg propuso el primer modelo para la estructura del nucleosoma; un octámero de histonas rodeado por 200 pb de ADN (135).

Este modelo no establecía la interacción de las histonas para formar el octámero. Posteriormente se sugirió una asociación a través de sus estructuras globulares, a partir de 2 tetrámeros formados por una molécula de cada histona, dejando libres las colas básicas para interaccionar con el ADN (Fig. 7)

b) Conformación del ADN.

El nucleosoma aislado a partir de la digestión con la nucleasa micrococcica contiene 200 pb de ADN: esta partícula es inestable y si la digestión continúa puede estabilizarse en una partícula de aproximadamente 140-146 pb, que interaccionan con el octámero de histonas. Este ADN se conoce como "ADN central" (core), siendo su tamaño constante en todas las cromatinas examinadas. El ADN degradable que no se encuentra interaccionando con el núcleo de histonas se llama ADN "de unión" (linker) y su longitud varía de especie a especie (31,102).

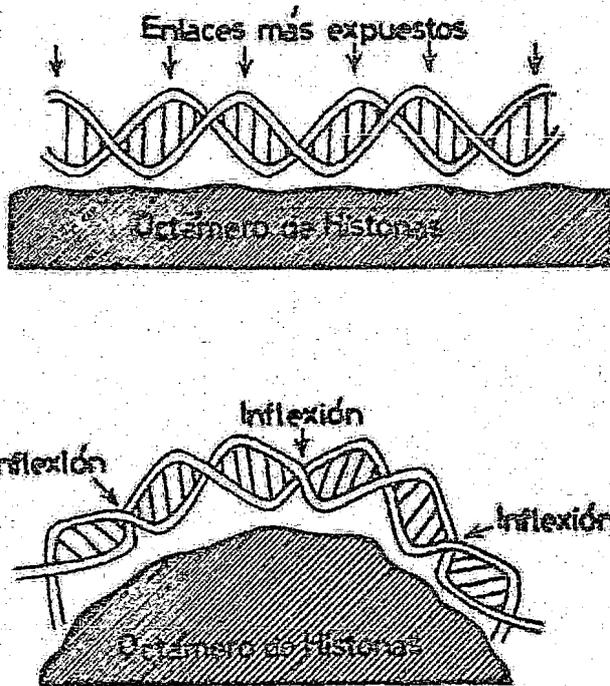


Figura 8. Proyección diagramática de la doble hélice de ADN sobre la superficie del nucleosoma. Las posiciones -- más expuestas son cada 10 pares de bases en cada cadena de la conformación "duplex"

Recientemente se han postulado nuevos modelos para la estructura tridimensional del ADN, siendo el más conocido el modelo "lado a lado" (SES) (fig. 9), que sugiere mayor flexibilidad y una interacción más accesible con el núcleo de histonas para constituir el nucleosoma que el modelo de Watson --- Crick (137,138).

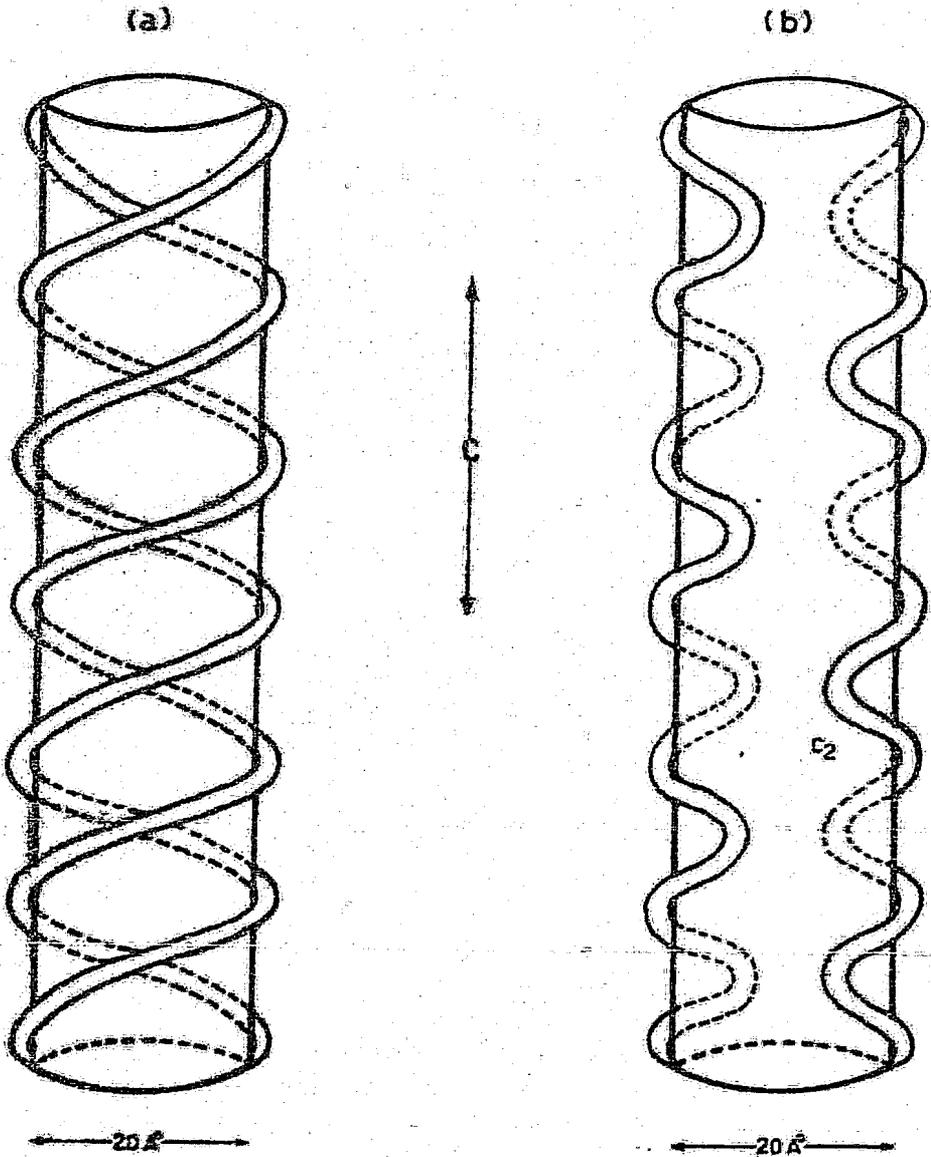


Figura 9. Dibujos idealizados de (a) el modelo elemental de Watson-Crick para la estructura del ADN y (b) estructura elemental lado a lado (SBS); c = largo axial de 1 unidad repetitiva y $C_2 = 2$ veces el eje de rotación perpendicular al papel (137).

c) Estructura de la partícula central (core).

Las partículas centrales son estructuras globulares muy compactas con un peso molecular de aproximadamente 200,000 daltones y una proporción de histonas /ADN de 1.1/1. Los estudios de difracción de rayos X y de neutrones las muestran como esferoides o cilindros cortos con un diámetro de 11 nm y una altura de 5.5 nm demostrando, al igual que los estudios de degradación con ADNasa I, que el ADN se encuentra en el exterior de la partícula. La periodicidad de los sitios susceptibles a ADNasa I permitieron suponer que el ADN deba dar dos vueltas alrededor del núcleo de histonas (109,128).

Las regiones globulares inermes de las histonas parecen estar fuertemente empaçadas y rodeadas por vueltas de ADN, las colas básicas de las histonas deben interaccionar en forma específica con el ADN, produciendo regiones protegidas alternadas con regiones expuestas a ADNasa I. Aún cuando no ha sido demostrado, se considera que la partícula tiene un eje de simetría doble y que las histonas son las únicas responsables de la constricción del ADN para adquirir la superhelicidad y determinan la arquitectura del nucleosoma (109,128).

La resolución del mapa de las histonas es muy baja para poder definir moléculas individuales, pero se ha trabajado en base a la relación del octámero de histonas con la superhelicidad del ADN para interpretar el mapa de histonas en forma individual. Mirzabekov y cols. (1978) localizaron sitios específicos a los largo de la superhélice de ADN que interaccionan con cada uno de los cuatro tipos de histonas con lo cual se puede llegar al arreglo tridimensional de las ocho moléculas (139).

De esta configuración se deduce que el tetrámero $(H3)_2(H4)_2$

define la vuelta central de la superhélice del ADN. Dímeros d (H2A) (H2B) adicionados uno a cada lado del tetrámero producen unión extra de ADN completando la superhelicidad (128). De aquí puede explicarse la existencia de partículas semejantes a nucleosomas formadas únicamente por H3 y H4 (109). En la figura 10 se muestra la estructura de la partícula central de acuerdo al modelo de Kornberg (128).

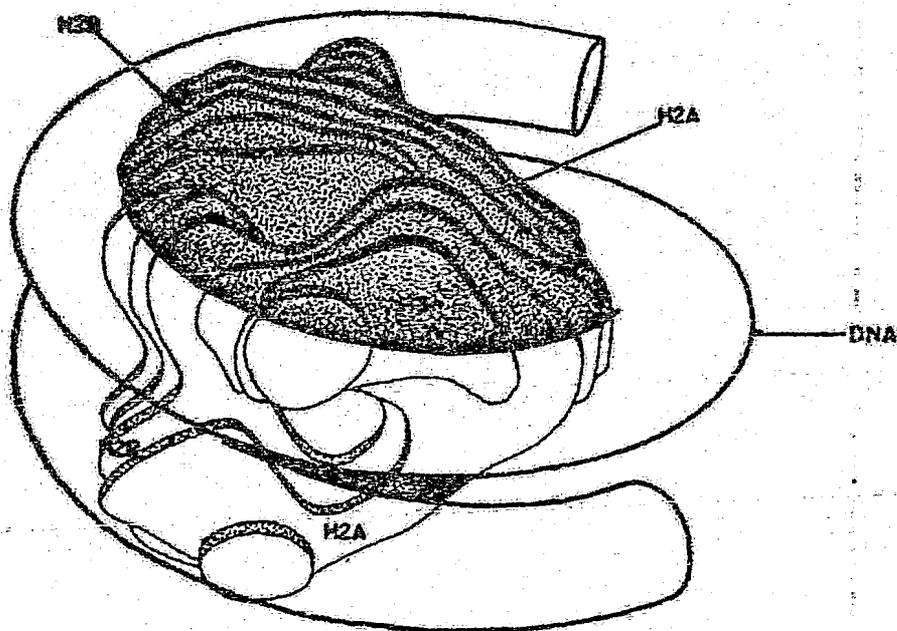


Figura 10. Modelo de la partícula central del nucleosoma (core). El tubo representa la doble hélice de ADN, - se muestra el mapa tridimensional de las histonas y las cubren aproximadamente 146 pb de ADN (128).

El arreglo del ADN en superhélice condiciona la estructura simétrica del nucleosoma dando aproximadamente dos vueltas

alrededor de las histonas en la parte media de la partícula. Las dos vueltas de la superhélice casi deben tocarse, ya que el diámetro de la hélice de ADN es de 20 Å y la altura de la partícula es de sólo 55 Å. Se pueden calcular a partir de esta observación que las dos vueltas del ADN comprenderán -- aproximadamente 160 pb. Sin embargo, el largo del ADN en la partícula central es de sólo 146 pb, lo cual únicamente es suficiente para una y tres cuartos de vuelta, haciendo a la partícula más angosta en un extremo. Las dos vueltas se completan con la participación de H1 (109,128)

d) El nucleosoma. Participación de H1.

El nucleosoma está formado por la partícula central, el ADN de unión y la histona rica en lisina H1. El contenido es tequiométrico de H1 es sólo la mitad, lo que significa que el nucleosoma no tiene un eje de simetría y tiene el potencial de ensamblarse en estructuras polares. Los primeros estudios sugerían que la histona H1 está asociada con el ADN de unión entre las partículas centrales (109). Estudios recientes --- afirman que H1 está localizada en el punto donde entra y sale el ADN de la partícula central. Cuando se estudia cromatina que contiene H1 el ADN parece entrar y salir de la partícula por el mismo punto; en cambio si se extrae H1 los extremos de entrada y salida del ADN parecen estar distanciados uno de otro (111,112,140) (Figura 11). Esta estructura completa las dos vueltas del ADN alrededor del núcleo de histonas al añadir 10 pb de ADN de unión en cada extremo de la partícula.

La histona H1 es una proteína accesoria ya que no se encuentra en el exterior del nucleosoma y no es esencial para el superenrollado del ADN en la partícula. Su función parece estar relacionada con una condensación posterior de la cromatina.

La compactación del ADN en el nucleosoma puede ser expresada por el radio de empaquetamiento, o sea el largo del ADN en el nucleosoma dividido entre el tamaño de la partícula. Esto da un radio de 5 a 7 que corresponde a la organización de 67 nm de ADN en una partícula con un diámetro de 10-12 nm (31).

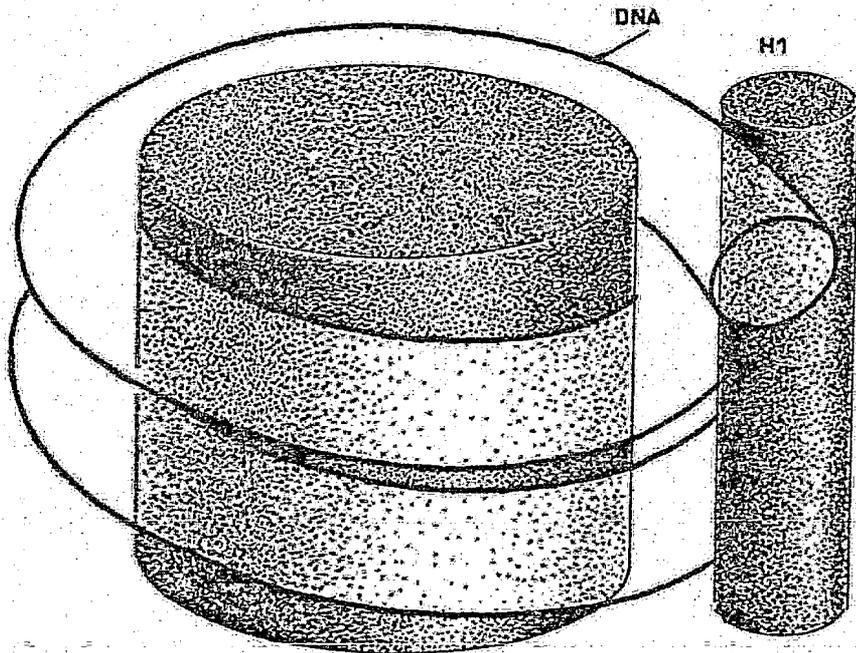


Figura 11. Estructura del nucleosoma, mostrando la participación de la quinta histona, H1. Dos vueltas de la superficie de ADN (166pb) se completan alrededor del octaedro de histonas gracias a la participación de H1, la cual se une a los sitios de la partícula donde entra y sale el ADN (128).

C. Relación secuencias de ADN/Nucleosomas (Phasing).

La principal función del núcleo de histonas es compactar el ADN, por lo que se esperaría que su interacción fuera independiente de la secuencia de nucleótidos. Cualquier molécula de ADN es capaz de formar nucleosomas in vitro, lo cual apoyaría el hecho de que no existan secuencias específicas de unión a las histonas con mayor o menor fuerza (112).

A pesar de que la mayor parte de los nucleosomas están dispuestos al azar, hay evidencias que sugieren que en pocos casos existe una relación fija entre la localización de las histonas y la secuencia de nucleótidos. A este fenómeno se le conoce como "phasing" y este término también se utiliza para designar cierta regularidad en la longitud del espacio internucleosómico o del ADN de unión.

"Phasing" puede ser generado ya sea directamente por especificidad de secuencia de unión al nucleosoma o por alguna propiedad desconocida del mecanismo de ensamblado de la cromatina. El mejor ejemplo para observar esto in vivo son las secuencias repetitivas en "tandem" de los genomas eucariontes ya que si una secuencia repetitiva tiene una longitud de - - 200 pb y hay "phasing", el largo del ADN por nucleosoma deberá ser el mismo que el de la secuencia repetitiva. Esto ha sido demostrado con los ADNs satélite del ratón (112).

Con respecto a la longitud del ADN en los nucleosomas se encontraron diferencias de especie a especie y de tejido a tejido. El largo del ADN que forma la partícula central siempre es el mismo (aproximadamente 166 pb), por lo que la variación se debe al tamaño del ADN espaciador o de unión. Los estudios con ADNasa I demuestran que también en este ADN de - - unión debe tener un número de pares de bases múltiplo de 10.

Se han postulado varias explicaciones para este fenómeno tales como un proceso de recorrido de los núcleos de histonas a través de la molécula de ADN o un proceso dependiente de secuencia, principalmente en función de secuencias repetitivas y de diferencias en su compactación (31,112).

Evidencias posteriores sugieren que nucleosomas adyacentes pueden estar separados por distancias fijas. Por ejemplo, al digerir nucleosomas con exonucleasa III se encontró la formación de una serie moderada de subdímeros; sin embargo este dato no es concluyente pues podría tratarse de dos monómeros excindidos juntos y además en este experimento no se determinó el contenido de H1 en las fracciones obtenidas (112).

D. Interacciones entre nucleosomas. Estructuras de Orden Superior.

Los nucleosomas están empacados en forma regular para constituir las estructuras de orden superior que forman las fibras de cromatina. Las técnicas para visualizar nucleosomas han identificado fibrillas de 10nm y fibras de 30 nm. La observación de una u otra depende del método de preparación empleado. Estudios recientes de microscopía electrónica y difracción de neutrones apoyan la idea de que las fibrillas de cromatina de 10 nm están constituidas por la cadena misma de nucleosomas tomando en cuenta el diámetro de la partícula (112,128). El aislamiento de fibras de cromatina de 30 nm se obtiene utilizando solventes suaves, fuerza iónica moderada y la presencia de histona H1 en el complejo. Experimentos utilizando variaciones de fuerza iónica permiten la interconversión de las fibras, lo que sugiere que la fibra de 30 nm está constituida por una superestructura de la cadena de nucleosomas (31,109,112).

Se han postulado varios modelos para el arreglo de la cadena de nucleosomas dentro de las fibras de cromatina. Estos modelos pueden dividirse en dos grandes grupos: (1) Modelos Solenoidales que sugieren un arreglo continuo de nucleosomas para formar la superhélice y (2) Modelos en supercuentas que proponen un arreglo en subunidades específicas.

Finch y Klung (1976) estudiaron fragmentos de cromatina al microscopio electrónico en presencia de niveles bajos de cationes divalentes y observaron fibras cortas y delgadas en un rango de 30-50 nm de ancho con estriaciones a través de las fibras que sugieren giros paralelos de una hélice. Estas supuestas hélices fueron llamadas "solenoides" (del griego solen, que significa tubo o túnel) y postularon el enrollamiento sobre si mismas de las fibras de 10 nm, teniendo 5-6 nucleosomas por giro de la hélice alrededor de un canal central, los giros sucesivos caen muy cercanamente siendo la distancia centro-centro de aproximadamente 100 Å. Experimentos paralelos de difracción de rayos X y de neutrones apoyan este tipo de estructura y sugieren que la reflexión característica de 10 nm se debe al espacio entre las vueltas de solenoide más que a la distancia centro-centro entre nucleosomas (112, 109, 128, 141, 144).

Thoma y Koller (1979) demostraron que la fibra de 10 nm se encuentra sólo en condiciones de fuerza iónica muy baja y ocurre cuando la cromatina se encuentra en su forma más extendida. Incrementando la fuerza iónica la fibra pasa de un filamento de nucleosomas a una estructura en zig zag y eventualmente a un solenoide (112, 128, 140).

En base a estos estudios se propuso el mecanismo por el cual H1 produce el enrollamiento del filamento de 10 nm en la fibra de 30 nm. Debido a que el ADN entra y sale en sitios -

muy cercanos del mismo lado del nucleosoma las formas intermedias adquieren una apariencia de zig zag. Las regiones de H1 de nucleosomas adyacentes parecen estar proximas en contacto, suponiéndose que por el incremento de la fuerza iónica las moléculas de H1 podrían formar un polímero helicoidal (140).

Este modelo plantea que la interacción entre nucleosomas es extremo a extremo, habiendo contacto entre nucleosomas en cada giro; sin embargo existen otros modelos en los cuales se plantea una interacción a través de los extremos de las partículas centrales con las caras orientadas paralelas o casi paralelamente al eje de la fibra (112,140). En la figura 12 se muestra la formación de la estructura solenoidal de la cromatina.

Los modelos en "supercuentas" se refieren a un arreglo de los nucleosomas en racimos de 6 - 8. Estas estructuras discretas se han observado por estudios de microscopía electrónica y la digestión con nucleasa micrococcica permite su aislamiento (31,109,142). En la figura 13 se muestran algunas de las estructuras de supercuentas propuestas.

Varias de las observaciones propuestas en estos modelos pueden conciliarse con el modelo de superhélice. Por ejemplo, la discontinuidad en la unión de H1 puede reflejar la relativa estabilidad de un giro completo. Por otra parte estas "supercuentas" pueden considerarse como un estado intermedio en la condensación de la fibra (112,145).

Un hecho de suma importancia lo constituye la presencia de H1 para la formación de la fibra de 30 nm. Cromatinas que carecen de H1 presentan bajo ciertas condiciones conglomerados de nucleosomas sin una estructura regular y al parecer estos se forman por interacciones entre las histonas de la partícula central (112,128).

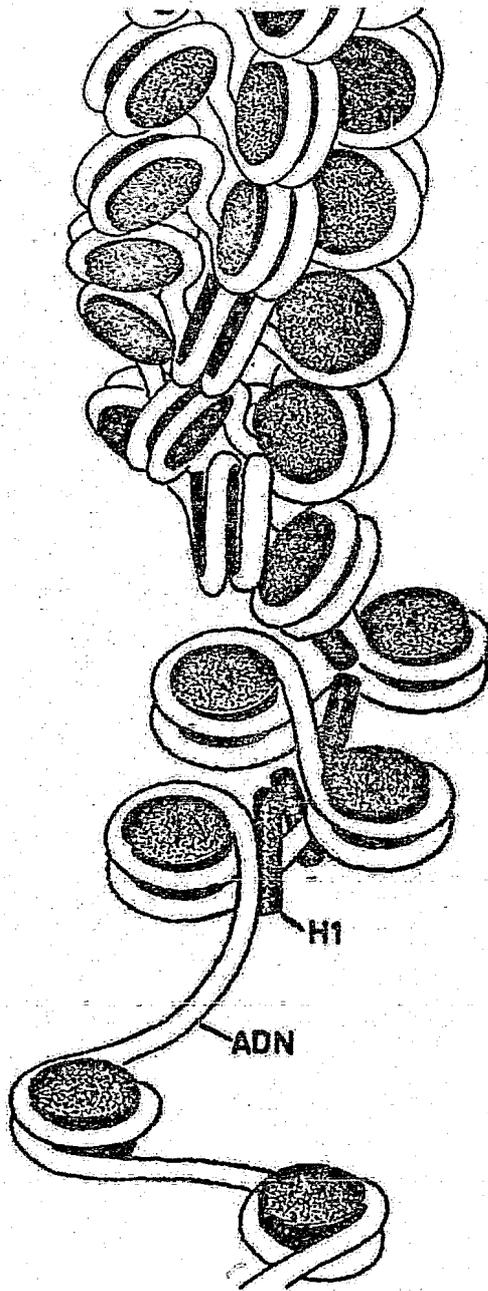


Figura 12. Superestructuras helicoidales. Formación del solenoide a partir de la cadena de nucleosomas por las interacciones entre las histonas, principalmente - por la polaridad que da al nucleosoma la molécula de H1 (128).

Aun cuando se desconoce la localización de las moléculas de H1 en la estructura solenoïdal, estudios con anticuerpos contra H1 sugieren que deben encontrarse en el interior de la hélice (112).

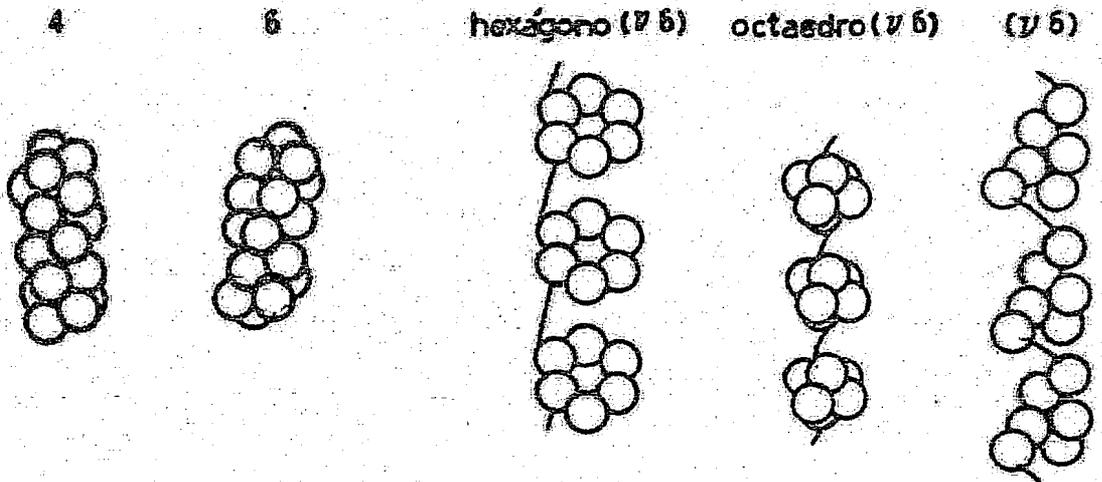


Figura 13. Los nucleosomas se pueden arreglar en diferentes estructuras para formar la fibra básica de cromatina de 20-30 nm. Se muestran ejemplos de hélices y racimos (supercuentas) para formarla (109).

4. CROMATINA EN INTERFASE

A. Estructura de la cromatina en interfase (G_1 y G_2)

La fibra de 20-30 nm es la estructura básica de la cro-

matina en interfase; sin embargo puede sufrir modificaciones en su diámetro y estructura al pasar por sus diferentes estadios. Los principales cambios en esta estructura se observan durante la replicación y transcripción del ADN, ya que debe ser accesible a los complejos enzimáticos que intervienen en dichos procesos.

La cromatina humana en los períodos G_1 y G_2 se encuentra organizada en un arreglo alternado de asas relativamente pequeñas y segmentos extendidos de la fibra de cromatina cuando se observan al microscopio electrónico preparaciones obtenidas por secado de punto crítico. En preparaciones de buena calidad es posible detallar la acumulación de la fibra de cromatina y consiste de una o múltiples configuraciones en asa de varios tamaños con un punto en el cual las fibras parecen caer en forma conjunta. Frecuentemente la fibra se encuentra plegada y cruzándose sobre sí misma en varios puntos los cuales se supone representan entrelazamientos de una gran asa con sólo uno o dos posibles sitios de unión (146). Estos datos concuerdan con el patrón de organización reportado en *Drosophila* por Benyajati y Worcel (1976) quienes demostraron que la longitud continua del ADN de los cromosomas en interfase está organizado en regiones de asas con un orden de 80 kb, probablemente mantenidas en esa configuración por ARN y proteínas. Estos autores también encontraron una organización de nucleosomas por regiones y entrecruzamientos entre la fibra de nucleoproteína en intervalos de 30-70 kb (147).

El número de configuraciones en asa y fibras extendidas por genoma humano haploide es del orden de 8,000 para cada una de ellas. Esta cifra representa un mínimo, pues la cromatina en núcleos extendidos tiende a condensarse en el centro del núcleo formando un gran número de acumulaciones que se extienden hacia la periferia con segmentos largos de fibras extendidas y pocas estructuras en asa (146).

Las fibras de cromatina con estructuras en asa o extendida de células en G_1 y G_2 muestran una apariencia regularmente nudosa. Los nudos tienen un diámetro promedio de 20 nm y dado que 15-18% de la fibra de cromatina es ADN se calcula que cada nudo debe tener 2,000-2,500 pb. Este dato apoya la estructura solenoidal de la cadena de nucleosomas (200 pb), los cuales están arreglados en grupos de 8-10 para formar un giro de la superhélice y dar a la cromatina la apariencia nudosa. Debido a la superficie oblonga y la orientación oblicua de los nudos de cromatina es posible especular que cada una de estas estructuras representa un giro de una estructura helicoidal semidiscontinua, con cromatina extendida a cada lado (143,146,147).

B. Replicación de la cromatina

Dos eventos son necesarios para la duplicación del genoma eucarionte: (1) Replicación semiconservativa del ADN y (2) disponibilidad de proteínas cromosómicas. La síntesis de las histonas está coordinada con la síntesis de ADN, ocurriendo en el período S y en extensión suficiente para duplicar el contenido de la célula, probablemente sus componentes regulatorios y estructurales de proteínas "no histonas" se sintetizan al final de la fase S (31,107).

La replicación se lleva a cabo en gran número de replicones que sintetizan ADN por el movimiento bidireccional de dos horquillas de replicación en dirección $5' \rightarrow 3'$ a partir de un origen central. Replicones diferentes son activados a tiempos diferentes durante la fase S, por lo que las regiones de replicación se visualizan como "ojos" (31).

Durante la replicación semiconservativa las dos cadenas de ADN se separan y sirven como templados para la síntesis de las cadenas hijas. El comportamiento de las proteínas -- histonas del nucleosoma asociadas con el ADN durante este -- evento aún se desconoce, ya que puede ocurrir en la superficie del nucleosoma o ser necesaria su eliminación y posterior reensamblado para dar paso al complejo de replicación. Se han propuesto tres modelos diferentes para explicar el -- comportamiento de las histonas durante la replicación. Por una parte, el octámero de histonas podría ser conservado, las cromatinas hijas contendrían tanto octámeros "viejos" como "nuevos" y su distribución podría ser o no al azar. Alternativamente, el octámero de histonas podría ser parcialmente conservado, posiblemente dividiéndose a la mitad (tetrameros) y posteriormente convertido en un nucleosoma completo por la adición de nuevas histonas, pudiéndose construir varios modelos para relacionar la duplicación del octámero con la replicación del ADN. Finalmente el octámero podría desintegrarse en sus componentes, las histonas entrarían posteriormente junto con las recién sintetizadas a formar el nucleosoma de novo (31).

Al estudiar replicación bloqueando la síntesis de proteínas se demuestra que el ADN es protegido de degradación por nucleasas en la horquilla de replicación y que el ADN recién formado es más sensible a la digestión que la cromatina, pero menos que el ADN puro, por lo que se postula que únicamente contiene 50% del número usual de nucleosomas (31).

Por otra parte existen estudios contradictorios sobre la distribución de los nucleosomas en las moléculas hijas, algunos postulan que estos se distribuyen en ambas moléculas al azar junto con los octámeros recién sintetizados, mientras que otros sugieren que todos los octámeros "viejos" se quedan en

una cadena. Es difícil decidir cual de las dos teorías es la verdadera, pues se tienen múltiples problemas para reconocer el material recién replicado. Utilizando marcadores radioactivos en las histonas, se ha observado que todos los octámeros "viejos" se quedan en las cadenas viejas, mientras que a las cadenas nuevas se unen nucleosomas nuevos (31).

Los octámeros de histonas pueden existir libres, es decir que no requieren de la interacción con el ADN para integrarse demostrando que las histonas son las únicas responsables de esta estructura.

Se han estudiado los rearrreglos que sufren los nucleosomas durante la reparación de ADN dañado por luz U.V. . Es difícil reconocer si el rango de síntesis por reparación es inducido por el rearrreglo de los nucleosomas o si este rearrreglo es consecuencia de la reparación, ya que ambos procesos ocurren simultáneamente. Se ha observado que la síntesis de reparación se lleva a cabo principalmente en ADN de unión, por lo que se postula éste como sitio de iniciación de la reparación y prosigue por rearrreglos hacia el ADN central que va quedando más expuesto. El proceso de ensamblado de nucleosomas en la reparación ocurre en forma más lenta que en la replicación, aunque se asume se lleva a cabo en forma similar.

C. Cromatina en transcripción.

Los estudios de microscopía electrónica, realizados en cromatina en transcripción demostraron que la síntesis de --ARN se localiza principalmente en cromatina dispersa, tal como la cromatina difusa del núcleo en interfase, los "puffs" de los cromosomas politénicos o las asas de los cromosomas - "lampbrush" y en menor grado en cromatina en estructura conden

sada. Al fraccionar cromatina dispersa se sugirió que la cromatina transcripcionalmente activa está enriquecida con - proteínas no histonas, histonas modificadas y ARN naciente y que posee propiedades físicas diferentes de las de las fracciones condensadas o inactivas (109).

El 85% del ADN nuclear está organizado en nucleosomas y se ha demostrado que tanto secuencias de ADN transcritas como no transcritas están organizadas en nucleosomas. Sin embargo la longitud del ADN en los nucleosomas varía de especie a especie y aún en los diferentes tipos celulares de un mismo organismo (de 160 a 240 pb). Aunque se desconoce el origen de esta variación se ha tratado de correlacionar con la actividad transcripcional implicando al nucleosoma en la regulación genética. En base al análisis de genes para ARN ribosomal, ADN complementario a ARN nuclear y ADN satélite de ratón se puede concluir que la longitud del ADN que se - - transcribe y no se transcribe organizado en nucleosomas es la misma, siendo independiente de la secuencia, la longitud de la secuencia repetitiva del ADN satélite del ratón no corresponde a la longitud del ADN organizado en el nucleosoma (245 y 195 pb respectivamente) (149).

Las secuencias transcritas y no transcritas están organizadas en la misma forma en los nucleosomas, por lo que es necesario conocer si en la cromatina transcripcionalmente - activa se encuentran estas estructuras. Inicialmente se había postulado que las histonas de la cromatina podían actuar inactivando a los genes y que era necesaria su remoción o modificación para que dichos genes pudieran ser expresados (129).

Estudios posteriores para determinar si los nucleoso-- mas están presentes en cromatina en transcripción se basan en la visualización de "cuentas" en ADNs en transcripción por

observaciones al microscopio electrónico y por la determinación del tamaño de las secuencias de ADN transcrito por digestión con nucleasa micrococcica (segmentos de 200 pb o sus múltiplos), así como por la susceptibilidad del ADN en transcripción a la ADNasa I.

Los primeros estudios de microscopía electrónica con cromatina en transcripción se realizaron con secuencias codificantes para ARNs ribosomales en *Drosophila* y *Xenopus* encontrándose que el ADN estaba completamente "liso" y sólo en algunas preparaciones se encontraron nucleosomas dispersos; sin embargo cuando estos genes no están siendo transcritos tienen un número normal de nucleosomas. En otras secuencias se encontró que las cuentas están presentes con una frecuencia menor (60-80%) que en las regiones no transcritas (31, - 150).

Los estudios de microscopía electrónica parecen indicar que debe existir en cierta proporción un desplazamiento de nucleosomas. Al estudiar los genes de globina y ovoalbúmina en el oviducto del pollo utilizando nucleasa micrococcica se demostró que los genes activos están organizados en unidades repetitivas de la misma longitud que los genes inactivos. Sin embargo se han encontrado diferencias en la organización de los genes bajo transcripción y los que son potencialmente activos, ya que los nucleosomas de la cromatina en transcripción en el oviducto parecen ser más susceptibles a la nucleasa micrococcica que los divide más rápidamente en partículas individuales que a las de la cromatina inactiva (151).

La mayor susceptibilidad de la cromatina activa puede explicarse por el hecho de que los nucleosomas tengan una conformación más extendida o por una reducción en su número. Sin embargo esto es poco probable ya que si así fuera se es-

peraría una rápida digestión de las secuencias de intervención reduciendo el número de transcritos en el ADN digerido (31,151).

Debido a la suposición de que parte del gen que se va a transcribir se une a la ARN polimerasa durante la transcripción, los nucleosomas deben ser desplazados en o alrededor del sitio de síntesis de ARN, lo cual dificulta determinar la sensibilidad del ADN en esta región a la nucleasa micrococcica. No obstante es probable que cambios transcripcionales también ocurran a nivel de la cadena de nucleosomas (31).

Los estudios con ADN asa I parecen implicar que la conformación de los nucleosomas en la cromatina activa está alterada, llevando a un mayor grado de exposición del ADN en las regiones activas que en las inactivas (109).

Los estudios con nucleasa micrococcica y con ADNasa I apoyan fuertemente la organización de la cromatina activa en subunidades repetitivas que tienen algunas de las propiedades del nucleosoma. Por otra parte se ha comprobado que los nucleosomas activos contienen las cuatro histonas centrales -- aunque no se ha podido precisar su relación estequiométrica. Debido a que se han encontrado también proteínas "no histonas", principalmente del grupo HMG, se ha postulado que quizá algunas de estas proteínas reemplazan histonas para producir las alteraciones conformacionales de los nucleosomas activos (150).

Estudios recientes señalan que la acetilación de las histonas pudiera ser responsable de los cambios conformacionales del nucleosoma activo. Sin embargo existen datos contradictorios al respecto, derivados de estudios utilizando hiperacetilación de histonas (31,151).

Los estudios de microscopía electrónica indican la ausencia de estructuras de orden superior en la cromatina en transcripción, por lo que se supone que la histona H1 no se encuentra en la cromatina activa, ya que esta histona parece ser la responsable del primer orden en la superestructura. Se ha sugerido que H1 es reemplazada por proteínas "no histonas" - adyacentes a nucleosomas activos, probablemente del grupo HMG (109,150).

Las aparentes discrepancias entre los hallazgos de microscopía electrónica y los estudios bioquímicos realizados con ADN ribosomal podrían ser interpretadas como variaciones en las propiedades conformacionales que llevarían a una sucesión de eventos necesarios para la transcripción (31,109).

Estudios in vitro con el minicromosoma de SV40 han permitido caracterizar el complejo transcripcional que contiene la cantidad normal de las histonas en cromatina y si se observa al microscopio electrónico se visualiza la estructura típica de cuentas de rosario. Se ha sugerido que la cromatina activa se encuentra organizada en nucleosomas con la misma estructura que en la cromatina inactiva. Estos estudios aún deben ser demostrados in vivo (152).

D. Orden en el Núcleo.

Dentro del aparente desorden de la cromatina en núcleos en interfase existe cierto orden en su arreglo y se han sugerido varios niveles de organización, así como algunos factores responsables de este orden.

Comings y Okada (1970) y Lampert (1971) encontraron que la cromatina tiene un arreglo ordenado dentro del núcleo. La cromatina en su estado disperso está unida a los complejos

de poro nucleares y especialmente a la "laminilla anular" - (annulus) y esta unión persiste frecuentemente por porciones de envoltura nuclear unidas a la cromatina durante metafase y probablemente telofase. Inicialmente la nueva envoltura nuclear se forma por una cercana asociación de vesículas planas con los cromosomas. Estas vesículas parecen estar -- formadas por una sección de envoltura teniendo una cavidad -- y una membrana exterior y posteriormente convergen en grandes áreas hasta forman una envoltura completa alrededor de -- los cromosomas. Los cromosomas se condensan durante la profase hacia el interior de la envoltura nuclear debido a los múltiples sitios de unión a las laminillas anulares del complejo de poro y son parte integral de la cromatina, tal como lo indica la presencia de lípidos en segmentos de membrana nuclear contenidos en la cromatina (126,153).

Otras observaciones sugieren que el complejo de poro no requiere de membranas nucleares para la unión de la cromatina o para la integridad estructural. Las laminillas anulares permanecen en la cromatina mientras que las partes membranosas son disueltas por detergentes. Los sitios de unión en los cromosomas son específicos en su localización y la posición de estos sitios sugiere que los cromosomas deben estar envueltos por unidades funcionales pequeñas, con un patrón de unión característico. Existen sitios de unión para las laminillas anulares con una distribución aparentemente simétrica en cromátidas hermanas, habiendo una o dos laminillas anulares incorporadas en asas de un cromómero (101).

La unión de cada cromómero tiene significancia evolutiva ya que participa en la distribución de la cromatina de manera ordenada después de la telofase. La membrana forma con las laminillas anulares puntos de iniciación, provee la orientación básica y probablemente algunas fuerzas en el proceso de

transición de telofase a interfase. La membrana nuclear --- podría también proveer a los elementos cromosómicos de una -- unidad funcional especial, el cinetócoro (101).

Recientemente se ha demostrado que una gran parte de la cromatina se encuentra adherida a la membrana nuclear inerte pero que una cantidad aún mayor se encuentra unida a la porción intranuclear de la matriz proteica del núcleo. Probablemente las regiones superenrolladas de la cromatina son -- producidas por su unión a proteínas no histónicas en la matriz proteica. Debido a que la unión parece efectuarse a -- través de sitios ricos en A-T, los cuales corresponden a bandas G o cromómeros, por lo que probablemente estos sitios -- sean mantenidos juntos por su unión a partes de la matriz -- proteica nuclear (154).

Inicialmente se había propuesto que los sitios de unión de la cromatina a la membrana nuclear servirían como sitios de iniciación para la replicación del ADN (126,157). Sin embargo se ha comprobado que estos sitios corresponden únicamente a replicación tardía de ADN. Estos estudios permiten concluir que la cromatina genéticamente inactiva de replicación tardía está condensada en la superficie interior de la membrana nuclear inerte, en la lamina nuclear y alrededor -- del nucleolo, mientras que el ADN genéticamente activo tiene una localización central unido a la matriz intranuclear donde también está asociada con complejos de ribonucleoproteína. Aún debe determinarse si la secuencia del ADN o algunos aspectos de la matriz proteica determinan esta unión (154).

Otro factor que produce un ordenamiento parcial de la cromatina nuclear es el ADN ribosomal asociado con el nucleolo, ya que el número de nucleolos es con frecuencia mucho menor que el número de organizadores nucleolares indicando la

fusión de nucleolos. Por lo tanto estos cromosomas con organizadores nucleolares se encuentran juntos y producen las asociaciones de satélites. Se ha observado que el ADN 5 S - está asociado con el nucleolo lo cual lleva al cromosoma 1 a asociarse con los acrocéntricos que contienen a los organizadores nucleolares (154).

La heterocromatina tiene por lo tanto una localización bien establecida, ocupando una porción definida en el núcleo en relación con la eucromatina. Así cromosomas predominantemente heterocromáticos, tales como los X inactivos tienden a ocupar posiciones periféricas en las preparaciones en meta fase. En el caso del cromosoma Y algunos sugieren que también tiene una localización periférica mientras que otros es tán en desacuerdo (154).

Se ha tratado de encontrar un orden de genes en el núcleo y a nivel de cooperación en sus funciones normales, sin embargo la función normal de un sólo cromosoma humano en las células híbridas ratón-humanas, contradice dicho orden (154).

5. ARREGLO DE LA CROMATINA EN LOS CROMOSOMAS

La fibra básica de 20-30 nm de la cromatina en interfase es la base de la estructura molecular de los cromosomas mitó ticos. El ADN de la cromatina adopta diferentes niveles de enrollado o helicidad: el primario lo constituye la doble hé lice de la molécula de ADN (20 Å), el secundario el filamento de nucleosomas (100 Å) y el terciario la estructura solenoidal (200-300 Å). Este arreglo cromatínico tiene un radio de empaclado del ADN de aproximadamente 50. Dado que en los cro mosomas en metafase el rango de empaclado debe ser entre - -

5,000 y 10,000 son necesarios por lo menos dos órdenes más de compactación de la fibra básica de 20 - 30 nm de la cromatina en metafase.

A. Condensación de la fibra de Cromatina.

La fibra básica de 20 - 30 nm sufre cambios conformacionales por procesos de condensación-decondensación a través del ciclo celular, para producir las diferentes estructuras.

Estudios realizados con cromosomas de condensación prematura (CCP) aportan evidencias de la existencia de un ciclo de condensación cromosómica íntimamente relacionado con el ciclo celular.

Los CCP se obtienen al fusionar células mitóticas y en interfase mediante virus Sendai inactivados con luz U.V., llevando a la transformación del núcleo en interfase en cromosomas discretos bajo la influencia de factores mitóticos. La morfología de los cromosomas dependen del período de la interfase en que ocurra la fusión, por ejemplo en G_1 los cromosomas tendrán sólo una cromátida, mientras que en G_2 consistirán de 2 (155).

La estructura de los CCP en G_1 revela los cambios conformacionales que tienen lugar en la cromatina y al parecer la de condensación de los cromosomas de la telofase mitótica se produce durante G_1 . Este dato se confirma por la mayor sensibilidad que presentan a la luz U.V. (155).

Aún cuando se asumió que la cromatina no podía ser condensada durante el período S, se han reconocido cromosomas de apariencia pulverizada, con regiones no condensadas que -

corresponden a sitios de replicación, lo cual permite visualizar tiempos de replicación en los diferentes cromosomas y comprobar que el último sitio de replicación es el centrómero.

Los CCP en G_2 son extendidos y largos pero muy semejantes a los cromosomas de la profase mitótica. La naturaleza extendida explica la conformación de la cromatina en G_2 cuya condensación se inicia poco después de la replicación y continúa a través de G_2 , alcanzando su máximo en metafase. Este dato representa la existencia de un ciclo de condensación -- cromosómica, el cual está apareado con el ciclo de división celular en los mamíferos (155).

Varios factores han sido involucrados en los procesos de condensación de la cromatina, principalmente a nivel de modificaciones de las proteínas cromatínicas en especial por reacciones tales como fosforilación, acetilación, metilación, -- etc. Entre estas modificaciones la fosforilación de las histonas, primordialmente de H1, es el candidato más favorable para ser el factor regulador de la condensación cromosómica.

Se ha propuesto que la forma fosforilada de H1 puede estar involucrada en la iniciación de la condensación cromosómica o en mantener el estado condensado de la cromatina. Este dato parece improbable ya que en presencia de cloruro de zinc, el cual inhibe a la fosfatasa in vivo y preserva la forma altamente fosforilada de la histona H1 en metafase, no se previene la dispersión de los cromosomas al final de la mitosis. Al parecer la actividad de fosforilación de H1 está relacionada con el inicio mitótico en el ciclo celular y sugiere que la fosfoquinasa de la histona H1 está involucrada en la iniciación de la mitosis. Datos experimentales con una línea celular deficiente en la fosforilación de H1 demuestran que su fosforilación controla los pasos de iniciación de la mito-

sis a través de la condensación cromosómica (113,114,141).

Otro modelo que explica la iniciación de la transición de la cromatina de un estado difuso a uno condensado está basado en un cambio en la conformación de las histonas ricas en lisina. Se sugiere que debido a un incremento en la afinidad de estas histonas por el ADN superenrollado en las partículas centrales en vueltas adyacentes de la estructura solenoidal se genera un nuevo orden de condensación del ADN. Las histonas ricas en lisina se unen preferentemente a regiones ricas en A/T y la distribución de estas regiones sería responsable de este orden estructural. Así se formaría una nueva superhélice en la que la mayoría de los sitios ricos en A/T quedarían en el interior y serían inaccesibles a las polimerasas los sitios promotores ricos en A/T. Estas estructuras de empaquetamiento constituyen únicamente 2% de las requeridas en la transición del estado difuso al condensado (156).

Estudios de ligamiento cruzado entre histonas y ADN seguidos por digestión con tripsina parecen confirmar que las ricas en lisina representan sitios de interacción con el ADN y permiten la formación de estructuras de orden superior a partir de la fibra básica de 20-30 nm que es la única unidad básica para la estructura superior de los cromosomas (157)

Los estudios iniciales para determinar el contenido proteico en células en interfase y en mitosis, no demostraron deficiencias significativas (115). Sin embargo, recientemente se ha observado la desaparición en mitosis de la proteína A24 presente en la interfase. Esta proteína es una forma conjugada de ubiquitina y H2A a través de un puente entre la lisina de la posición 119 de H2A y el aminoácido terminal -COOH de la ubiquitina. Al parecer H2A es convertida en A24

durante la fase G_1 y su disociación es un fenómeno dinámico entre interfase y mitosis. El extremo COOH terminal de H2A es sumamente básico conteniendo grupos amino cargados e imidazol, los cuales deben quedar expuestos en la superficie del nucleosoma. En interfase, la ubiquitina bloquea estas colas, pero en mitosis pueden interaccionar con los grupos fosfato expuestos de las histonas H1 y H3 localizados en su extremo amino. Si A24 está tentativamente distribuida en intervalos regulares a lo largo de la fibrilla de nucleosomas que forma la fibra solenooidal o de supercuentas de 20 - 30 nm, puede asumirse que en cada vuelta un nucleosoma expone la cola cargada positivamente del extremo NH_2 de H2A e interacciona con los abundantes grupos fosfato de H1 y H3 a lo largo de la fibra. En este mecanismo se han implicado dos enzimas, una que libera la ubiquitina de H2A en la transición de fase G_2 a mitosis por lo que el control de la mitosis pueden estar relacionado con la actividad periódica de estas enzimas (122).

Otro factor importante en la condensación de la cromatina y en mantener su estructura compacta durante la mitosis, es la transición reversible de grupos SH en puentes S-S en las proteínas asociadas a la cromatina. Los cromosomas obtenidos en presencia de agentes que reaccionan con los grupos SH, ya sea bloqueando o incrementando la transición - SH-SS adquieren una apariencia menos condensada, su aspecto es nudoso con secciones altamente estrechadas y cromatina con apariencia de una masa de lana o algodón en lugar de las tradicionales formas compactas lo cual apoya la teoría de condensación mediante puentes S-S entre proteínas cromosómicas específicas (158).

B. Modelos de la estructura cromosómica.

Un gran número de modelos han sido propuestos para expli

car como se dobla, pliega o enrolla la fibra de cromatina de 20-30 nm de una manera compacta para adquirir las dimensiones de un cromosoma en metafase. El modelo propuesto por Du -- Praw (1966) conocido como el modelo de "la fibra doblada" ; (Figura 14)) está basado en la estructura visible de cromosomas integros preparados por métodos modernos y tiene las siguientes características: (127)

1. Antes de la replicación en la interfase, cada cromosoma es concebido como una larga molécula de desoxirribonucleoproteína (DNP) en la cual la doble hélice de ADN forma el eje estructural principal. Esta fibra de DNP se encuentra doblada repetidamente y al azar sobre sí misma tanto longitudinal como transversalmente para constituir el cuerpo de la cromátida.
2. Esta cromátida unitaria replica durante el período S en dos o más horquillas de replicación, dando lugar a dos cromátidas unitarias hermanas mantenidas juntas por regiones no replicadas.
3. Durante la profase, los pares de cromátidas unitarias se doblan para formar los cromosomas visibles, las cromátidas hermanas continúan unidas por segmentos mínimos de ADN no replicado, especialmente en la región centromérica. Estas regiones se replican antes de la anafase y se produce la separación de las cromátidas.
4. Durante la profase y metafase las fibras hijas se doblan en forma reproducible de una generación a otra.
5. En telofase las cromátidas condensadas de la anafase se desdoblan reteniendo su posición relativa en el núcleo en interfase posiblemente por unión con la membrana nuclear recién formada.

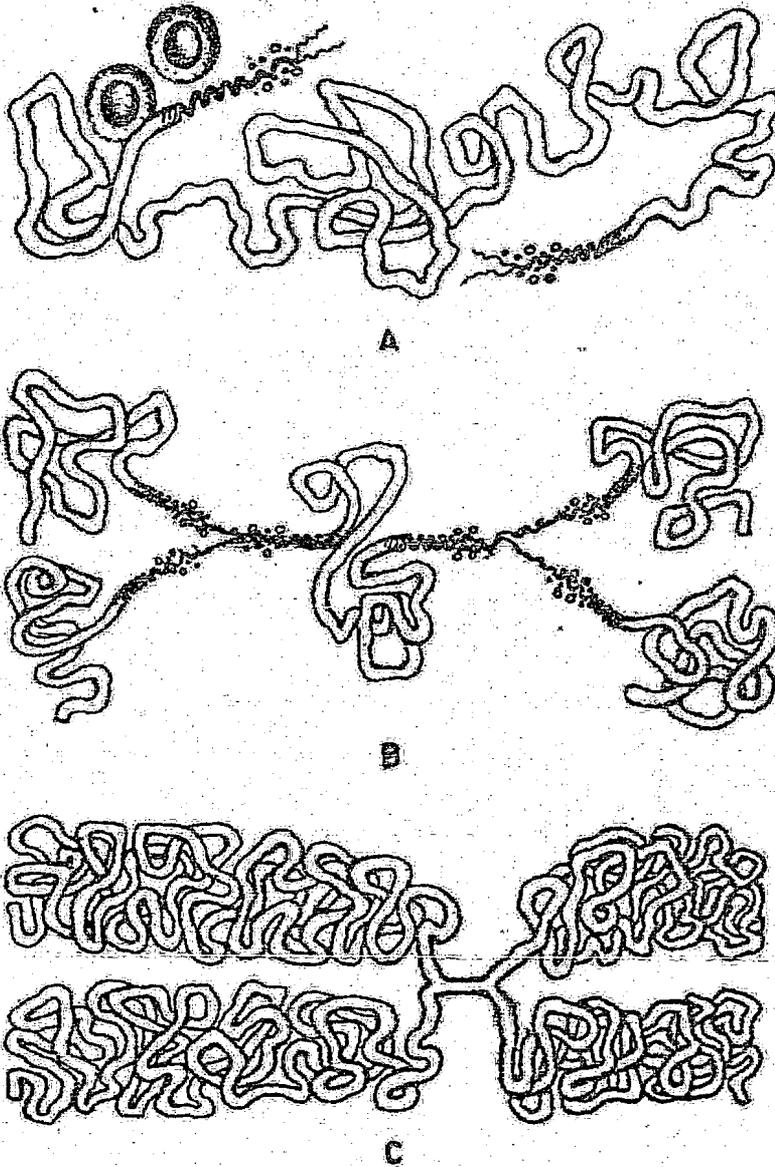


Figura 14. Diagrama ilustrando el modelo de "la fibra doblada" de la estructura cromosómica. (A) Cada cromosoma no replicado (cromátida) es esencialmente una sola fibra de 200-500 Å, la cual contiene a la hélice de ADN superenrollada. (B) La replicación de los cromosomas ocurre en varios sitios a lo largo de la fibra, la ADN polimerasa cataliza la síntesis de ADN en las horquillas. (C) Los segmentos de replicación tardía en el centrómero y otros sitios mantienen unidas las cromátidas (127).

6. Las cromátidas no son necesariamente lineales en organización. El telómero genético no necesariamente corresponde al citológico.

Entre las objeciones a este modelo se encuentra el hecho de que la anafase se inicie con la replicación del centrómero ya que los datos referentes a su replicación tardía no son concluyentes. Por otra parte debido al concepto de que la cromátida no es lineal es difícil reconciliar con este modelo el fenómeno de ruptura y reunión con intercambio de segmentos que ocurre entre cromátidas hermanas durante la mitosis.

El modelo de la fibra doblada es relativamente sencillo para explicar la compleja estructura de los cromosomas mitóticos, pero tiene una gran importancia ya que es de los primeros modelos uninémicos y además ha servido de base para modelos que incorporan los datos más recientes sobre la estructura de la cromatina.

Estudios mediante técnicas de deposición metálica en ángulo agudo muestran que la fibra básica de la cromatina tiene una estructura helicoidal que corresponde a un tercer orden estructural, partiendo de la doble hélice de ADN (159). A partir de observaciones de la desintegración parcial de cromosomas humanos en metafase, se ha propuesto que las cromátidas tienen una organización relativamente sencilla basada en el doblado y enrollamiento de una estructura cilíndrica hueca, regular y larga con un diámetro de aproximadamente 400 nm. Esta estructura cilíndrica o fibra unitaria corresponde al supersolenóide formado por el enrollamiento de la fibra de 30 nm, por lo que la estructura de una cromátida sería un ordenamiento de hélices y el radio de contracción de cada una, en orden ascendente de tamaño sería 7, 6, 40 y 5. Este modelo explica los estimados masa / unidad de lon

gitud y muchas de las características de las cromátidas de los cromosomas mitóticos humanos. En estos modelos la contracción final de la fibra se produce por un enrollamiento regular en asas de la fibra unitaria de 400 nm para dar la estructura condensada del cromosoma (160,161).

En 1977 Bahr propone un modelo de fibra doblada basado en el modelo original de Du Praw y en consideraciones cuantitativas posteriores de las fibras de cromatina y su arreglo en un cromosoma. Este modelo supone que en una cromátida la fibra se dobla de manera que forma un cromómero pasado después a otro, regresa al primero y así sucesivamente como se ilustra en la figura 15. Esta idea se apoya en la estructura de los cromosomas "lampbrush" suponiendo un acortamiento en su configuración. Los cromómeros son por lo tanto acumulaciones de fibras dobladas en asas. Si un cromosoma es extendido en dirección a su eje longitudinal los cromómeros se hacen más pequeños y delgados, en cambio, cuando los cromosomas se contraen aumentan de tamaño y se asocian entre sí hasta que ya no pueden ser distinguidos. La extensión de los cromosomas en forma lateral revela múltiples asas extendiéndose de una cromátida a otra. A partir del principio de simetría y de la mononemia de las cromátidas se supone que todas las conexiones entre cromátidas hermanas, incluyendo el centrómero, son asas mutuamente extendidas a cada cromátida y ancladas en la cromátida hermana opuesta por uniones salinas, puentes disulfuro u otros enlaces proteicos que son disueltos por cambios en el ciclo celular (101).

Aparentemente un cromosoma es una estructura delicada y fácilmente desordenada compuesta exclusivamente de fibras y sus estructuras específicas. Debido a los métodos de extracción de cromatina empleados, el cinetocoro es eliminado por

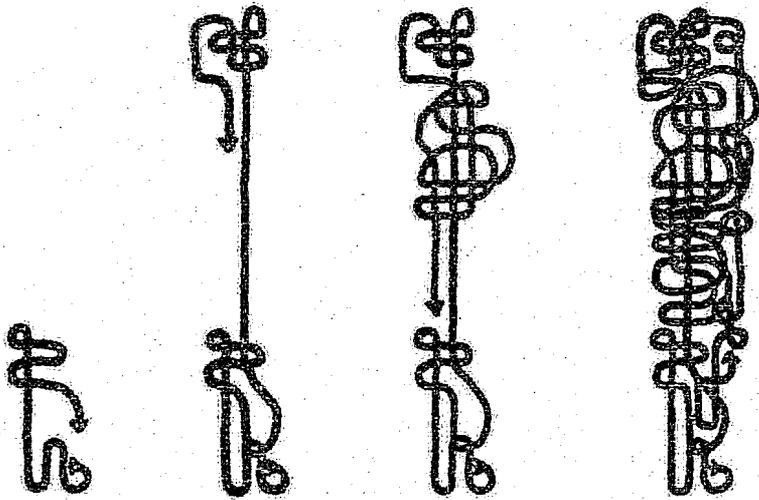


Figura 15. Esquema simplificado del patrón de doblado de la fibra de cromatina a lo largo de una cromátida. Las flechas indican la polaridad de transcripción de la fibra. Modelo propuesto por Bahr (1977)-- (101).

su estructura membranosa rica en lípidos, sin embargo en --- células fijadas con tetróxido de osmio aparece como una es-- tructura laminar osmiofílica. Al parecer cada cromátida --- contiene dos filamentos de cinetocoro los cuales están com-- puestos de un elemento axial denso con un diámetro de - - 20-30 nm (101,162).

Es probable que los "duplex" de ADN recién sintetizados y las fibras de cromatina permanezcan cercanas hasta la con-- densación cromosómica que se inicia en la profase, la cual debe involucrar una separación completa entre las fibras de 3-4 μ m que corresponde a la distancia entre cromátidas-- hermanas. Antes de que la separación ocurra las asas de una cromátida deben unirse a la otra por enlaces proteicos que son disueltos en la anafase. Por otra parte el reconocimien-- to cruzado entre las cromátidas y el establecimiento del asa del centrómero debe servir para que las cadenas que original-- mente eran paralelas den un giro de 90 grados, para quedar - cara a cara y dar la simetría característica entre cromátidas, ya que constituyen imágenes en espejo como se demuestra con los patrones de bandas (101).

En base a la hipótesis de que las proteínas no históni-- cas tienen una función estructural de orden superior, se han propuesto otro tipo de modelos de la estructura cromosómica. Al remover las histonas de los cromosomas en metafase por -- competencia con polianiones de sulfato de dextrán y heparina se obtienen estructuras que sugieren la existencia de un es-- queleto que mantiene la estructura del cromosoma (31).

Adolph, Cheng y Laemmli (1977) encontraron que los cro-- mosomas de células HeLa en metafase mantienen su estructura después de remover las histonas y la mayoría de las no his-- tónicas sedimentan con un rango reducido y tienen un radio -

ADN/proteína de 1:0.16 comparado con el valor de los cromosomas intactos que es de 1:2.2. Las proteínas remanentes representan únicamente el 8% de las proteínas cromosómicas. Estas proteínas deben formar un "armazón" central que conserva el tamaño y forma de los cromosomas intactos al cual se une el ADN. El armazón puede separarse del ADN tratando la cromatina con nucleasa micrococcica antes de remover las histonas y aislarse por gradientes de sacarosa. Al examinarlo al microscopio electrónico se observa una estructura fibrosa con el tamaño y forma de pares de cromátidas intactas. En estas estructuras se encuentra menos de 0.1% de ADN y virtualmente ninguna histona (163).

Paulson y Laemmli (1977) propusieron un modelo en base a la estructura de armazón. Los cromosomas libres de histonas adquieren una forma expandida con asas de ADN de 10 - 30 μ m (30-90 pb) que se extienden a partir de puntos adyacentes a lo largo del armazón central formando un "halo". El armazón parece consistir de una densa red de fibras. En la mayoría de los casos, armazones que tienen la forma de cromátidas hermanas conectadas por el centrómero están unidos únicamente por pocas fibras con una distribución longitudinal similar a la de los cromosomas intactos (164).

Este tipo de modelo concuerda con modelos anteriores para la estructura cromosómica, tales como el propuesto por Stubblefiel y Wray (1971), quienes en base a estudios de microscopía electrónica utilizando cromosomas de Hamster chino sujetos a fuerzas a dilatación sugirieron que cada cromátida contiene 2 cintas formadas por muchas fibras paralelas de desoxirribonucleoproteína enrollada alrededor de un núcleo que contiene 25% del ADN y las asas de "epicromatina" están unidas a lo largo de él (165). Sin embargo los nuevos modelos de estructura en base a un armazón son uninémicos y no polinémicos como los primeros modelos.

Un modelo de asas radiales ha sido propuesto por Marsden y Laemmli (1979) en la cual la fibra de nucleoproteína está doblada en asas arregladas en forma radial a la cromátida, con las bases nitrogenadas como eje central de la cromátida. Este modelo se basa en estudios con cromosomas íntegros dilatados mediante el uso de agentes quelantes para remover las -- cationes divalentes, lo cual incrementa su diámetro y así se observan una serie de asas radiales de la fibra de 10 nm asociadas en la región central. La longitud de las asas varía de 3 - 4 μ m lo cual es compatible con las observaciones en los cromosomas libres de histonas. Los cromosomas tratados con hexilén glicol revelan una estructura radiante simétrica más compacta, en la cual las fibras proyectadas son de aproximadamente 50 nm de diámetro y están probablemente relacionadas con el solenoide de 30 nm por lo que ésta es la forma más compacta de las asas, las cuales continúan atadas al armazón central y darán la estructura final de los cromosomas íntactos en metafase.

Comings y Okada no apoyan el concepto de armazón en los cromosomas debido a que tales estructuras no han sido vistas en muchas de las preparaciones para microscopía electrónica de secciones finas o cromosomas íntegros en metafase, además en los cromosomas parcialmente dispersos las fibras superficiales forman asas laterales mientras que las centrales permanecen compactas. Cuando los cromosomas son expuestos a cualquier manipulación adicional las fibras centrales tienden a arracimarse y dar la impresión de núcleos centrales (115,167). Estos autores realizaron dos estudios para demostrar que el armazón proteico no existe, por una parte utilizaron tinciones proteicas para examinar cromosomas aislados y células mitóticas encontrando que al usar tinción regresiva con EDTA se tiñen partículas de ribonucleoproteína en la periferia de los cromosomas pero no en su parte central y al teñir con áci

cido fosfotúngstico se ven únicamente las placas del cinetocoro. Además los cromosomas aislados fueron dispersados parcialmente para disminuir las altas concentraciones de cromatina en el centro del cromosoma, tratándolos con acetato de amonio 4M o NaCl 2M para eliminar las histonas y dispersar el ADN. Bajo estas condiciones no se observó ningún armazón cromosómico por lo que concluyen que se trata de un artefacto resultado de la dispersión incompleta de la cromatina central y de la agregación de proteínas "no histonas" en cromosomas libres de histonas (167).

Las observaciones de microscopía electrónica concuerdan con lo encontrado por Marsden y Laemmler (166), pero difieren en la interpretación de la estructura central. Si las rosetas que pueden observarse en la cromatina son reales y son mantenidas juntas por proteínas "no histonas", se podría visualizar una estructura en la cual la base de las rosetas se congrega en el centro del cromosoma y las asas son periféricamente radiales. La otra alternativa es que conforme los cromosomas condensan las bases nitrogenadas de las asas, se encuentren en cualquier lugar dentro de un cromosoma y no en la posición central. Dependiendo de la distancia interesada se formarían cromómeros cada vez más grandes, que resultarían en los típicos patrones de bandas en metafase y la condensación final llevaría a cromatina altamente condensada en el centro y asas periféricas, lo que permite proponer un modelo de asas cromoméricas (167,168).

Existen básicamente tres tipos de modelos para la estructura de los cromosomas en metafase: (1) los cromosomas con un núcleo central de proteína manteniendo la continuidad lineal del cromosoma; (2) cromosomas donde la continuidad lineal es mantenida únicamente por el ADN y (3) algunos intermedios en los cuales la asociación de algunas proteínas (histonas o "no

histonas) ayudan a moldear el cromosoma, aunque la continuidad es mantenida por el ADN.

En base al trabajo de Okada y Comings (1967) el primer tipo de modelo puede ser descartado y por otra parte es difícil diferenciar entre los modelos del segundo y tercer tipo ya -- que en los cromosomas "lampbrush" la integridad cromosómica -- es sensible a ADNasa I pero morfológicamente algunas regiones sugieren una agregación de asas adyacentes.

Es importante señalar que los modelos descritos sólo se refieren a estructuras generales de los cromosomas como el -- nucleosoma, la fibra solenoidal o los últimos niveles de organización en los modelos propuestos. Sin embargo, también -- existen estructuras específicas dependientes de secuencias -- de nucleótidos. Estas estructuras son puestas de manifiesto por la presencia de patrones de bandas específicos en cada -- cromosoma, lo cual sugiere estructuras de orden superior diferentes. Las implicaciones de estas observaciones para la estructura de los cromosomas se discuten en el capítulo siguiente.

V. CORRELACION ENTRE LOS DIFERENTES PATRONES DE BANDAS Y LA ESTRUCTURA CROMOSOMICA.

Cuando se observan al microscopio óptico, cromosomas fijados, en metanol-ácido acético 3:1 y teñidos con Giemsa, se ven como estructuras cilíndricas compactas pudiendo identificarse únicamente el centrómero, las constricciones secundarias y los satélites citológicos. Estas estructuras no permiten obtener ninguna información acerca del arreglo del ADN y las proteínas que forman la cromatina.

El descubrimiento de nuevos procedimientos de tinción capaces de producir patrones específicos de bandas a lo largo de los cromosomas, permiten su identificación individual, lo cual facilita los estudios de mapeo y la detección de padecimientos genéticos producto de aberraciones cromosómicas. Desde un punto de vista básico las bandas deben originarse por variaciones locales y reproducibles de la ultraestructura del cromosoma, ya que tratamientos con reactivos diferentes son capaces de producir esencialmente el mismo patrón de bandas.

A pesar de que se sabe poco acerca de la estructura y origen de las bandas cromosómicas varios tipos de modelos han sido propuestos para tratar de explicarlas. Existen modelos que sugieren que las bandas son el resultado de diferencias en la distribución del material cromosómico y representan concentraciones de ADN producidas por un empaquetamiento más compacto de la fibra de nucleoproteína. Otros modelos proponen que las bandas representan regiones que poseen o carecen de ciertas secuencias de ADN o regiones con concentraciones extremas de bases (ricas en A-T o ricas en G-C). Por último se ha planteado que las bandas son resultado de variaciones

en las asociaciones del ADN con las proteínas cromosómicas, preferentemente con las "no histonas" (31).

1. MECANISMOS DE PRODUCCION DE BANDAS.

Los principales reactivos utilizados para generar bandas son los fluorocromos quinacrina y mostaza de quinacrina, así como la mezcla de colorantes químicos de Giemsa. El patrón de bandas visualizado por fluorescencia es conocido como bandas Q y el que se produce después de tinción química como -- bandas G. Ambas técnicas requieren poca manipulación de los cromosomas y los patrones de bandas obtenidos con casi idénticos entre sí. Bajo ciertas condiciones la tinción con -- Giemsa pueden usarse para producir bandas R cuyo patrón es -- exactamente el reverso de los Q y G. Los tratamientos severos de los cromosomas y la tinción con Giemsa llevan a producir bandas C en las cuales sólo los centrómeros tienen intensamente. Mediante tratamientos diferentes pueden obtenerse otros patrones de bandas tales como las bandas T (telómeros) o las bandas NOR (regiones de organizadores nucleolares).

Desde el punto de vista de la estructura cromosómica de be cuestionarse cuáles son los efectos de los diferentes tra tamientos para producir los variados patrones de bandas; es decir, con qué nivel de la estructura cromosómica interaccio nan y qué tipo de estructuras o arreglos de la fibra de cro matina son puestos de manifiesto por los diferentes reacti vos para producir las bandas.

A. Acción de los colorantes fluorescentes.

La quinacrina (Atebrina) es un colorante de acridina, el cual fue usado como agente antimalárico durante la Segunda --

Guerra Mundial y continua teniendo un uso limitado como agente antiprotozoárico. Su acción antimalárica está basada en su capacidad de combinarse con el ADN y bloquear la síntesis de ARN. Los colorantes de acridina tales como la quinacrina o la mostaza de quinacrina se combinan más fuertemente con el ADN nativo que con el ADN depolimerizado. La unión es independiente del pH en el rango de 3.7 a 7.4 (21).

Los colorantes de acridina y fenantrina (bromuro de etidio) se combinan con el ADN por al menos dos tipos de procesos. El primero mediante intercalamiento de los sistemas -- planos de tres anillos entre pares de bases adyacentes en la doble hélice del ADN con uno de los grupos básicos activos -- contiguo a un radical fosfato libre. Esto hace del ADN una molécula más larga. La máxima cantidad de colorantes de acridina que puede ser unida por intercalamiento es de 0.44 moléculas por par de bases (una molécula de quinacrina por 3.8 nucleótidos) lo cual es justamente la cantidad esperada si el intercalamiento ocurre al azar y los espacios adyacentes entre pares de bases no pueden ser ocupados (21).

El número de sitios de unión disponibles para intercalamiento es menor en desoxirribonucleoproteína que en ADN. Si las proteínas se remueven, especialmente la fracción que contiene a H1, la cantidad de colorante que puede unirse se incrementa. A pesar de que el intercalamiento requiere de una estructura de doble hélice, ADN denaturado por calor y enfriado puede unir bromuro de etidio y colorantes de acridina al igual que el ADN nativo. El intercalamiento de estos colorantes es bloqueado por cationes divalentes como el Mg^{2+} , que interaccionan con los grupos fosfato (21).

El segundo método de unión de los colorantes de acridina al ADN involucra la unión adicional de moléculas de colorante

en la superficie de la doble hélice por interacciones electrostáticas con grupos fosfato cargados negativamente que se encuentren disponibles. En el caso de la quinacrina, la parte involucrada es la cadena alifática diamino lateral lo cual da como resultado la estabilización del ADN de doble hélice (21).

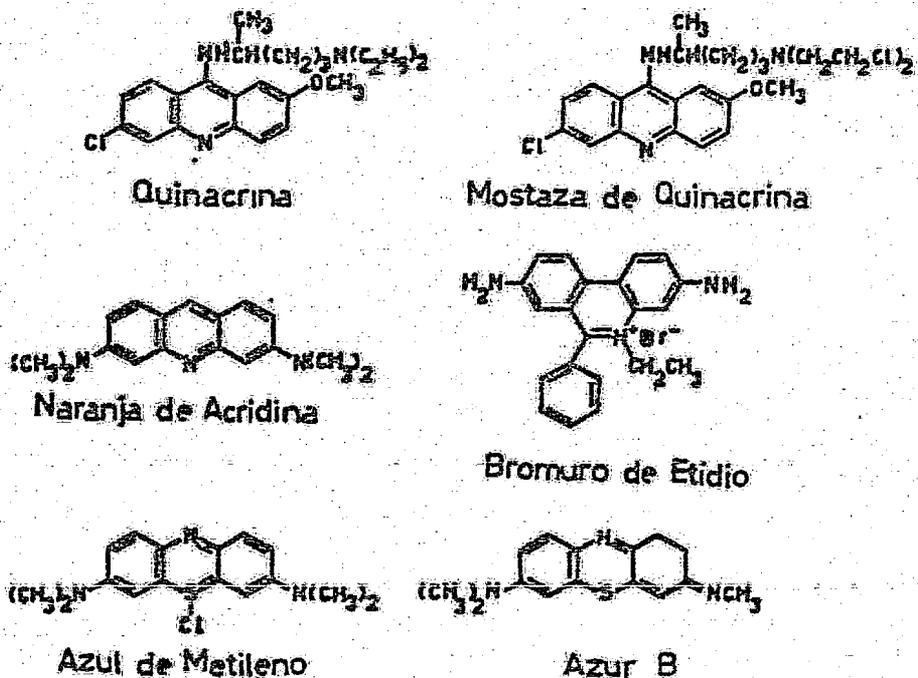


Figura 16. Algunos colorantes básicos que se unen al ADN (21)

No existen evidencias de que los colorantes de acridina, en particular la quinacrina, se unen significativamente a otros componentes cromosómicos. La fluorescencia de los cromosomas fijados teñidos con mostaza de quinacrina es abolida por el tratamiento con ADNasa pero no por el tratamiento con

ARNasa o por la remoción de las proteínas histonas (21).

La mayoría de los colorantes de acridina y fenantrina son fluorescentes y retienen esta propiedad cuando se unen al ADN. Presumiblemente la fluorescencia de la quinacrina y de colorantes similares es dependiente de la naturaleza de doble hélice del ADN (169). La interacción de los colorantes con el ADN o polinucleótidos sintéticos puede producir alteraciones significativas en la fluorescencia al intercambiarse en el ADN mientras que en el caso de la quinacrina la fluorescencia puede ser enmascarada por la composición de bases (21).

B. Bandas Q.

Casperson y cols (1970) fueron los primeros en inducir bandas fluorescentes en los cromosomas humanos. Al teñir preparaciones con colorantes fluorescentes tales como mostaza de quinacrina, dihidrocloruro de quinacrina y otros derivados de acridina y observarlos al microscopio con luz U.V. se ven bandas fluorescentes transversas de intensidad variable a lo largo de los cromosomas, lo cual permite su identificación y del cromosoma y, ya que la parte distal de sus brazos largos muestra una intensa fluorescencia lo cual permite su identificación como una masa fluorescente en núcleos en interfase (16).

El razonamiento inicial de Casperson y su grupo al usar mostaza de quinacrina para teñir a los cromosomas fue que la molécula de colorante podría interaccionar preferentemente con el ADN rico en G-C. Posteriormente Weisblum y de Haseth mostraron que in vitro, el ADN rico en A-T incrementa en for-

ma marcada la fluorescencia de la quinacrina, mientras que el ADN rico en GC la enmascara (168, 169). Estudios con inmunofluorescencia han confirmado estos datos. Moléculas de fluorocromos conjugados con inmunoglobulinas anti A dan patrones semejantes a bandas Q, excepto para el cromosoma Y. Anticuerpos anti G o anti C dan el patrón reverso a bandas Q (21, 170, 171).

Posteriormente Comings, Kovacs y cols. (1975) llegaron a las siguientes conclusiones: (1) la quinacrina se une a la cromatina por interacción de los tres anillos planos con un grupo grande en la posición 9, cayendo en una pequeña muesca del ADN; (2) la mayoría de las zonas pálidas en tinción son debidas a la falta relativa de quinacrina unida y (3) esta inhibición de unión es predominantemente debida a las proteínas no histónicas (172).

Evidencias citológicas para la fluorescencia de regiones ricas en A-T fueron mostradas por Ellison y Barr (1972) en los cromosomas gigantes de la mosca de la fruta Samoia leonensis (173). Sin embargo hay evidencias citológicas que están en desacuerdo con esta hipótesis. Las regiones centroméricas de los autosomas y del cromosoma X en Mus musculus tienen ADN satélite rico en A-T, pero no muestran fluorescencia brillante con quinacrina o mostaza de quinacrina (174). Lo mismo ocurre en las regiones heterocromáticas ricas en ADN satélite rico en A-T de las constricciones secundarias de los cromosomas humanos. Weisblum (1973) sugiere que el ratio AT/GC no debe estar estrictamente relacionado con la fluorescencia, sino que es más importante la relación entre pares de bases y la estructura secundaria del ADN (175).

Comings y Drets concluyeron que un cambio en la composición de bases a lo largo del cromosoma (6% en riqueza de A-T)

era adecuado para incrementar 50% la fluorescencia relativa de la quinacrina. La fluorescencia de la quinacrina cambia con la energía de las cuatro bases del ADN (176). Esta teoría resulta adecuada para explicar la fluorescencia de la quinacrina a todo lo largo del cromosoma y la mayor brillantez de las bandas Q. Cuando éstas son muy brillantes (heterocromatina constitutiva) el efecto de la proteína en el acceso de la quinacrina al ADN debe ser importante. Estudios con quinacrina tritiada sugieren que no hay más colorante unido al cromosoma Y que a los otros cromosomas y no obstante estudios con microanálisis por rayos X sugieren que debe existir un incremento en la cantidad de quinacrina en las zonas más brillantes (168).

Otros autores han sugerido que además de la secuencia y repetitividad de bases, la distribución de las proteínas y el empaquetamiento de las fibras de cromatina tienen una participación importante en la inducción de bandas Q (177). Al parecer las proteínas no histónicas intervienen limitando el acceso del colorante al ADN (178).

Estudios in vitro con el colorante sintético Hoechst 33258 muestran que su fluorescencia es incrementada por ADN rico en A-T produciendo un patrón de bandas semejantes a las bandas Q (176,179). Se sugiere que el colorante se une al ADN por enlaces hidrofóbicos en un amplio surco y no por unión lateral o intercalamiento en el ADN. Además produce alargamiento de la heterocromatina centromérica cuando se adiciona antes de detener los cultivos en metafase. Al igual que con la quinacrina, las proteínas tienen una función menor en el bandeo con Hoechst 33258 (168).

Cuando se comparan los patrones producidos con Hoechst 33258 y con quinacrina se encuentra una diferencia en el com

portamiento de las constricciones secundarias de los cromosomas humanos 1 y 16. Estas regiones son pálidas con quinacrina e intensamente fluorescentes con Hoechst por lo que la correlación de ADN rico en A-T con tinción cromosómica es más satisfactoria ya que estas regiones parecen contener ADNs satélite ricos en A-T (168,180).

La existencia de otros compuestos tales como el 2,2-di-t-butil-proflavina y 4', 6 diamidino-2 fenilindol (DAPI), etc. (tabla 5), los cuales se unen preferentemente a ADN rico en A-T o fluorescen más en presencia de ADN rico en A-T dando patrones de bandas Q (168).

El uso de nuevos fluorocromos que son específicos para cada base proveen evidencias más fuertes de que las bandas intercaladas en los cromosomas están relacionadas con variaciones en la composición de bases a lo largo de las cromátidas. Estas gruesas diferencias en composición de bases pueden explicarse únicamente por repetición parcial de secuencias de ADN. Una banda promedio comprende aproximadamente 10^6 pares de nucleótidos y si este gran segmento de ADN estuviera formado por ADN de copia única se podría calcular un promedio de composición de bases para cada banda cromosómica. Sin embargo se ha comprobado que segmentos ricos en A-T y segmentos ricos en G-C se encuentran alternados a lo largo de las cromátidas (180).

Por medio de una técnica autorradiográfica para estimar la composición de bases de los cromosomas humanos y de segmentos de ellos, se determinaron las proporciones de bases (AT/GC) a lo largo de extensiones de ADN, encontrándose variaciones a lo largo de los cromosomas. Estos datos proveen estimados del contenido de ADN en cada cromosoma o segmento cromosómico y a partir de ellos se observa una correlación -

positiva entre proporción de bases y brillantez. La brillantez de un segmento esta relacionada con la proporción de bases y el contenido de ADN y debe ser consecuencia de su función. Los cromosomas más largos tienden a tener una mayor intensidad de fluorescencia y a ser más ricos en A-T, por lo que se ha sugerido un modelo evolutivo que involucra secuencias repetitivas de una alta proporción de bases y brillantez. Al parecer estas secuencias promueven entrecruzamientos desiguales principalmente entre cromátidas hermanas en mitosis lo cual llevaría evolutivamente a adquirir una longitud en equilibrio. Este tipo de modelo es consistente con la organización cromosómica encontrada en *Xenopus*, en la cual los genes de ARNr 5 S están separados por un número variable de unidades repetitivas de 15pb. También concuerda con la idea de que los segmentos brillantes con quinacrina, los cuales causan efectos fenotípicos leves cuando son trisómicos o monosómicos, contienen heterocromatina intercalar y pocos genes -- (67,181).

Se han reportado correlaciones entre bandas Q y el arreglo estructural de las fibras de cromatina observadas al microscopio electrónico. Al parecer regiones ricas en A-T juegan una importante función en la formación de cromómeros a través de interacciones con las proteínas de la matriz nuclear (168).

C. Bandas R y Bandas T.

Las bandas R o bandas reversas fueron descritas por -- Dutrillaux y Leujeune (182). El patrón de bandas R es inver-- so al de las bandas Q/C. Una modificación de esta técnica -- produce tinción únicamente de los telómeros (Bandas T). Con esta técnica los telómeros se tiñen intensamente por lo que es útil para detectar deleciones y translocaciones de esta región y se producen mediante calentamiento a 87°C solucio-- nes amortiguadoras de fosfatos y tinción con Giemsa o naranja de acridina (168).

El mecanismo de producción de estas bandas no ha sido di-- lucidado, sin embargo, parece ser específico para regiones -- ricas en G-C. Entre las observaciones para esta aseveración se encuentran:

a) Los tratamientos que consistentemente producen bandas R -- son aquéllos capaces de denaturar selectivamente al ADN rico en A-T de las bandas Q/G y dejan en su estado nativo el ADN rico en G-C de las bandas R (168).

b) Los estudios de tinción con naranja de acridina demues-- tran que el ADN rico en A-T denatura más rápidamente que el rico en G-C. El ADN de una sola cadena tiñe de rojo y el de doble hélice de verde con este colorante (168).

c) La verificación de que la composición de bases es el prin-- cipal factor de la producción de bandas R se obtiene del uso de compuestos fluorescentes que se unen preferencialmente al ADN rico en G-C muestran una mayor fluorescencia en su pre-- sencia. Las bandas R pueden ser producidas por antibióticos de cromomicina, tales como la cromomicina A₃, olivomicina

y mitramicina (tabla 5) (168,180,183). Se encontró que si los cromosomas teñidos con cromomicina A_3 se tratan con ADNasa y se tiñen con Giemsa las bandas positivas fluorescentes ahora tiñen oscuras, lo que indica protección de las regiones ricas en G-C por unión de antibiótico (168).

Un aspecto de las bandas R que no está claro es que pueden obtenerse tiñendo con Giemsa debido a que los colorantes de tiazina se unen mejor a ADN denaturado que nativo. Una posible explicación es que a las temperaturas empleadas el ADN denaturado rico en A-T es parcialmente extraído mientras que el ADN nativo de las bandas R no lo es (168).

Los patrones de bandas cromosómicas producidas por ciertos colorantes fluorescentes pueden ser aumentados o modificados por contratinción. Los patrones de bandas pueden ser inducidos por contratinción aún en los casos donde el fluorocromo produce muy poca diferenciación. El principio general de esta nueva metodología es el uso combinado de un colorante fluorescente para el ADN (tinción primaria) y la elección apropiada de la contratinción por unión a ADN de un colorante no fluorescente o fluorescente en una longitud de onda diferente a la de la tinción primaria. Por ejemplo el contraste para los colorantes fluorescentes A-T específicos, DAPI, Hoechst 33258, es muy adecuado si la preparación es contratendida con actinomicina D, un ligando no fluorescente con afinidad de unión al ADN, sin embargo la elección de combinaciones de dos o más colorantes debe hacerse en base a los mecanismos primarios de incremento de contraste e inducción de patrones de bandas que muestran que las propiedades espectroscópicas de los colorantes son variables críticas (184,185).

Varios tipos de tinciones pueden ser utilizados y caen dentro de combinaciones que tiñen: AT/GC ó AT/AT y GC/AT ó GC/GC (tabla 6) (184).

TABLA 5

COLORANTES CON AFINIDAD DE UNIÓN POR UN
PAR DE BASES ESPECÍFICO DEL ADN (184)

Colorante	Especificidad de unión	Pone de ma nifiesto	Absorción max. (nm)	Fluorescencia Max
I Hoechst 3258 DAPI, DIPI	A-T	-	356	465
	A-T	-	355	450
II Quinacrina	lig. G-C	A-T	455	495
Mostaza Quinacrina	alqui-G-C	A-T	Bandas Q	
Daunomicina;	la baja	A-T	505	565
III Distamicina A Netropsina	A-T	-	340	no fluores
	A+T	-	325	no fluores
IV Verde de metilo Verde malaquita	A-T	-	638	no fluores
	A-T	-	626	no fluores
V Cromomicina A3 Mitramicina Olivomicina	G-C	-	430	570
	G-C	-	430	580
	G-C	-	440	532
VI Actinomicina D 7-Amino actinomicina D	G-C	-	455	± no fluoresc
	G-C	-	550	655

TABLA 6

COMBINACIONES DE COLORANTES PARA METODOS DE CONTRATINCION Y TIPO DE BANDAS QUE PRODUCEN (184)

I. Tinción primaria A-T específica con contratinción G-C específica

Colorante fluorescente	Contratinción	Efecto
DAPI	Actinomicina D	Incrementa patrón QFH
Hoechst 33258	Actinomicina D	Incrementa patrón QFH
	7-amino actinomicina D	Incrementa patrón QF
Quinacrina	Actinomicina D	Lig. decremento fluorescencia total y regiones Q polimórficas brillantes
	7-amino actinomicina D	
DAPI	Cromomicina A3	Bandas tipo QFH
	mitramicina	Bandas tipo QFH
Hoechst 33258	Equinomicina	Bandas tipo QFH y parte media distal del Y.
DAPI		

II. Tinción primaria G-C específica con contratinción A-T específica.

Cromomicina A3	Verde metilo	Incrementa bandas R
Mitramicina	Verde malaquita	Incrementa bandas R
Cromomicina	Distamicina A	Incrementa bandas R
	Netropsina	Incrementa bandas R
Olivomicina	Netropsina	Incrementa bandas R
7 amino actinomicina D	Verde de metilo	Bandas R

III. Tinción primaria A-T específica con contratinción A-T específica.

DAPI	Distamicina A	Incrementa bandas C específicas (bandas-DA-DAPI)
DAPI-DIPI	Netropsina	Bandas DA-DAPI
Hoechst 33258	Netropsina	Bandas DA-DAPI
	Distamicina A	Bandas DA-DAPI
Mostaza quinacrina	Netropsina	Decremento bandas QFH (reduce fluorescencia Q o no se afectan bandas QF).
Quinacrina		

Un análisis detallado de los mecanismos de contratinción --- puede contribuir al entendimiento de los mecanismos de bandeó y de la estructura cromosómica. Los mecanismos de aumento - de contraste o de producción de patrones de bandas fluore-- centes pueden ser de dos tipos: por transferencia de energía electrónica de un colorante a otro o por competencia de - - unión directa al ADN. Dependiendo del tipo de colorantes em-- pleados los mecanismos son transferencia de energía de la tin-- ción primaria a la contratinción o bien desplazamiento de la tinción primaria por la contratinción. Con ciertos pares de colorantes ambos mecanismos son operativos con efectos siner-- gísticos (figura 17) (184,185).

Las conclusiones derivadas de los estudios de contratinción son consistentes con la teoría de que las bandas Q/R -- reflejan variaciones complementarias en composición de bases a lo largo de los cromosomas en metafase. Un refinamiento - de esta teoría es necesario ya que la diferencia entre ban-- das Q y R es probablemente debida a cantidades complementa-- rias de racimos de pares de bases A-T y G-C más que a una re-- lación lineal entre la intensidad de fluorescencia de una -- banda y su composición de bases (185).

D. Patrones de replicación del ADN en relación a Bandas Q/G y R

La identificación de áreas de replicación tardía en los cromosomas humanos por incorporación de timidina-³H, seguida por autorradiografía es una técnica citogenética bien esta-- blecida, útil para distinguir cromosomas morfológicamente -- similares (21,186).

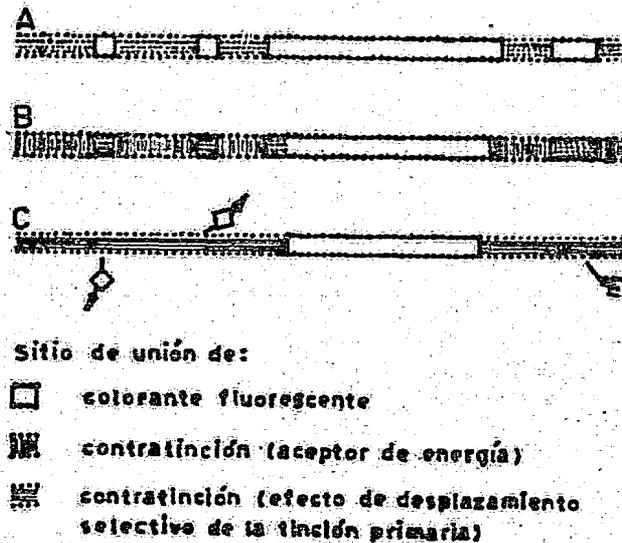


Figura 17. Representación esquemática de los efectos de una contratinción con un ligando al ADN sobre la fluorescencia y unión de la tinción primaria. En este ejemplo se asume que la tinción primaria y la contratinción exhiben especificidades de unión al ADN complementarias A. La tinción fluorescente primaria en ausencia de contratinción B. El contraste fluorescente se incrementa por transferencia de energía de excitación electrónica de la tinción primaria (donador) a la contratinción (receptor) C. El mecanismo principal de incremento de tinción es por desplazamiento selectivo de la tinción primaria.

Cuando el ADN ha sido marcado con timidina-³H durante varios tiempos del período S y es centrifugado al equilibrio en CsCl con ADN-timidina-¹⁴C de cultivos no sincronizados, es aparente que el ADN de replicación temprana es rico en G-C y el ADN de replicación tardía lo es en A-T(168).

Posteriormente, con las técnicas de bandeo, se demostró que las regiones de replicación tardía mostradas por estudios de autorradiografía con timidina-³H en los cromosomas humanos correspondían a bandas Q positivas, mientras que las regiones ricas en bandas R contenían ADN de replicación temprana, lo

cual implica que las bandas Q/G están compuestas de ADN de replicación tardía rico en A-T y que las bandas R corresponden a ADN de replicación temprana rico en G-C (21,168,186).

Los estudios combinados de autorradiografía y bandas mostraron que las bandas R son de replicación temprana y las bandas Q de replicación tardía al correlacionar intensidad de tinción con mostaza de quinacrina y tiempo de replicación dentro de los límites que implica el usar autorradiografía cuya resolución es pobre y muchas veces no llega a definir bandas individuales (21,31,187).

Una técnica que permite la identificación de regiones cromosómicas más restringidas es la incorporación de BUdR y tinción con Hoechst 33258, lo cual produce pérdida de bandas Q y producción de un patrón semejante a bandas R. Variando el tiempo de incorporación de BUdR pueden obtenerse uno u otro tipo de bandas (168,188).

Utilizando pulsos de BUdR pueden identificarse regiones específicas que replican en diferentes etapas del período S. Esta metodología muestra que las bandas R contienen ADN de replicación temprana y las G ADN de replicación tardía (168,186) Dutrillaux y cols encontraron que las bandas R humanas más extensas eran las primeras en replicar, las bandas Q más brillantes las últimas en hacerlo y que tiempos intermedios de replicación producían bandas intermedias. Probablemente hay muy poca sobreposición en la replicación de bandas Q y R. Esto es consistente con la presencia de dos etapas diferentes de la fase S como lo indica el análisis con timidina³H en células diploides sincronizadas (168,188).

Se ha sugerido que las bandas pudieran corresponder a unidades regionales dentro de las cuales están organizados los -

replicones. Se supone que cada banda tiene muchos replicones, probablemente más de 100 y es conocido cuantos de éstos deben replicarse para hacer la banda visible como un segmento replicante. Por esta razón cada banda R debe mantener un número - suficiente de replicones que son activados en varios tiempos tempranos en S y carece de replicones tardíos, ocurriendo lo contrario en las bandas G (31).

Sin embargo, existen evidencias en contra de que las bandas sean producto de tiempos de replicación. Por ejemplo en las células femeninas uno de los cromosomas X replica tardíamente con respecto al otro y ambos presentan el mismo patrón de bandas (31,168).

E. Tinción con Giemsa.

El Giemsa es una mezcla compleja de colorantes de varios grados de oxidación. Basicamente consiste de azul de metileno, azules A, B, C y tionina, los cuales representan moléculas de tiazina con 4,3,2,1 y 0 grupos metilo respectivamente. -- También contiene el colorante ácido eosina, bajo condiciones normales el Giemsa tiñe el núcleo y los cromosomas metacromáticamente produciendo un color violeta rojizo oscuro aún cuando los componentes básicos son más azules. Las tiazinas son moléculas planas cargadas positivamente que interaccionan ioni- camente con los grupos fosfato del ADN uniéndose lateralmente a lo largo de la molécula (21,189). Estos colorantes dan hipocromismo al aglomerarse en torno a las bases del ADN. Esto - resulta en un decremento de la densidad óptica o coeficiente de extinción molar del colorante. Una característica adicional es la presencia de una meseta en el pico de absorción a - longitudes de onda bajas conocida como metacromasia y resulta en un cambio de azul claro (650 nm) a magenta oscuro (560-600 nm).

La presencia de eosina conduce a una ligera disminución de la longitud de onda de este complejo (550 nm). Contrariamente a las suposiciones iniciales (190,191) la eosina no es necesaria para bandas G (192), las cuales pueden ser producidas por azul de metileno o azures. Las mejores bandas son las obtenidas con azul de metileno o azur B. Las producidas por los azures A, C y toluidina son moderadamente buenas. La tionina da la metacromasia más pobre y tiñe a los cromosomas casi uniformemente dando un bandeo muy débil. A pesar de que la eosina no es necesaria, generalmente se obtienen mejores bandas en su presencia. Al parecer la combinación eosina-tionina es importante para la producción de bandas G pH 11, las cuales tienen una coloración más rosada (191,192).

Con exceso de colorante y ADN puro, el radio molar del colorante/grupo fosfato es 1.0 indicando que cuando el colorante está presente en exceso todos los grupos fosfato están unidos a él. En presencia de cromatina no fijada el radio es 0.5-0.6 indicando que aproximadamente la mitad de los grupos fosfato están libres para unirse al ADN y es consistente con la estructura en nucleosomas de la cromatina. En presencia de cromatina fijada con metanol-ácido acético 3:1, el radio es aproximadamente 0.8 ya que la fijación remueve proteínas y libera más grupos fosfato para que interaccionen con el colorante (168,189).

Cuando la cromatina fijada es tratada con sales calientes las proteínas son desnaturalizadas y cubren más eficientemente los grupos fosfato y el radio colorante/grupo fosfato decrece a 0.5 (168).

F. Bandas C.

En 1970 Pardue y Gall notaron que la heterocromatina cen-

centromérica de los cromosomas de ratón, rica en ADNs satélite teñía más intensamente con Giemsa que el resto de los cromosomas, después del tratamiento para hibridación in situ (28). Estas observaciones fueron confirmadas en los cromosomas humanos por Yunis y Yasmineh y por Arrighi y Hsu en forma independiente, suprimiendo el paso de hibridación con ADN o ARN - - (23,29). Con estas técnicas se observó que los centromeros y sus áreas cercanas se tiñen más intensamente que el resto del cromosoma, excepto el cromosoma Y donde la parte distal de los brazos largos es la región que tiñe más intensamente. El tamaño de las bandas C puede variar de individuo a individuo y -- aún entre cromosomas homólogos, por lo que son de utilidad para detectar polimorfismos.

Muchas interpretaciones se han dado para el mecanismo de producción de bandas C. La más popular es la rápida reasociación de secuencias repetitivas de ADN que sugiere que cuando las células en metafase son tratadas con ácido, álcali o alta temperatura en solución salina citratada, el ADN celular es denaturado y renaturado. Se supone que las regiones que contienen ADNs satélite altamente repetitivos renaturan más rápidamente que el ADN menos repetitivo (193).

El estado del ADN después del tratamiento con álcali puede determinarse tiñendo con naranja de acridina, que produce fluorescencia naranja al unirse a ADN de una sola hélice y verde con el de doble hélice. Mediante esta técnica se encontró que el ADN centromérico renatura más rápidamente. Sin embargo, las bandas C pueden producirse en ADN renaturado o de una sola hélice fijado en formalina, lo cual descarta un mecanismo de producción por rápida renaturalización (168,193).

Algunas bandas C heterocromáticas aparentemente no contienen ADN satélite altamente repetitivo y evidencias experimenta

les indican que no existe correlación entre bandas C positivas vs bandas C negativas y ADN de doble hélice vs hélice sencilla (194). El ADN de doble hélice no une más colorante que el ADN de hélice sencilla (168).

Por otra parte ADN aislado de cromosomas o de núcleos después de cada paso del procedimiento muestra que 80% o más del ADN permanece de doble hélice después de la fijación y que 70% o más era de hélice sencilla después del tratamiento con álcali y con 2xSSC (193,194).

Observaciones detalladas muestran que hay pérdida de ADN durante el proceso de bandas C y al parecer la característica asociada a la producción de bandas C es la extracción del ADN de regiones no correspondientes a bandas C y la retención del ADN de bandas C en los cromosomas. Por estudios con radioisotopos se ve que aproximadamente 60% del ADN es extraído durante el procedimiento. Aparentemente la presencia de proteínas "no histonas" que se unen específicamente a la heterocromatina centromérica la protege de extracción con álcalis y sales (194). Además se ha propuesto que el ADN de la región centromérica puede ser más resistente a la extracción por su mayor compactación en estas regiones (168).

G. Bandas G.

A partir de la técnica de bandas C se llegó al desarrollo de las bandas G (195,196). Existen varios métodos capaces de inducir bandas G e incluyen tratamientos con álcalis, detergentes, enzimas proteolíticas, agentes tales como la actinomicina D que se adiciona unas horas antes de la detención del cultivo o tratamientos con ADNasa y tinción con Feulgen (31,197,201).

El patrón de bandas G es muy similar al de bandas Q pero difieren en que con bandas G los centrómeros de casi todos -- los cromosomas tiñen oscuro mientras que la heterocromatina - centromérica generalmente no fluoresce. Lo mismo ocurre con las constricciones secundarias de los cromosomas 1,9 y 16. -- Por otra parte la región distal de los brazos largos del Y -- fluoresce intensamente con bandas Q pero aparece muy pálida con bandas G.

El mecanismo por el cual las bandas G son producidas aún no se conoce con certeza. Inicialmente se cuestionaba si los variados tratamientos producían las bandas o únicamente ponían de manifiesto bandas ya existentes.

La correlación entre bandas C y heterocromatina constitutiva llevo a proponer que las bandas G podían representar regiones heterocromáticas, descritas como heterocromatina intercalar, en base principalmente a los patrones de replicación - (30, 31, 57, 101, 168). Se sugirió que la denaturalización y reasociación de secuencias repetitivas de ADN era responsable de las bandas G de los cromosomas. Sin embargo esto queda descartado ya que tratamientos con reactivos que no interaccionan directamente con el ADN, tales como enzimas proteolíticas pueden producir bandas G y además algunas regiones C positivas - corresponden a bandas G negativas o muy pálidas (193).

Debido a que las bandas G pueden ocasionalmente ser producidas por poco o ningún tratamiento de los cromosomas, ya sea por tinción con Feulgen o por métodos especiales de examinación de cromosomas en G_2 por contraste de fases, microscopía de luz U.V. o microscopía electrónica, se asumió que las bandas están siempre presentes y sólo necesitan ser incrementadas (101, 155, 168). La confirmación de este concepto fue la observación de que el patrón de bandas G corresponde exac

tamente al patrón de cromómeros de los cromosomas meióticos. Debido a que los cromosomas meióticos son siete veces más extendidos que los mitóticos y el apareamiento meiótico incrementa los cromómeros, es mucho más fácil observarlos en paquitene que en la metafase mitótica (31,101,168). Por otra parte el examen de los cromosomas en prometafase o profase y de los cromosomas G_2 llevan a la conclusión de que las bandas en metafase son resultado de la coalescencia de bandas más pequeñas observables en estadios de condensación más tempranos, ya que existen 2-3 mil bandas o cromómeros en profase comparados con 350 en metafase (68,155).

Si las bandas G son producto del incremento del patrón básico de cromómeros aún queda por dilucidar que representan dichos cromómeros y el mecanismo que los pone de manifiesto.

Para ello se propuso una función directa del Giemsa (190,202), sin embargo la mejor forma de ver la influencia de este factor es examinando los cromosomas antes y después de bandeado por tratamientos que no requieren Giemsa. Mediante microscopía electrónica de cromosomas fijados en metanol-ácido acético se encontró que éstos aparecían como cuerpos densos, pero si son tratado con tripsina aparecen bandas densas en electrones e interbandas menos densas (168). Por lo que la aparición de las bandas debe ser resultado de rearrreglos de las fibras de cromatina o pérdida de cromatina de las interbandas. Esto último es poco probable ya que estudios con cromatina marcada con timidina- 3H y tinción con Feulgen indican que la pérdida de ADN con tripsina o soluciones salinas es mínima (168). Las bandas deben ser entonces resultado de rearrreglos de cromatina con una acumulación relativa en el área de bandas oscuras y pueden ocurrir mediante la extracción de Ca^{2+} (168).

Los rearrreglos de la cromatina no son suficientes para

dar bandas de buena calidad. Cuando cromosomas tratado con tripsina se tiñen con Feulgen o tionina no se obtiene una diferenciación adecuada de las bandas, en cambio al teñir con Giemsa se obtienen bandas excelentes. Esto indica que el -- Giemsa tiene una importante función en el incremento de las bandas para ser visualizadas.

Algunos autores han propuesto que la unión del colorante al ADN es limitada por las proteínas "no histonas" (190,202) y que en las bandas G positivas la cromatina puede interaccionar con las moléculas de tiazina (168). La presencia de bandas claras se ha explicado por contener una menor cantidad de ADN o porque el ADN se encuentre cubierto e inaccesible al colorante. La hipótesis de que exista una menor cantidad de ADN se apoya en los siguientes datos: a) La estructura básica de los cromosomas en metafase es de una región densa de cromatina (cromómero) y un espacio intercromérico; b) Los estudios de microscopía electrónica sugieren que la distribución diferencial de la cromatina es incrementada por algunos rearrreglos, c) la tripsina y los tratamientos con sales calientes probablemente extraen algo del ADN intercromómico y d) la distribución de las proteínas en los cromómeros bandeados G, determinada por tinción con cloruro de dansilo iguala a la de las bandas G (168). En cambio, la posibilidad de que el ADN de las regiones de bandas claras sea bloqueado por proteínas parece ser confirmada por el hecho de que los tratamientos de la cromatina fijada con sales calientes producen un decremento en el número de grupos fosfato disponibles para interaccionar con el colorante (183). Presumiblemente el mecanismo es una desnaturalización de las proteínas "no histonas" que son especialmente prevalentes en las bandas R eucromáticas. Bajo condiciones adecuadas estas proteínas forman una estructura terciaria, con sitios limitados para interaccionar con el ADN y una cola denaturada que tiene muchos sitios para establecer --

uniones iónicas con el ADN y cubrir más grupos fosfato al retirar las condiciones denaturantes (168).

Es interesante mencionar que todos los tratamientos capaces de producir bandas G tienen la habilidad de denaturar proteínas o de romper los puentes S-S entre ellas (203).

Los procedimientos de denaturalización de proteínas involucran en la mayoría de los casos la ruptura de los puentes S-S ya sea por reducción o por oxidación y transformación de la conformación nativa de la proteína conteniendo un alto porcentaje de estructura helicoidal a una conformación de colas al azar. Esta transformación la producen tratamientos con ácidos, álcalis o temperaturas elevadas y la remoción de enlaces no covalentes por detergentes iónicos o no iónicos. La digestión con tripsina produce la ruptura de enlaces peptídicos, cuyo grupo carboxilo es donado ya sea por lisina o por arginina. La ruptura de un aminoácido específico se establece cuando los grupos ε amino de la proteína son bloqueados y la digestión ocurre únicamente en residuos de arginina, y puede actuar sobre histonas y otras proteínas ricas en arginina y lisina que interaccionan con el ADN de la cromatina produciendo colas de proteína denaturada (201).

Aparentemente las características físicas del ADN (repetitividad, composición de bases y estructura secundaria) pueden determinar unión diferencial con las proteínas y otros compuestos. Estos tratamientos apoyan al concepto de que la conformación ultraestructural es la base de las similitudes en los patrones de bandas obtenidos (57,101,193).

En base a estudios de microscopía electrónica parece que los patrones de bandas se forman por la interacción de tres diferentes factores: 1. Discontinuidad estructural a lo largo

las cromátidas; 2. diferencias químicas en la distribución de bases del ADN y 3. interacciones ADN/proteínas "no histonas" (101).

En conclusión : las bandas G ocurren debido a la estructura cromomérica básica de los cromosomas en metafase, la cual espera únicamente ser incrementada. Este incremento ocurre por la inducción de diferentes grados de rearrreglos de las fibras de las bandas R hacia las bandas G (posiblemente por extracción de ADN de las bandas R) y por la interacción de proteínas "no histonas" denaturadas que cubren el ADN de las bandas R. Esto es seguido de un marcado incremento de estos patrones por la habilidad de los colorantes de tiazina para unirse lateralmente al ADN disponible (168).

H. Bandas NOR

Las regiones de organizadores nucleolares (NORs) pueden ser teñidas específicamente por métodos con plata (204) o por el método llamado bandas N (205). En el hombre el ADN ribosomal está localizado en las constricciones secundarias de los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos (52,54,55,59). Estos sitios son teñidos por los métodos de bandas N y de -- impregnación argéntica. La tinción con plata es positiva en células mitóticas sólo en los NORs que fueron funcionales durante la interfase anterior (206,207).

Diferencias individuales en el número de NOR tinción -- Ag-positiva han sido reportadas (55,208).

Se ha demostrado que la tinción de bandas N y de NOR en los cromosomas en metafase es negativa después del tratamiento con tripsina o pronasa pero continúa siendo positiva al ex --

traer los ácidos nucleicos (207). Los tratamientos con ARNasa o ADNasa no eliminan la tinción con Ag de los NORs en los cromosomas mitóticos lo cual sugiere que la tinción involucra proteínas (55,207).

Observaciones de microscopía electrónica y de microscopía de luz demuestran que las sustancias teñibles con plata son componentes proteicos del complejo de ribonucleoproteína que rodea a los NORs y no una parte del cromosoma mismo. Se postula que el componente no histónico de la ribonucleoproteína de los NORs es teñible sólo en estado activo descondensado y la tinción en metafase puede ser correlacionada con escasa condensación de las constricciones secundarias que estuvieron activas (207).

La existencia de diferencias individuales en los patrones de tinción con plata se ha tratado de correlacionar con la cantidad de ADN ribosomal. Al parecer, las intensidades de tinción se deben tanto a cantidad de ADNr como a su habilidad para activarse y por consiguiente a la cantidad de material teñible con plata, el cual es acumulable durante la interfase (207,208).

La frecuencia de asociación entre los cromosomas acrocéntricos puede correlacionarse positivamente con la cantidad de material teñible con plata en la constricción secundaria de estos cromosomas (55,206).

Los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos humanos exhiben una gran variabilidad. En general consisten de un segmento proximal, el tallo del satélite y los satélites. Por comparación de tinciones con DIPI y mitramicina, se puede obtener información adicional de la organización de los brazos cortos. Las regiones no teñidas después de tinción con DIPI o

quinacrina parecen ser los tallos de satélites y cuando se tiñen con mitramicina se observan dos regiones diferentes - Un segmento proximal fuertemente fluorescente y una parte - distal que continua siendo opaca. El segmento distal contiene muy poco ADN como lo demuestra la tinción con Feulgen. Al utilizar tinción argéntica para localizar la región NOR, el precipitado queda en la región opaca dejando libre la región fluorescente con mitramicina. Esta porción está sujeta a polimorfismos, y puede estar ausente o haber gran acumulación de material. Ocasionalmente dos regiones NOR activas, separadas por material rico en G-C pueden observarse en el - brazo corto de los cromosomas acrocéntricos (180). Un diagrama de la región NOR en los cromosomas humanos se muestra en la figura 18.

I. Función de las proteínas cromosómicas en la producción de bandas.

La mitad del ADN de los cromosomas y cromatina intactos está unido a proteína. El ADN no protegido puede ser digerido por ADNasa o protegido contra este tratamiento por combinación con moléculas de polilisina. Aparentemente las proteínas cromosómicas bloquean la unión de algunos colorantes básicos al ADN y es posible que el bandeo observado después de tinción con algunos fluorocromos u otros colorantes básicos refleje - el patrón natural de las proteínas unidas al ADN (21).

Al parecer, las proteínas cromosómicas o la interacción ADN/proteína tienen una función importante en los mecanismos de producción de bandas G, R y C. Esta interacción no es necesaria para la producción de bandas Q.

Teóricamente las técnicas de bandas pueden producir dife

rentes efectos o una combinación de ellos en las proteínas cromosómicas: (1) pueden no tener ningún efecto sobre ellas; (2) pueden extraer o solubilizar parte de las proteínas cromosómicas; (3) las proteasas pueden romper algunos de los enlaces peptídicos en las proteínas cromosómicas, produciendo péptidos de bajo peso molecular; (4) pueden denaturar parte de las proteínas a lo largo de los cromosomas. Por otra parte es necesario distinguir si están involucradas proteínas histonas o no histónicas.

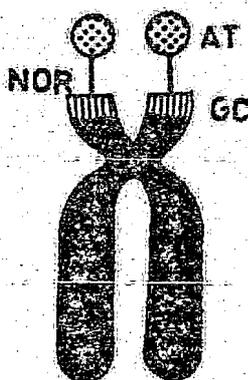


Figura 18. Representación esquemática de la región NOR en los cromosomas humanos. La región NOR está --flanqueada por los satélites ricos en AT y material rico en GC en la porción proximal al --brazo corto (180).

a) Histonas:

La función de las interacciones histona - ADN en la organización del nucleosoma, en la estabilidad del nucleofilamento de cromatina (135,143,147) y en las estructuras y complejos producidos por doblado específico en los cromosomas en metafase (160) llevo a cuestionar el efecto de las histonas en la producción de bandas.

Existen datos contradictorios sobre su participación en el bandeo. Estudios citoquímicos demostraron que la fijación con metanol-ácido acético 3:1 remueve todas las histonas y el bandeo no se produce (209). Comings y Avelino (1974) establecieron que cromosomas fijados en metanol: ácido acético, secados al aire y tratados con HCl 0.2N por más de 4 hrs. tiñen uniformemente con Giemsa. Si estos cromosomas son tratados con tripsina o soluciones salinas se obtiene el bandeo típico. Estos resultados hacen suponer que las histonas son removidas de los cromosomas por una combinación de la fijación con metanol:ácido acético y el tratamiento con HCl (210).

Por otra parte, Brown y cols. observaron que la exposición de cromosomas bandeados a soluciones de H1 y H2A anula el patrón de bandeo y la tinción cromosómica. Ellos concluyeron que la remoción selectiva de las histonas H1 y H2A de las bandas durante la fijación, era necesaria para la tinción intensa y que las interbandas teñían pobremente porque aún se encontraban las histonas presentes (211). Esto, sin embargo, es inconsistente con el hecho de que cromosomas fijados únicamente en formaldehído o alcohol y nunca expuestos a metanol ácido acético tiñen uniformemente con Giemsa de color púrpura intenso (168). Cuando se adicionan en cantidad suficiente, - todas las histonas son capaces de abolir la tinción con - -

Giemsa por lo que Holmquist y Comings concluyeron que su efecto es inespecífico (219).

Existen datos contradictorios con respecto a la cantidad y tipos de histonas que son removidos por la fijación con metanol-ácido acético que varían de 7-8 % hasta más de 80% (213,214). Estas diferencias deben ser resultado de los métodos empleados para constatar su presencia o ausencia - Burkholder y Duczek (1980) reportaron que después de tratamiento con metanol-ácido acético en los extractos de fijador se encontraban cantidades variables de cada uno de los cinco tipos de histonas, pero siempre quedando una cantidad significativa de cada uno de ellos en la cromatina nuclear (214).

En base a estudios con anticuerpos antihistonas, Pothier (1975) concluyó que H4 no era completamente removida por la fijación con metanol: ácido acético y HCl 0.2N de los cromosomas en metafase (215). Una explicación alternativa para este hallazgo es que las grandes cantidades de histonas usadas para el proceso de inmunización (5mg) contengan proteínas no histonas contaminantes y que el bandeo sea resultado de anticuerpos antihistónicas (168).

Estudios realizados por Bustin y cols. usando anticuerpos antihistonas producidos con cantidades mucho menores (20 µg) y apareados con ARN, indican que las histonas H1, H2A, H3 y H4 son completamente removidas 5 segundos después de la fijación. Tinción con anticuerpos fluorescentes contra todas las histonas ocurrió cuando cromosomas aislados fueron fijados con glutaraldehído. Todas las histonas estaban uniformemente distribuidas, sin patrones evidentes de bandas aún cuando se usaran diluciones 1:50 del antisuero (216).

Con los tratamientos para producir bandas G, (SSC, - - urea, urea-NaCl), cantidades residuales de histonas fueron extraídas, pero siempre quedando cantidades significativas en los cromosomas. Las histonas también fueron relativamente - resistentes al tratamiento con tripsina. Esta variabilidad en el efecto de los tratamientos de bandas G en las histonas ofrece nuevos aportes para considerar la hipótesis de que -- las histonas no deben estar involucradas en las bandas G - - (214).

Con los tratamientos para producir bandas R no se detectó extracción significativa de histonas (217). Después de - los tratamientos para bandas C las histonas fueron encontradas en el residuo nuclear, siendo H3 la más prominente, con cantidades pequeñas de H2A y H4 presentes y ocasionalmente - trazas de H1 y H2B (217).

Comings y cols. propusieron que la interacción ADN-his- tona podría estar involucrada en el mayor empaquetamiento de la heterocromatina (168), los hallazgos de extracción de his- tonas con diferentes tipos de tratamientos podrían ser signí- ficativos con respecto a esta hipótesis (168,217).

Algunos autores han reportado que la aplicación de hepa- rina, un polianión orgánico que posee una extraordinaria afi- nidad por las histonas, tanto en cromosomas fijados como duran

te el cultivo, produce al teñir con Giemsa patrones de bandas G. Al parecer la interacción heparina/histona facilita la remoción de estas proteínas permitiendo el acceso del colorante a grupos fosfato anteriormente bloqueados por las histonas, principalmente en sitios con alto contenido de ADN. El hecho de que el bandeo de cromosomas fijados requiera concentraciones mayores de heparina que las requeridas para los no fijados, puede deberse a los cambios en la estructura de la cromatina producidos por la fijación. Estos cambios pueden llevar a la condensación de la cromatina y retardan la formación de complejos heparina-histonas. Los resultados implican que el tratamiento con metanol-ácido acético no altera la organización de la cromatina responsable del bandeo, y que cuando se adiciona la heparina antes de la fijación, se obtiene un bandeo rápido y nítido (213).

Dado que la histona H1 está asociada con el ADN internucleosoma e involucrada en la condensación de la cromatina, se sugirió que podría ser un buen candidato para intervenir en el bandeo, sin embargo esto es poco probable ya que la fijación la remueve casi en su totalidad (168). Por lo mencionado anteriormente parece difícil que las proteínas histonas participen directamente en el bandeo cromosómico, sin embargo, aún quedan algunos puntos por aclarar para poder aseverar esta suposición.

b) No histónicas.

Las proteínas no histónicas o sus interacciones con el ADN han sido consideradas como responsables de la producción de los patrones de bandas G, R, C y NOR, sin embargo, se desconoce cual de estas proteínas está involucrada y su mecanismo de acción (214).

Se ha postulado que intervienen bloqueando el ADN de las regiones interbanda en las bandas G, como lo demuestran estudios de cromatina tratada con sales calientes, la denaturalización de estas proteínas bloquea grupos fosfatos impidiendo la unión del colorante (189).

En general todos los métodos capaces de producir bandas G involucran fundamentalmente denaturalización de proteínas no histónicas.

Estudios realizados por Burkholder y cols. demuestran que los diferentes tratamientos de bandas G producen tanto cambios únicos como comunes en las proteínas "no histonas" de núcleos aislados. En los métodos con SSC, urea, urea-NaCl hay extracción de proteínas no histónicas específicas; en cambio la tripsinización produce degradación parcial de las proteínas no histónicas. Muchas de las proteínas no histonas no son extraídas de la cromatina y únicamente sufren modificaciones en su conformación lo cual produce una variación en su afinidad por el ADN (214).

Las técnicas para bandas R tienen escaso efecto de extracción de proteínas no histónicas (168,217). Se ha sugerido que son resultado de denaturalización selectiva de ellas en las regiones interbandas R; y que las proteínas denaturadas cubren los grupos fosfato e impiden la tinción. Las bandas R serían resultado de la composición de bases del ADN y de sus interacciones con las proteínas no histónicas (168,189,217).

Se ha postulado que uno de los factores responsable de la producción de bandas C es la mayor resistencia de la heterocromatina centromérica, probablemente debido a su interacción con proteínas no histónicas lo que la hace más resistente a la extracción con ácidos y álcalis. Estudios para carac

terizar estas proteínas muestran que no existen diferencias entre ellas y el resto del cromosoma, aunque existen proteínas únicas que parecen corresponder a la matriz nuclear, tales como la miosina. Estudios con cloruro de dansilo muestran que existe retención de proteínas y de ADN en la heterocromatina de las bandas C (168,189,217).

Al parecer las regiones de constricción primaria y secundaria tienen poco porque las proteínas inhiben la unión del colorante. Se ha postulado que la naturaleza heterogénea de las regiones de constricción secundaria de los cromosomas 1, 9 y 16 probablemente refleja una diferencia en las proteínas cromosómicas o en la interacción ADN/proteína en estas regiones y que ambas deben variar considerablemente ya que se requieren tratamientos diferentes para producir tinción de cada una de ellas. Las proteínas involucradas corresponden al grupo de las no histónicas (218).

Como ya se mencionó anteriormente la producción de bandas NOR es resultado de la impregnación argéntica de proteínas no histónicas asociadas en complejos con ARN (207,208).

De los estudios antes mencionados es posible concluir que las proteínas no histónicas son en gran parte responsables de la producción de los diferentes patrones de bandas y que estos pueden enfatizar una distribución diferencial de ellas o de sus interacciones con el ADN a lo largo de los cromosomas (189).

2. TIPOS DE CROMATINA DEMOSTRADOS POR LOS DIFERENTES PATRONES DE BANDAS.

Existen dos grupos principales de bandas: bandas Q o G y bandas R. Sus patrones se distinguen por su localización y por la forma en que aparecen.

Se puede considerar que las bandas positivas Q y G son estructuras que comprenden cerca de 50% de las cromátidas. Son reconocibles por sus intensas cualidades cromofílicas especialmente con respecto a la quinacrina, a la solución Giemsa Hoechst 33258 y otros colorantes. Su resistencia al tratamiento calorífico y a la digestión con enzimas proteolíticas, urea y detergentes parece ser relativamente alta. Finalmente su ADN generalmente replica tardíamente (188).

Las bandas R positivas comprenden aproximadamente 50% de las cromátidas y están localizadas en forma opuesta a las Q y G. Sus cualidades cromofílicas son débiles, sólo pueden observarse después de una modificación específica o destrucción de las bandas localizadas en los telómeros (bandas T). Sin embargo su resistencia a enzimas proteolíticas, urea y detergentes es baja. Su ADN replica tempranamente y parece ser en forma escalonada de acuerdo a su colocación de bandas a lo largo de toda la fase S temprana (188).

Existe un tercer tipo de bandas, las bandas C, las cuales son sumamente resistentes a la extracción con ácidos y bases, tiñen intensamente con Giemsa y otras combinaciones de colorantes (DA/Dapi). Parecen contener ADNs satélite y replican su ADN tardíamente (188).

Por lo tanto en base a los patrones de bandas y a otras observaciones referentes a la distribución de secuencias de ADN a lo largo de los cromosomas se ha sugerido la existencia de tres tipos principales de cromatina: eucromatina o bandas R, heterocromatina constitutiva o bandas C y heterocromatina intercalar o bandas Q/G. En la tabla 7 se muestran las características principales de cada tipo de cromatina.

TABLA 7

TIPOS DE CROMATINA EN LAS BANDAS CROMOSOMICAS (168,189)

	Heterocromatina Constitutiva	Heterocromatina intercalar	Eucromatina
Relación con Bandas	En bandas C	En bandas G	En bandas R
Localización	Generalmente centromérica condensada	Brazos cromosómicos condensada	Brazos cromosómicos dispersa
Condición durante interfase			
Tiempo de replicación del ADN	S tardío	S tardío	S temprano
Contenido de ADN satélite	+++	±	±
Repetitividad del ADN	Generalmente ADN satélite	Moderadamente repetitiva y copia única	Moderadamente repetitiva y copia única
Composición de bases	Rica en G-C o rica en A-T de- pendiendo de ADN satélite	Rica en A-T	Rica en G-C
Actividad Génica	inactiva	relativamente inactiva	generalmente activa
Asociada con membrana nuclear o nucleolo	+	+	-
Metilación de ADN (me- tilcitosina)	+++	±	+
Relación con cromómeros en paquitene	cromómeros centroméricos	cromómeros intercalares	Intercromomé- rica

3. RELACION DEL BANDEO CROMOSOMICO CON LA ESTRUCTURA CROMOSOMICA.

Tratamientos variados son capaces de producir la aparición de patrones específicos de bandas en los cromosomas mitóticos; sin embargo el mecanismo de bandeo y su relación con la organización estructural de los cromosomas sólo está parcialmente resuelto.

La cromatina está organizada en nucleosomas formando una fibra de 110 Å, la cual puede enrollarse en una estructura solenoidal de 250-300 Å. Los diferentes modelos para los últimos niveles de organización incorporan el concepto de una fibra unitaria. Al obtener estas fibras a partir de cromosomas desespiralizados se tienen estructuras regulares con una longitud 5 veces mayor que la del cromosoma correspondiente en metafase y un diámetro uniforme de 0.4 μ m. La contracción final de la fibra unitaria en los cromosomas completamente condensados de metafase se cree se efectúa por un enrollamiento regular adicional de la fibra unitaria (161).

Al aplicar tratamientos para producir bandas G a las fibras unitarias de cromatina se observa un patrón de bandas similar; por lo que el fenómeno de bandeo parece ser independiente del último orden de enrollamiento de las fibras en los cromosomas mitóticos, sugiriendo una composición no homogénea de la estructura regular de las fibras cromosómicas unitarias -- (161).

El mecanismo de bandeo está presumiblemente determinado por factores tales como diferencias regionales en la composición de bases y una extracción diferencial de las proteínas cromosómicas (168). Se ha sugerido que la naturaleza altamente hidratada de la fibra unitaria sólo representa un momento de colapso en el mecanismo de bandeo. Al inspeccionar minuciosamente

samente los patrones de bandas de los cromosomas mitóticos se revelan algunas características específicas. Partiendo de los cromosomas más compactos de la metafase media hacia cromosomas sucesivamente más largos de metafase temprana, prometafase y profase tardía parece evidente que la división de una banda en dos y la emergencia de bandas en regiones que previamente carecían de ellas siguen algunas reglas simples. Generalmente una banda tiene apariencia globular con respecto al diámetro de una sola cromátida, cuando una banda es elongada y alcanza el doble del diámetro de la cromátida siempre se dividen en dos bandas. En forma similar cuando una interbanda se amplia hacia el doble del diámetro de la cromátida, siempre aparece una banda en su centro la cual se hace sucesivamente más ancha y tiñe fuertemente hasta que finalmente se divide en dos bandas (161,219). Estas reglas pueden aplicarse a la transición de la profase tardía a la fibra unitaria bandeada (161).

Por otra parte se ha visto que cada cromosoma posee una secuencia identificable de cromómeros grandes y pequeños. Un total de aproximadamente 500 cromómeros pueden ser distinguidos en un número haploide de cromosomas humanos (101). Un número igual de bandas G han sido reveladas (68), al parecer las bandas positivas y negativas están en igual cantidad por lo que se ha tratado de asumir mediante microscopía electrónica que las bandas positivas corresponden a cromómeros y los espacios intercromoméricos, los cuales están compuestos predominantemente de fibras longitudinales, corresponderían a las bandas negativas o interbandas (101). Se ha estimado que únicamente 55% del volumen cromosómico es fibra y dado que los cromómeros poseen suficiente flexibilidad para asociarse por si mismos con los cromómeros vecinos; las asociaciones intercromoméricas permiten la observación de bandas estructurales por lo que se puede lograr la identificación individual de cromosomas no fijados al microscopio electrónico (101).

Al parecer la observación de algunas bandas al microscopio óptico se debe al arreglo oblicuo de los cromómeros alrededor de un eje cromatídico imaginario en el cual se conforman muchas fibras longitudinales, dando la apariencia de una estructura en espiral (101). Desde el punto de vista de la estructura fibrosa de los cromosomas habría tres causas para la producción de las bandas observables al microscopio óptico: - (1) una base estructural dada por la distribución discontinua de la cromatina en las cromátidas, que es modulada por la presencia de cromómeros; (2) por afinidades químicas específicas distribuidas a lo largo de las cromátidas, que pueden coincidir o no con la distribución de cromómeros, al parecer estas afinidades pueden preexistir en la secuencia de nucleótidos del ADN o en un momento dado ser incrementadas por los tratamientos - (por ejemplo por remoción o desnaturalización de proteínas y (3) por la existencia de regiones con gran resistencia a la extracción por diferentes agentes, lo cual sugiere una compactación diferencial (101).

Comings ha resumido los numerosos aspectos de la estructura de los cromosomas de mamíferos tomando como base los modelos uninémicos de la fibra doblada (125,127). La estructura cromosómica se inicia con una fibra de ADN de doble hélice de 20 Å de diámetro, la cual interacciona con las histonas para producir la estructura arrosariada que se compacta para formar una fibra de 100-300 Å que constituye la fibra clásica de 250 Å de la cromatina en interfase y los cromosomas en metafase. Esta fibra está ordenada en una serie de asas o cromómeros producto de la asociación de porciones de ADN rico en A-T con proteínas no histónicas de la matriz nuclear. Las pequeñas asas consisten de ADN relativamente rico en A-T de replicación tardía, mientras que el ADN entre las asas está compuesto de ADN rico en G-C de replicación temprana. Es probable que pequeños cromómeros se asocien para formar grandes cromómeros

visibles como bandas G en los cromosomas en metafase. Cuando los cromosomas son parcialmente desenrollados se caracterizan por una fibra espiralizada con un diámetro de 0.2 a 0.5 μm si este cromosoma es desespiralizado, la fibra puede ser de 0.35 a 0.43 μm o tan pequeña como 0.1 μm dependiendo de las condiciones. Cuando este cromosoma está en su forma más condensada se visualiza al microscopio óptico en su forma clásica -- (168,193) En la figura 19 se muestra el modelo de Comings para la estructura cromosómica.

Yunis y cols. han descrito un modelo para la estructura cromosómica basado en la distribución de la heterocromatina a lo largo del cromosoma. En la figura 20 se muestra una representación diagramática de los elementos que forman este modelo. La heterocromatina constitutiva representada como grandes áreas oscuras se cree está compuesta por secuencias de ADN altamente repetitivo o sus productos evolutivos. Esta heterocromatina se localiza en las regiones centroméricas, en organizadores nucleolares, en otras constricciones secundarias y probablemente en los telómeros o intercalada con regiones eucromáticas. La región centromérica contiene cromatina a la cual se unen las fibras del huso acromático y se continua con heterocromatina hacia ambos lados. El organizador nucleolar, definido como copias duplicadas en "tandem" de los cistrones ribosomales 18 S y 28 S, esta representado como una constricción secundaria, normalmente incluida en el organizador nucleolar. Otras constricciones secundarias se encuentran espaciadas por heterocromatina y probablemente representan el sitio de otros genes duplicados en "tandem" tales como ARN r 5 S o las histonas (23,193).

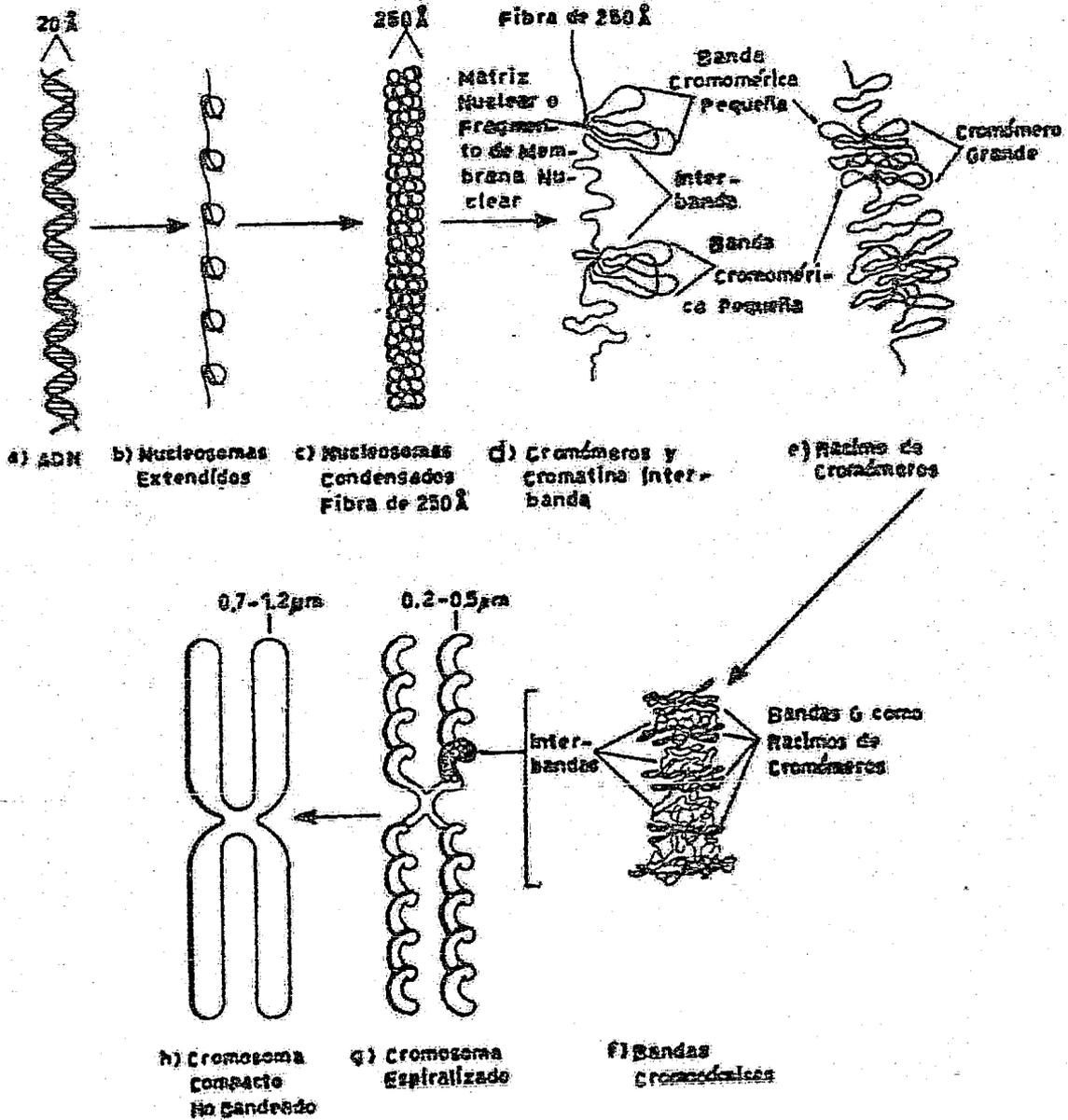


Figura 19. Diagrama de la estructura de un cromosoma humano comenzando con el ADN, pasando por la formación del nucleosomas, cromómeros y finalmente el cromosoma espiralizado (168).

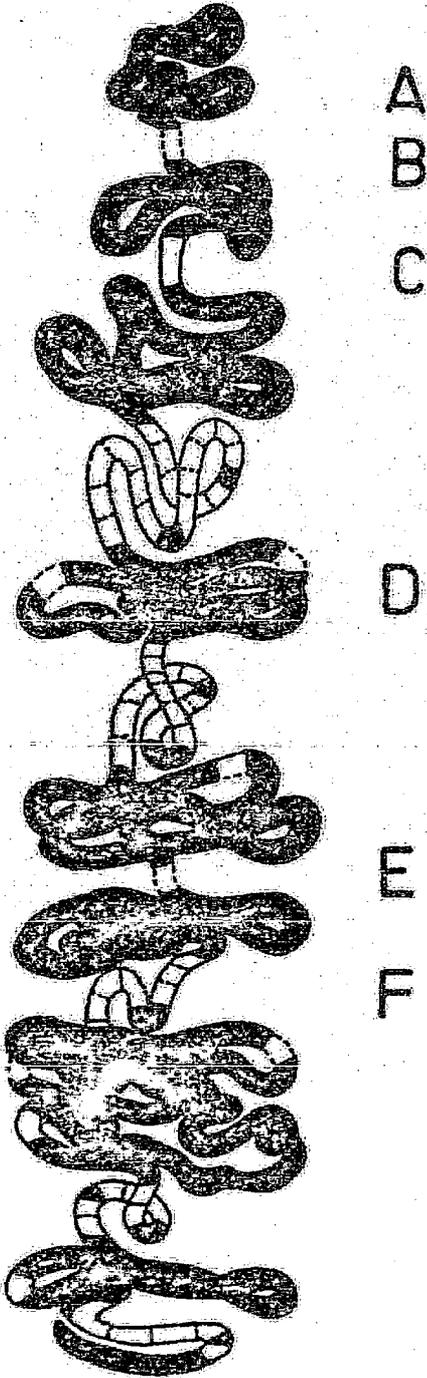


Figura 21. Esquema de la estructura interna de un cromosoma y su posible relación con las bandas. Se muestran varios elementos estructurales: A, heterocromatina - constitutiva perinucleolar y pericentromérica. B, constricción secundaria de organizador nucleolar. C, constricción primaria o centrómero. D, E, principales -- bandas y subbandas que separan genes vitales y F, bandas G claras donde se encuentran los genes es tructurales.

Yunis también ha postulado un modelo en el cual las asas y las fibras descritas en la cromatina en interfase se doblan para formar los cromosomas en profase. Es posible que en la profase tardía las fibras contiguas interasas vayan de una a varias bandas cromatídicas densas antes de doblarse formando un haz de 8-13 fibras extendidas para formar una banda clara. En este modelo hipotético, las bandas densas de cromatina contendrán un número similar de estructuras en asa que se cree representan bandas G positivas y están arregladas en una forma no al azar (168). Debido a que las bandas G son de replicación tardía y ricas en ADN moderadamente repetitivo se ha asumido que contienen heterocromatina intercalar y no tienen función génica en la organización cromosómica (30,146,168). Por otra parte las bandas claras, G negativas, son sitios preferenciales de hibridación con ARNs mensajeros o con sus precursores (30,57,64) pudiéndose asumir que las fibras extendidas observadas en interfase no están ordenadas al azar y representan las principales unidades génicas de la cromatina (146). En la figura 21 se muestra el modelo para la estructura cromosómica propuesto por Yunis y cols. en el cual se conjunta la localización de la heterocromatina y la de las unidades génicas principales.

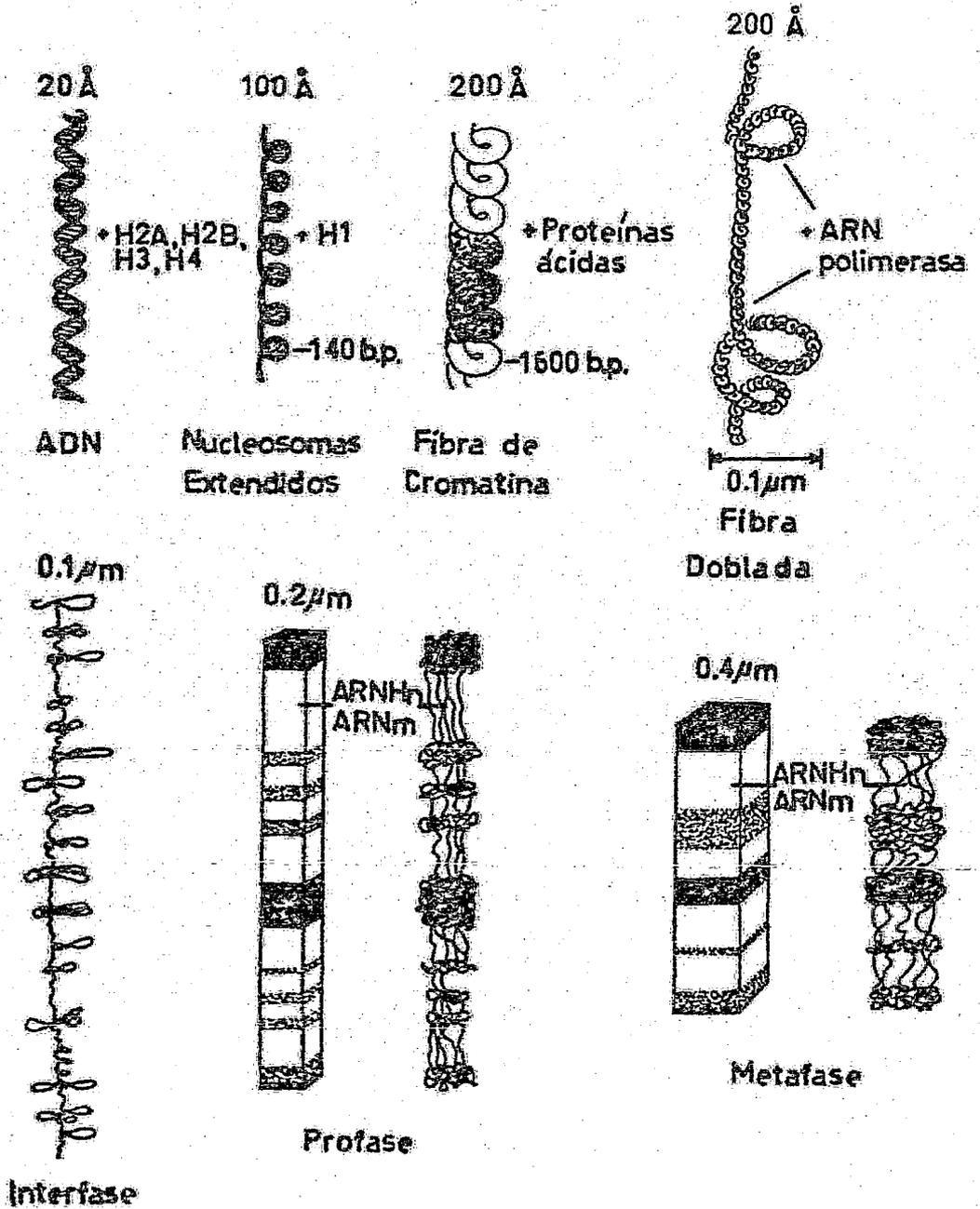


Figura 21. Representación de la organización de un cromosoma humano y su relación con las bandas de acuerdo a Yunis (193).

VI. METODOLOGIA

La citogenética ha avanzado considerablemente en los últimos años debido al desarrollo de diferentes métodos de bandeo que permiten la identificación individual de los cromosomas, la detección de anomalías numéricas y estructurales y tinción de regiones específicas.

A continuación se describen algunos de los métodos de bandeo más utilizados en citogenética humana y aquellos modificados que se utilizan como rutina en el Servicio de Genética del Hospital General de México, S. S. A.

1. METODOS PARA BANDAS Q.

Algunos derivados de acridina, como la mostaza de quinacrina o el dihidrocloruro de quinacrina, permiten una tinción diferencial fluorescente en los cromosomas, produciendo el patrón conocido como bandas Q (16,17,21,220). Cada par cromosómico es claramente identificado con esta tinción y el cromosoma Y exhibe una intensa fluorescencia en la porción distal de sus brazos largos que puede presentar polimorfismos de individuo a individuo. La tinción de núcleos en interfase permite la identificación del cromosoma Y (cromatina Y). Otras regiones tales como las regiones centroméricas de los cromosomas 3,4 y 13 pueden ser teñidas en forma específica con quinacrina, al igual que los satélites de los cromosomas acrocéntricos, pudiendo variar la intensidad de tinción de un homólogo a otro (21,188).

Este método es útil para detectar anomalías cromosómicas estructurales y se requieren pocas células para un análisis de rutina, excepto en casos de mosaicismo. Sin embargo, esta técnica tiene algunas desventajas ya que se requiere un microscopio de fluorescencia y como la fluorescencia va disminuyendo al exponerse a la luz U.V. es necesario recurrir a la fotografía para elaborar cariotipos.

Preparaciones opacas pueden recuperar algo de su fluorescencia en unas horas; esto es suficiente para apreciar el fino bandeo cromosómico pero no para diagnóstico de cromatina - Y (220).

Las laminillas teñidas con fluorocromos pueden ser subsecuentemente tratadas con cualquiera de los métodos para tinción cromosómica o nuclear, colocándolas 30 min en alcohol al 96% para remover el cubreobjetos y disolver el fluorocromo, posteriormente se dejan secar al aire. Preparaciones cromosómicas teñidas por tinción estándar (con Giemsa u orceína) pueden ser desteñidas con alcohol al 70%, en ácido acético - al 50% o en ambos y subsecuentemente tratadas con quinacrina (188,220).

Método 1 para tinción con quinacrina (bandas Q) (220).

Material: preparaciones cromosómicas secadas al aire y preparaciones de núcleos en interfase

1. Sumergir las laminillas en solución amortiguadora pH 6.0 por 5 min.
2. Colocar las laminillas en solución de quinacrina (dihidrocloruro o mostaza) al 0.2% en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.0 por 5 min.
3. Colocar las laminillas en solución amortiguadora pH 6.0 por 5 min.

4. Cubrir las células en los portaobjetos húmedos con un cubreobjetos, cuidando que no queden burbujas de aire.
5. Revisar al microscopio de fluorescencia; si la tinción es muy débil esperar 10 min; si aún es débil, remover el cubreobjetos y reteñir en la solución de colorante durante 5 min acortando el tiempo de diferenciación en solución amortiguadora. Colocar un nuevo cubreobjetos; si la tinción es muy intensa (no se distingue el patrón de bandas de los cromosomas, ni la cromatina Y), remover el cubreobjetos y colocar nuevamente en solución amortiguadora fresca por 5 min y montar. Si la preparación esta teñida satisfactoriamente, sellar el cubreobjetos con barniz de uñas.

Método 2 para tinción con quinacrina (bandas Q) (193).

Solución de almacenamiento de mostaza de quinacrina (MQ) = -
 1 μ g/ml en solución amortiguadora de Sorensen (pH 6.8-7.0)
 Solución de trabajo de MQ = 3 ml de MQ + 50 ml de amortiguador (pH 6.8-7.0).

1. Sumergir las laminillas en solución amortiguadora (1min)
2. Teñir en MQ 10 min.
3. Lavar con agua corriente
4. Enjuagar en tres cambios de amortiguador (pH 6.8-7.0)
5. Montar en solución amortiguadora (pH 6.8 -7.0)

El cubreobjetos puede ser sellado con barniz de uñas. Se obtienen mejores resultados si las preparaciones se examinan el día en que son realizadas.

Preparación de solución amortiguadora de fosfatos (Sorensen) (220).

Solución A: KH_2PO_4 0.067 M (= 9.08g/l de H_2O)
 Solución B: Na_2HPO_4 0.067 M (=11.88 g/l de H_2O)

Solución A (ml)	Solución B (ml)	pH
98.8	1.2	5.0
87.7	12.3	6.0
73.2	26.8	6.4
50.8	49.2	6.8
39.2	60.8	7.0
28.5	71.5	7.2

2. METODOS PARA DEMOSTRAR HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA --- (BANDAS C).

Las estructuras consideradas dentro de la categoría de bandas C no corresponden en realidad a bandas cromosómicas, sino que constituyen la heterocromatina que está localizada preferentemente en las regiones pericentroméricas. Varias técnicas de tinción han sido reportadas, siendo las primeras derivadas de los métodos de hibridación in situ y utilizan principalmente tratamientos con soluciones salinas, álcalis, hidróxido de bario, ácidos, urea y calor.

Después de la tinción con Giemsa los cromosomas adquieren una coloración limitada. Las cromátidas son muy pálidas y las regiones pericentroméricas, la porción distal de los brazos largos del Y y las constricciones secundarias de los cromosomas 1,9 y 16 tiñen intensamente. Las aplicaciones prácticas de estos métodos son limitadas.

Método 1 para demostrar heterocromatina centromérica. Bandas C (Yunis y cols. 1971) (221).

Material: Preparaciones cromosómicas secadas al aire o a la flama.

1. Colocar las laminillas en solución amortiguadora de fosfatos 0.06 M (Solución amortiguadora de Sorensen - - - 0.06 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) a pH 6.8 a 85 - 100°C (90°C temperatura óptima) e incubar 5-10 min

2. Transferir a solución amortiguadora de fosfatos 0.06 M (pH 6.8) a 65°C e incubar por más de 10 h

3. Después de enfriar las laminillas teñir con Giemsa.

Solución Giemsa:

100 ml de solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.0; 0.01M)

10 ml de solución de Giemsa

Teñir 10 min y lavar con agua corriente, dejar secar y montar con resina sintética.

Método 2 para bandas C (221).

Material: preparaciones de cromosomas meióticos o mitóticos - secadas al aire y dejadas envejecer por algunos días.

1. Las laminillas se tratan con HCl 0.2 N a temperatura ambiente por 1 h para meiosis y 30 min para mitosis.

2. Se lavan con agua desionizada.

3. Se colocan en una solución fresca de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ al 4-5% a 50°C por 10 a 30 s ó al 1-2% a 37°C por 30 min (da mejores resultados).

4. Enjuagar con agua desionizada.

5. Incubar 1-2 h a 60°C en 2 X SSC (cloruro de sodio 0.3M con citrato de sodio 0.03M) (17.83 g de NaCl + 8.82 g de citrato de sodio de 1,000 ml de agua destilada)

6. Lavar con agua desionizada.
7. Teñir en Giemsa (1ml de solución stock + 49 ml de solución amortiguadora de fosfatos) pH 6.8 por 30 min.
8. Lavar con agua desionizada, secar y montar

Existe otro tipo de técnicas que permite la identificación precisa de las constricciones secundarias de los cromosomas 1, 9 y 16.

El método de Giemsa pH 11 (Bobrow y cols. 1972) (223) -- produce una tinción preferencial de la constricción secundaria del cromosoma 9; esta región aparece de color rojo púrpura, mientras que otros cromosomas sólo muestran un color azul pálido. Las regiones centroméricas de otros cromosomas también pueden teñirse. Con este método la constricción secundaria del 9 puede visualizarse en núcleos en interfase, por ejemplo en células sanguíneas y espermatozoides.

Método Giemsa pH 11 (223).

Material: preparaciones cromosómicas envejecidas por 3-4 días se tiñen de 10 a 20 min en solución Giemsa recién preparada, consistente en 2 ml de solución stock + 98 ml de agua destilada, el pH se ajusta a 11 con NaOH. Después de teñir se lava con agua destilada, se dejan secar y se montan. Se evita la formación de precipitado en la laminilla si se tiñe a 37°C.

Kanda desarrolló un método que permite la tinción preferencial de las constricciones secundarias de los cromosomas 1, 9 y 16 al calentar las células en solución hipotónica antes de fijarlas. A 45-60°C la más teñida es la del 9, a 50°C la del 16 alcanza su máximo y el cromosoma 1 muestra tinción estable entre 50 y 60°C (218).

Método de tinción de constricciones secundarias del 1,9 y 16 mediante soluciones hipotónicas y calor (218).

Se utilizan cultivos de sangre periférica incubados a 37°C por 72 h. Antes de cosechar se les adiciona colchicina ($10 \mu\text{g/ml}$) por 1.5 - 2 h. Las células son colectadas y suspendidas en KCl o 0.075M y lavadas pipeteando a temperatura ambiente. Se resuspenden en la misma solución hipotónica y se calienta por 30 min en baño maría a $45-60^{\circ}\text{C}$. Se fijan en metanol, ácido acético 3:1 en 3 cambios sucesivos. Se hacen las preparaciones dejando secar al aire o a la flama 12 h después de haber fijado las células. Se tiñen 5 min en -- Giemsa al 1% en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8.

3. METODOS PARA PRODUCIR BANDAS G

Las posibilidades para obtener bandas G son innumerables existiendo tratamientos con álcalis, soluciones salinas concentradas, calor, urea, detergentes, enzimas proteolíticas, etc.; teniendo en común el uso de colorantes de Giemsa para teñir. El patrón de bandas producido es muy similar al obtenido con quinacrina; sin embargo se observan pequeñas diferencias tales como las regiones de constricción secundaria de los cromosomas 1 y 16 que fluorescen muy poco con quinacrina se tiñen intensamente con Giemsa y los cromosomas 11 y 12 -- muestran una región no teñida más pronunciada en la porción proximal de los brazos largos. Por último, la región fluorescente del Y con quinacrina, no es teñida con bandas G.

A. Métodos para bandas G utilizando álcalis (NaOH) y Calor.

Se utilizan preparaciones cromosómicas convencionales de sangre periférica o de fibroblastos secadas al aire. Tratamiento hipotónico: (10 min) en solución de Gey diluida con 3 partes de agua destilada (el uso de KCl 0.075 M hace a los cromosomas menos resistentes al tratamiento con NaOH). Fijador: metanol-ácido acético 3:1 fresco.

En preparaciones de médula ósea los cromosomas tienden a estar muy contraídos, por lo que para obtener buenos patrones de bandas no debe aplicarse colchicina por tiempos prolongados.

Para preparaciones de meiosis masculina se utiliza: tratamiento hipotónica (15 min) o con citrato de sodio 0.9%; fijador: el mismo que para metafase de células somáticas.

1. Cubrir las laminillas con agar 0.5% (necesario sólo si los cromosomas son barridos o distorsionados por el tratamiento con NaOH). Sumergir las laminillas en la solución de agar (licuada por ebullición y enfriada a 60°C antes de usarse) y dejar secar completamente.
2. Sumergir las laminillas cubiertas o no de agar en NaOH 0.07N a 20°C por 90 s y directamente sumergir tres veces en etanol al 70%, pasar por alcohol al 96 y absoluto y secar.
3. Incubar en solución amortiguadora de fosfatos (M/15, --- $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) pH 6.8 precalentada a 59°C por lo menos 15 h y preferentemente 24 h.
4. Enfriar o lavar con agua destilada las preparaciones húmedas y transferir a solución Giemsa amortiguadora (1 parte de solución Giemsa Merck) y 9 partes de solución amortiguadora de fosfatos (1.14 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{H}_2\text{O}$ y 0.49 g de -

KH_2PO_4 en un litro de agua destilada), teñir por aproximadamente 20 min; a veces son necesarias tinciones más prolongadas. Lavar con agua corriente, secar, sumergir en xilol y montar.

El punto crítico de este método es el tratamiento con NaOH . En algunos casos la solución 0.07N puede ser muy fuerte y puede substituirse por NaOH 0.007N o aún 0.002N, obteniéndose resultados óptimos.

Para cada lote de preparaciones cromosómicas pueden probarse 6 modificaciones de este método: las laminillas con agar y sin él respectivamente se tratan con NaOH 0.07 N por 90 s, NaOH 0.007 N por 90 s y NaOH 0.002N por 90 s.

Algunas veces el tiempo de tratamiento puede ser reducido (a 30-60 s). La cubierta de agar no interfiere con la tinción con Giemsa y en la mayoría de los casos es removida durante la incubación en amortiguador.

Método 2 para bandas G con NaOH y calor (método de Gagné) (224).

Material: preparaciones cromosómicas convencionales secadas al aire.

1. Sumergir las laminillas en NaOH 0.014N por 15-20 s, transferir rápidamente a etanol al 70% y efectuar dos cambios, posteriormente lavar con etanol al 95% y secar.
2. Colocar las laminillas en 6xSSC caliente (66°C). Después de 18 h lavar dos veces en 6xSSC. Transferir a etanol al 70% y después al 95% y secar.
3. Teñir en solución Giemsa amortiguada: 50ml de agua destilada + 1.5 ml de ácido cítrico pH 6.9 + 1.5 ml de metanol +

5 ml de solución stock de Giemsa (Harleco) durante 30 min lavar con agua destilada y secar. Diferenciar bajo control microscópico en etanol al 25%, transferir a acetona, después a tolueno y montar.

B. Métodos con soluciones salinas y métodos por variaciones de pH.

Los métodos que involucran el uso de soluciones salinas concentradas para producir bandas G reciben el nombre de técnicas ASG (acético/salina/Giemsa).

Método ASG de Sumner y cols(195).

Material: preparaciones convencionales secadas al aire de cultivos de sangre periférica, la humedad relativa durante la preparación puede influenciar los patrones de bandas. Preparaciones hechas con una humedad relativa (H.R.) alta no muestran bandas. Los mejores resultados se obtienen a 40-50% de H.R.

1. Incubar en 2xSSC (1 h a 60°C) y después lavar con agua - desmineralizada.
2. Teñir con solución Giemsa amortiguada por 1-1.5 h (50 ml de solución amortiguador pH 6.8 y 1 ml de solución stock de Giemsa). Lavar con agua desmineralizada, secar, enjuagar en xileno y montar.

Si la tinción es demasiado intensa y no se obtiene un buen bandeo se pueden hacer algunas modificaciones: tratando las laminillas con NaOH por 5-30 s, enjuagándolas con agua - destilada e incubando después en 2xSSC. En otros casos, sim

plemente prolongar el tiempo de incubación con 2 x SSC puede producir el bandeo. En la mayoría de los casos una combinación de ambas modificaciones dará los mejores resultados

Para cada lote de preparaciones se deben probar varios tiempos de incubación (30, 60, 90 min; 6 y 18 h).

Algunas veces los patrones de bandas pueden diferenciarse mejor acortando los tiempos de tinción.

Método ASG de Chaudhuri y cols. (200).

Este método es una modificación del método anterior y en ocasiones pueden obtenerse mejores resultados.

Material: preparaciones cromosómicas secadas al aire de cultivos de sangre periférica y fibroblastos.

1. Colocar las laminillas en solución amortiguadora de fosfatos (Sorensen) a pH 6.8 a 62°C por 24 h. El tiempo de incubación puede ser reducido a 45 min si la temperatura se aumenta a 66°C.
2. Teñir directamente en solución Giemsa por 5-10 min (7 ml de solución de almacenamiento de colorante (Merck) + 20 ml de solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8 + 73 ml de agua destilada. (si se requiere una mejor diferenciación se utiliza etanol 10-20%).
3. Lavar con agua corriente, secar y montar.

Técnica Giemsa 9 (Método de Patil y cols.) (225).

En este método se combinan el tratamiento con álcali y la tinción con Giemsa en un sólo paso, cambiando el PH del - Giemsa del usual 6.8 - 7.0 a pH 9.0 lo cual produce una tinción diferencial de los cromosomas.

Se pueden utilizar diferentes tiempos de tinción - -- (5-15 min). Si se trata por 1-2 min se obtiene tinción de las regiones centroméricas y ocasionalmente de las constricciones secundarias del 1 y 16. Después de 4 a 10 min se obtienen bandas G y con más de 15 min los cromosomas tiñen uniformemente.

Técnica Giemsa 9 (225).

Las preparaciones se hacen sobre laminillas frías y húmedas y se secan por soplado y calentamiento en una platina a exactamente 60°C por 90-120 s (para evitar los efectos inconsistentes del secado a la flama). Teñir en la siguiente solución: 96 ml de agua destilada + 2 ml de Na_2HPO_4 0.14 M + 2 ml de solución Giemsa (Harleco).

La mezcla es ajustada a pH 9 si es necesario. Las laminillas se tiñen por 5 min, debiendo probarse diferentes tiempos.

Las preparaciones teñidas se lavan con abundante agua destilada, se secan, enjuagan en xilol y se montan.

C. Métodos utilizando digestión enzimática para producir Bandas G.

Estos métodos tienen la ventaja de que las bandas pueden ser obtenidas en pocos minutos con buenos resultados aún con preparaciones de más de un año. Sin embargo ya que las actividades enzimáticas son bastante variables es difícil establecer procesos estándar y para cada caso deben ser probados diferentes tiempos de incubación.

Método 1 con tripsina (Método de Seabright) (198).

Material: preparaciones cromosómicas secadas al aire (a la flama son menos adecuadas).

Tratar con tripsina (Difco) al 0.25% en una solución salina isotónica o simplemente agua destilada a temperatura ambiente o a temperaturas aún mayores que 37°C por 10 - 60 s.

Teñir 3-4 min en Leishman (BDB) diluido con amortiguador pH 6.8 (1:4), lavar rápidamente en agua destilada, secar al aire, enjuagar en xilol y montar.

En este método el pH debe ser constante (pH 6.8); el pH óptimo de la tripsina cae en valores más elevados (pH 8.0 ó aún 9.0) pero se obtienen algunos efectos inespecíficos en los cromosomas. Pueden utilizarse diferentes temperaturas de incubación (entre 20 y 40°C), sin embargo una temperatura dada preferentemente baja debe usarse para un mismo lote de preparaciones para obtener condiciones estándar.

Para cada caso deben probarse tiempos diferentes de incubación (10 a 60 s); es preferible utilizar soluciones de tripsina que requieren tiempos de incubación más largos que soluciones más activas con tiempos cortos ya que los resultados son menos consistentes.

Método 2 con tripsina (método de Wang y Fedoroff) (197).

Las preparaciones deben ser elaboradas por la técnica de secado a la flama. Las laminillas se sumergen en tripsina al 0.025 - 0.05% (en solución salina balanceada libre de Ca y Mg) a 25-30°C por 10-15 min. Alternativamente esta solución puede ser diluida con EDTA al 0.02% (1:1). El pH de la solución

enzimática se ajusta a 7.0. Las laminillas se lavan sucesivamente en etanol a 70%, 96% y absoluto y se secan.

Teñir por 1-2 min en la siguiente solución: 100ml de solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.0; 0.01M) + 10 ml de solución Giemsa. Enjuagar con abundante agua desmineralizada, secar, enjuagar en xilol y montar.

D. Otros métodos para producir Bandas G.

Otros métodos han sido descritos para producir bandas G, quizá algunos de los más interesantes son aquellos que utilizan la incorporación de diferentes agentes al medio de cultivo y aquellos con tratamientos previos a la fijación.

Método para producir bandas G con Heparina (Simeonova y cols.) (213).

En este método el tratamiento puede darse tanto a cromosomas no fijados como a preparaciones fijadas.

Tratamiento de cromosomas no fijados.

Heparina (Richter) (50 mg/ml) diluida a una concentración final de 200 μ g/ml.

Después de 62 h de cultivo en medio 199 con fitohemaglutinina-P a 37°C, las células del cultivo de sangre periférica se suspenden en solución hipotónica (KCl 0.075M) por 15 min. Posteriormente se centrifuga y remueve la solución hipotónica y se adiciona 0.1 ml de la solución de heparina de trabajo - fría, resuspendido el botón. Dejar a temperatura ambiente - 3-5 min. El material se fija dos veces en metanol: ácido acé

tico por 1 h. Las preparaciones secadas al aire se tiñen en solución de Giemsa al 2% en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8 por 6-7 min.

Tratamiento de cromosomas fijados.

Las preparaciones cromosómicas secadas al aire se tratan con solución de heparina sin diluir (50mg/ml) por 18-24 h. Se lavan con agua destilada y tiñen en solución de Giemsa al 2% en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8 por 6-7 min.

4. METODOS PARA PRODUCIR BANDAS R y T

Las bandas R (reversas) muestran un patrón de bandas -- opuesto al de las bandas Q/G. Tienen la desventaja de que -- tiñen muy tenue por lo que para su análisis se requiere un -- microscopio con contraste de fases, sin embargo son muy úti-- les para el estudio de translocaciones que involucran los te-- lómeros de los cromosomas.

Métodos con Giemsa para producir bandas R (Dutrillaux y -- Lejeune) (182).

Material: preparaciones cromosómicas secadas al aire envejeci-- das por 8 días.

Incubar en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5 -- (20mM) a 87°C por 10-12 min y lavar con agua corriente unos segundos.

Teñir por aproximadamente 10 min en la siguiente solución: 92 partes de agua destilada + 4 partes de solución amortigua-- dora de fosfatos pH 6.7 + 4 partes de solución Giemsa. Enjua

gar con agua destilada, secar, lavar con xilol y montar.

Este tipo de bandas son menos reproducibles que el resto de los métodos que utilizan Giemsa.

Método para bandas R con naranja de acridina (Bobrow y cols) (226).

Material: preparaciones secadas al aire.

1. Incubar en solución amortiguadora de fosfatos de Sorensen (pH 6.5) a 85°C por 5-30 min (laminillas viejas requieren más tiempo).
2. Teñir con naranja de acridina al 0.01% en solución amortiguadora de fosfatos (pH 6.5) por 5 min.
3. Diferenciar y montar en el mismo amortiguador, analizar con un microscopio de fluorescencia. Los tiempos de exposición son generalmente de un cuarto a un medio de los necesarios para la fluorescencia con quinacrina. Las bandas R aparecen de color amarillo verdoso en un fondo rojo.

Las bandas T representan una fracción de las bandas R, la fracción que está precisamente localizada, con raras excepciones, en los telómeros. También representan los segmentos de bandas R que son más resistentes al calor.

Método para bandas T con naranja de acridina (Dutrillaux) (227).

1. Tratamiento calorífico. Adicionar 3 ml de solución amortiguadora de fosfatos a 94 ml de agua destilada. Llevar a una temperatura de 87°C. Adicionar 3 ml de solución de Giemsa. Sumergir las laminillas por 5.5 min.
2. Tinción con naranja de acridina. Rehidratar las laminillas en alcoholes graduales hasta agua destilada y teñir con naranja de acridina, la solución se prepara en amortigua-

dor de fosfatos). Montar las laminillas en amortiguador de fosfatos y observar bajo un microscopio con luz U.V.

Método para bandas T con Giemsa (Dutrillaux) (227).

Denaturar por 20-60 min a 87°C en solución de Earl, solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) o solución amortiguadora de fosfatos a un pH aproximado de 5.1. Teñir con Giemsa como en el método anterior. También se puede teñir con naranja de acridina.

Método para obtener simultáneamente bandas C y T (193).

Laminillas secadas al aire se incuban en solución de Hank-BSS mantenida a 91°C por 30 min, enfriadas con agua corriente y teñidas en Giemsa al 4% durante 15 min.

5. TECNICAS PARA LA DEMOSTRACION DE ORGANIZADORES NUCLEOLARES.

Las regiones de organizadores nucleolares (NOR) que se encuentran en los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos de los grupos D y G, se ponen de manifiesto mediante las llamadas bandas N o por métodos de impregnación argéntica (bandas NOR).

Técnica de bandas N (Matsui y Sasaki) (205).

1. Incubar las laminillas en ácido tricloroacético al 5% por 30 min a $85-90^{\circ}\text{C}$.
2. Enjuagar en agua corriente.
3. Reincubar en HCl 0.1N por 30-45 min a 60°C .

4. Enjuagar con agua corriente y teñir por 60 min en solución de Giemsa amortiguada con fosfatos (diluida 1:10) a pH 7.0

Método para NORs por impregnación argéntica (bandas NOR) (204)

Material: preparaciones cromosómicas, secadas al aire o a la flama de células de sangre periférica o médula ósea, previamente cultivadas en medio RPMI 1640 conteniendo 0.1 μ g/ml de colcemida por 1-2 h a 37°C. Debido a que el envejecimiento de las células fijadas frecuentemente da como resultado falta de reacción de la plata con los NORs o una reacción inespecífica. Es conveniente procesar las preparaciones cromosómicas poco tiempo después de que las células hayan sido detenidas en metafase.

Las laminillas son pretratadas con solución amortiguadora de boratos (Na_2SO_4 0.1M, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 0.005M, pH 9.1) por 20-30 min a temperatura ambiente. Este paso es empíricamente necesario para eliminar la tinción inespecífica de los centrómeros que se observaba en el método Ag-AS original.

Las laminillas se incuban después en AgNO_3 al 50% (p/v) (preparado en agua destilada desionizada a pH 4.5 -5.0) en una cámara húmeda por 15-18 h a 60°C; se enjuagan con agua desionizada y se contratiñen con Giemsa al 1-2% por 60 s.

La humedad puede obtenerse también colocando las laminillas en una caja de plástico de cierre hermético, con agua desionizada en el fondo y evitando que las laminillas se mojen. Cuando los cromosomas alcanzan la intensidad de tinción deseada, se enjuagan con varios cambios de agua desionizada, se secan al aire y se observan en contraste de fases o se contratiñen con aceto-orceína o Giemsa al 1-2%.

Si se desea teñir a los cromosomas con tinción con -- Giemsa convencional, las laminillas pueden teñirse con Giemsa al 1-2% en solución amortiguadora de fosfatos 0.01M pH7.0 y utilizar microscopía de campo luminoso. Las laminillas se colocan después en xilol, xilol-etanol y series de alcoholes para remover el aceite de inmersión y la tinción con Giemsa y se dejan secar al aire antes de aplicar los métodos de bandas NOR.

Las bandas NOR pueden combinarse con métodos de bandas G para lograr la identificación individual de los cromosomas acrocéntricos con regiones NOR activas.

Zankl y Benhart (228) desarrollaron un método consistente en incubar las metafases en nitrato de plata acuoso a 37°C por 18 h o a 50°C por 2-5 h para obtener las bandas NOR y después bandear con tripsina y Giemsa. Sin embargo en la actualidad se cuenta con métodos más rápidos para obtener bandas NOR y G simultáneamente.

Método para obtener bandas NOR y G simultáneamente (Howell y Black) (229).

Material: preparaciones obtenidas de linfocitos y envejecidas 5 días.

1. Tinción con plata de NORs.

Se colocan en la superficie de la laminilla 4 gotas de solución I de plata (4g de AgNO_3 disueltos en 8 ml de agua desionizada) y se cubre con un cubreobjetos. Se coloca en una platina caliente y estabilizada a 68°C por 3-5 min, durante este tiempo el nitrato de plata cristaliza alrededor del cubreobjetos. Se lava la preparación con agua desionizada cc

riente para quitar el cubreobjetos y el nitrato de Ag. Se deja secar y se adicionan dos gotas de formalina al 3% (neutralizada con cristales de acetato de amonio y envejecida - por al menos 3 días antes de usarla) y dos gotas de solución II de Ag. (4g de AgNO_3 disueltos en 5 ml de agua desionizada y 7.5 ml de NH_4OH) a la superficie de la laminilla cubriéndola con un cubreobjetos. El progreso de la tinción con Ag se sigue con contraste de fases. Cuando los NORs desarrollan hasta el punto en que pueden verse claramente con iluminación de campo brillante y los brazos de los cromosomas son de color amarillo pálido, se remueven el cubreobjetos y la solución con agua desionizada y se deja secar el portaobjetos. Si los brazos cromosómicos están sobreteñidos de amarillo oscuro a café, se bloquea el bandeó G con tripsina.

2. Bandas Giemsa-Tripsina (por el método de Seabright, 1971).

Después de la tinción con plata, los portaobjetos se colocan en una solución de tripsina (0.3 ml de tripsina GIBCO al 2.5% en 50 ml de Hank BSS 1X sin Ca ni Mg y con rojo de fenol) a 20°C por 3-5 min. Se lavan 5 s en agua desionizada y se colocan 30 s en Hank BSS con Ca y Mg y rojo de fenol. Las laminillas se tiñen en Giemsa al 3% en amortiguador de fosfatos pH 6.8 por 5-10 min. Se lavan con agua desionizada se secan, se colocan en xilol por 5 min y se montan.

6. COMPARACION ENTRE LOS DIFERENTES METODOS DE BANDAS Y --
USO DE VARIAS TECNICAS EN LA MISMA PREPARACION.

En la actualidad se han desarrollado un sin número de métodos de bandas, sin embargo las técnicas para bandas G, R y C constituyen la metodología utilizada como rutina en la mayoría de los laboratorios, ya que tienen estructuras diferentes, pueden complementarse entre sí, utilizan Giemsa y sólo requieren de un microscopio de campo claro.

Los patrones de bandas G y Q son similares, con pequeñas excepciones, pero las bandas G permiten preparaciones permanentes y resultan más económicas. Algunas de las técnicas mencionadas son de gran ayuda en situaciones específicas, las bandas R y T son útiles para la investigación de anomalías en las regiones distales de los cromosomas; las bandas C son específicas para analizar configuraciones cromosómicas meióticas, para la identificación del cromosoma Y y de rearrreglos que involucran centrómeros, tales como formación de dicéntricos y polimorfismos heterocromáticos de los pares 1,9 y 16.- Las bandas N y NOR resultan útiles en el estudio de translocaciones robertsonianas.

En la tabla 8 se comparan los diferentes métodos de bandas en relación a las estructuras teñidas o puestas de manifiesto por cada uno de ellos.

Para el análisis de translocaciones complejas, puede ser necesario utilizar varias técnicas en la misma metafase siguiendo un orden específico (188).

1. Tinción con Giemsa que permite la observación de los cromosomas en su forma clásica y conservar mejor las lamini

TABLA 8

COMPARACION ENTRE LOS METODOS DE BANDAS COMUNMENTE EMPLEADOS (21,180).

Bandas/Método	Bandas finas en las cromátidas	Regiones centroméricas	Constricciones secundarias				Polimorfismos			
			1	9	16	3	aprox. 4	cen satélites	Yqdis.	Yqprox.
Q/Quinacrina	+	-	+	-	-	+	+	+	++	-
C/	-	+	+	+	+	-	-	+	++	+
G 11/	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
G/Giemsa 9	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
G/Denaturalización Renaturalización	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G/Tripsina	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
R/	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
G/ASG	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+

NOTA: Los métodos de bandas R y T son los únicos que tienen las regiones telómericas.

- llas que no están montadas. El aceite de inmersión puede ser removido con tolueno o xileno. El colorante se elimina con etanol, metanol, fijador (metanol-ácido acético 3:1) ó ácido acético al 50%.
2. Tinción con mostaza de quinacrina u otros fluorocromos y observación bajo luz ultravioleta, lo cual permite utilizar posteriormente otras técnicas. El fluorocromo es removido lavando con agua y alcohol.
 3. Métodos de bandas G (excepto por digestión enzimática, si aún se van a usar otros métodos. La tinción se elimina pasando por alcoholes graduales o con fijador.
 4. Los métodos de bandas R pueden emplearse fácilmente para preparaciones que han sido teñidas para bandas G (excepto con digestión enzimática). Es muy difícil pero no imposible obtener bandas G después de bandas R. Una vez realizado el tratamiento para bandas R se puede teñir con Giemsa o con naranja de acridina. La mostaza de quinacrina fluoresce muy poco pero es posible identificar el cromosoma Y.
 5. El método de bandas T puede ser utilizado después de cualquiera de los anteriores y los resultados son muy consistentes.
 6. El método de bandas C se utiliza después de cualquiera de los anteriores. Es posible observar coexistencia de bandas T y C.
 7. Las técnicas de bandas NOR por impregnación argéntica pueden utilizarse después de bandas Q, G, R o C dando buenos resultados, las bandas G (por tratamiento enzimático) pueden obtenerse después de bandas NOR bajo ciertas condiciones.

Así es teóricamente posible, con una sola preparación - observar la tinción clásica, seguida de bandas Q, G, R, T, C y NOR para los mismos cromosomas. Sin embargo, los varios - procedimientos tienden a decrecer la calidad de las imágenes y en realidad es difícil proceder después de 3 ó 4 técnicas diferentes. En la práctica quizá los mejores resultados se obtengan con tinción clásica, bandas Q, tratamiento térmico y tinción con naranja de acridina (bandas R y T) para observar características complementarias.

7. OTROS METODOS DE BANDAS

A. Métodos que involucran el uso de nuevos colorantes con - afinidad por bases específicas (A-T ó G-C) y producen con algunas pequeñas diferencias patrones de bandas Q/G ó R (Ver tabla 5 Capítulo V).

La desventaja de estos colorantes es su difícil adquisición y el uso de microscopía por fluorescencia y filtros adecuados según la longitud de onda a que absorba cada colorante. Además la fluorescencia va desapareciendo con el tiempo de exposición y para un registro permanente es necesario recurrir a la fotografía. Estos factores hacen que estos métodos no sean empleados como rutina sino en casos específicos que justifiquen su uso.

La mayoría de los fluorocromos se utilizan en solución con agua desionizada o diferentes amortiguadores en concentraciones sumamente pequeñas tales como 5 μ g/ml o aún menores.

Método de tinción con Hoechst 33258 o bandas QFH(193).

Las laminillas se sumergen sucesivamente en:

1. Solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) (NaCl - - 0.14M, KCl 0.004M fosfato 0.01M, pH 7.0) 5 min.
2. Hoechst 33258 0.5 μ g/ml en PBS 10 min
3. Sumergir en PBS por 1 min y en PBS 10 min para diferen--
ciar.

Soluciones stock del colorante (50 μ g/ml) en agua pue--
den ser conservadas en la oscuridad y a 4°C por dos semanas.

Las preparaciones teñidas y diferenciadas se montan con
amortiguador a pH 7.0 o 7.5 y se observan al microscopio de
fluorescencia y se fotografían.

Método para producir bandas Q y R simultáneamente por tinción
con cromomicina A₃ u olivomicina (183).

Material: preparaciones cromosómicas de cultivos de sangre -
periférica o fibroblastos. Las laminillas se tiñen a tempe--
ratura ambiente por 20 min. en una solución con 5 μ g/ml de -
cromicina A₃ (Boehringer) u olivomicina (Calbiochem) en amor--
tiguador de fosfatos (NaCl 0.15M, KCl 0.03M y Na₂HPO₄ 0.01 M
ajustado a pH 7.0) conteniendo MgCl₂ (2.5 mM). Posteriormente
las laminillas se lavan y montan con el mismo amortiguador -
y se examinan en un microscopio equipado con fluorescencia -
(lámpara de mercurio 200-W) y dos diferentes combinaciones
de espejos dicróicos y filtros: 1. Filtro de excitación - -
2XBGL2, espejo dicróico FT 510 y filtro barrera LP515. (en -
el rango violeta-azul); 2.- Filtros de excitación UG5 + BG3,
espejo dicróico FT460 y filtro barrera LP475 (en rango de exci--
tación ultravioleta-violeta) todos ellos Zeiss con un objeti--
vo neofluar 100x.

Con la primera combinación de filtros se obtiene un pa--

trón de bandas específico de fluorescencia verde el cual es similar a las bandas Q observadas con Hoechst 33258 y con la segunda combinación se obtiene el patrón de bandas R de fluorescencia amarilla.

Se obtienen mejores resultados si las laminillas teñidas se mantienen durante 24 h en la oscuridad a temperatura ambiente antes de observarlas, con este proceso de maduración a temperatura ambiente antes de observarlas, con este proceso de maduración se logra una fluorescencia intensa de bandas Q y R que se mantiene mayor tiempo mediante $MgCl_2$.

B. Técnicas por contratinción para incrementar patrones de bandas.

Los patrones de bandas producidos por ciertos colorantes fluorescentes pueden ser incrementados o modificados por contratinción. Patrones de bandas precisos pueden ser inducidos por contratinción aún en casos en que el fluorocromo por sí mismo da una fluorescencia pobre y poca diferenciación de tinción. El principio general de esta metodología es el uso combinado de un colorante fluorescente para el ADN (tinción primaria) y el apropiado agente de unión al ADN para la contratinción, el cual puede o no ser fluorescente en una longitud de onda diferente a la de la tinción primaria (184).

Cuando un colorante fluorescente es usado para teñir preparaciones cromosómicas en conjunción con un agente contrastante adecuado, éste último puede adicionarse antes (pretinción) o después de la tinción primaria, aun que el efecto específico de la contratinción es más pronunciado si se adiciona subsecuentemente. Las únicas excepciones son las combinaciones de colorantes que incluyen mostaza de quinacrina. Parte de este fluorocromo alquilante probablemente se une co

valentemente y es resistente a un desplazamiento directo por ciertas contratinciones tales como netropsina o distamicina A. En este caso la pretinción es más efectiva, debido a que reduce la unión subsecuente de la mostaza de quinacrina (184).

Existen un sinnúmero de combinaciones de colorantes. En general, cuando se utiliza una tinción primaria específica para A/T y una contratinción específica para G/C se incrementa el patrón de bandas Q (tipo QFH, bandas Q producidas por el colorante Hoechst 33258). Si se utiliza tanto tinción primaria como contratinción específica para A/T se incrementa el patrón de bandas C, a estas bandas se les llama bandas DA-DAPI ya que se obtuvieron por primera vez utilizando DAPI como tinción primaria y distamicina A contratinción. El uso de colorantes específicos para G/C como tinción primaria y contratinción con especificidad por A/T incrementa el patrón de bandas R (184).

En la tabla 6 (Capítulo V) se muestran algunas combinaciones de colorantes y los patrones de bandas que producen.

Los métodos de contratinción son particularmente útiles en los casos en que los métodos de rutina no proveen de una respuesta concluyente. Las nuevas técnicas fluorescentes pueden ser aplicadas secuencialmente con otros métodos de bandeo. Algunas de las combinaciones de colorantes proveen patrones generales de bandas con excelente definición de bandas estándar y de ciertas regiones polimórficas (tabla 9).

Dos pares de colorantes son particularmente útiles para el estudio de la porción variable distal del brazo largo del cromosoma Y, quinacrina/actinomicina D y DAPI/Distamicina A. Esta nueva metodología es mejor si dos o más combinaciones son aplicadas secuencialmente a las mismas células, lo cual permite caracterizar citológicamente diferentes tipos de heterocromosomas.

tina y la del Y puede ser subdividida en varios segmentos con variaciones en su fluorescencia (tabla 9) (184).

Método por contratinción Quinacrina/Actinomicina D (AT/GC) (185)

Las laminillas se tiñen primero con quinacrina (20mg/ml en H₂O) por 6 min, se juegan después secuencialmente en H₂O, solución amortiguadora de McIlvaine (citrato 0.1 M/fosfato 0.2M) a pH 5.5 por 30 s y H₂O. Se contratañe con aminoactinomicina D 3 μ M o Actinomicina D 30 μ M diluida en amortiguador pH 5.5. La fluorescencia de la quinacrina se excita con luz entre 450 y 500 nm y se observa por un filtro de 510-525 nm.

Método para bandas DA-DAPI (AT/AT) (230).

Las laminillas se tiñen inicialmente con distamicina A (10-15 min) (4mg/ml en amortiguador de McIlvaine pH 7.0), se enjuagan con amortiguador y se contratañen 10 min en 4', 6-diamidino, 2 fenolindol (DAPI) con una concentración final de 1.4×10^{-3} mM en solución amortiguadora pH 7.0 (Na₂HPO₄ 165 mM y citrato de sodio 17 mM). Se lavan con amortiguador y se montan en el mismo. Se observan con luz azul de longitud de onda pequeña utilizando filtro de excitación UG-1 (Zeiss).

Bandas R por contratinción Mitramicina/distamicina A (GC/AT) (231).

Las laminillas se tiñen con distamicina A por 10-15 min a una concentración de 4.0 mg/ml en amortiguador de McIlvaine pH 7.0, se enjuagan con amortiguador y se contratañen con mitramicina a una concentración de 0.1 mg/ml en amortiguador con Mg 10 mM pH 7.0, se enjuagan y se montan con amortiguador.

TABLA 9

COMPARACION ENTRE METODOS DE CONTRATINCION EN RELACION A LOS PRINCIPALES POLIMORFISMOS CROMOSOMICOS
(184).

COLORANTE	Cromosomas				Acrocéntricos			Yqh	
	1qh	3 cen	9qh	16qh	p11	15p12	Satélites proximal	media/distal	
Quinacrina	-	+	-	-	+	-	+	-	+
DAPI/Actinomicina D	+	+	-	+	+	-	+	-	+
DAPI/Distamicina A	+	-	+	+	-	+	-	+	+
Hoechst 33258/ Actinomicin D	+	+	-	+	+	-	+	-	+

C. Métodos dinámicos con BUdR (188).

Originalmente se observó que el BUdR era capaz de acentuar las constricciones secundarias de los cromosomas 1,9 y 16. Después se demostró que también elongaba ciertos segmentos cromatídicos y permitía identificar algunos cromosomas particularmente en X de replicación tardía. El uso de fluorocromos ha facilitado el bandeo inducido por BUdR, permitiendo la expansión de estas técnicas.

Actualmente es posible obtener todos los tipos de bandas por tratamiento con BUdR, reconocer asimetría entre cromátidas y analizar intercambios entre cromátidas hermanas.

En términos estrictamente descriptivos, el BUdR produce las siguientes modificaciones cromatídicas: elongación simétrica, elongación asimétrica, decremento de la intensidad de tinción con Giemsa o Hoechst 33258; modificación de la respuesta al tratamiento térmico a 87 y 65°C. Para obtener esta diferenciación de cromátidas el BUdR es utilizado en proporciones variables y diferentes tiempos, de manera continua o discontinua.

a) Bandas R con BUdR.

Tratamientos continuos en las 3-15 h finales generalmente modifican todas o parte de las bandas Q de manera que los cromosomas presentan bandas R. Esta modificación sigue un ciclo característico el cual depende del período del tratamiento. Por 3 h, sólo algunas bandas Q son afectadas y muestran una elongación considerable. Por aproximadamente 5-7 h casi todas las bandas Q son modificadas y muestran gran elongación. Sus propiedades de color, en particular con respecto al naranja de acridina, son modificadas significa-

tivamente (tinción roja). Después de 7 h y por más de - - 13-15 h algunas bandas R, así como todas las bandas Q son - afectadas. La elongación de estas bandas R es generalmente pequeña o inexistente, pero su coloración roja con naranja de acridina es altamente característica.

b) Bandas Q con BUdR.

Tratamientos discontinuos de la quinceava a la onceava hora antes de la cosecha, pueden modificar las bandas R, - que pueden ser esparcidas y no elongadas pero con una colora- ción modificada con el fluorocromo Hoechst 33258, con naran- ja de acridina o aún con la solución Giemsa con o sin trata- miento termico previo. El resultado son bandas Q/G extrema- damente contrastadas, acompañadas por tinción de las regio- nes centroméricas. En promedio el número de bandas observa- do es muy alto.

c) Bandas Intermedias.

Cuando el tratamiento es aplicado de la novena a la tre- ceava hora antes de la cosecha, las metafases frecuentemente presentan patrones intermedios entre bandas R y Q. Algunos cromosomas muestran bandas R, otros tienen bandas Q y aún se observan cromosomas con ambos tipos de bandas. El cromoso- ma X de replicación temprana tiene bandas R y el de replica- ción tardía bandas Q. Esto indica que hacia la mitad de la fase S, los tiempos de replicación para ciertas bandas R y los de algunas bandas G son muy cercanos, aún es posible que se sobrepongan.

d) Bandas H.

En casos de tratamientos discontinuos, una porción de la mitosis es bandeada de manera muy distinta a las bandas

Q y R, excepto para ciertas regiones. Estas bandas corresponden a un tipo particular de heterocromatina que tiñe verde cuando se utiliza naranja de acridina. El cromosoma X de replicación tardía es sumamente fluorescente y en el cromosoma 2 se localiza heterocromatina en las zonas pericentroméricas de brazos cortos y largos.

e) Asimetría cromatídica con bandas R.

Este patrón cromosómico aparece después de un tratamiento continuo para las últimas 17-24 h de cultivo. Para cada cromosoma, una de las cromátidas parece normal; no hay elongación y hay fluorescencia verde homogénea. En contraste la otra cromátida es elongada debido a la acción de BUdR y tiene algo de fluorescencia naranja. Esta cromátida además tiene patrón de bandas R.

f) Asimetría cromatídica sin bandas.

Tratamientos prolongados pueden modificar completamente una cromátida. Los cromosomas se vuelven perceptiblemente asimétricos y enroscados. Las cromátidas más largas caen en un círculo cuyo radio es mayor que el de las cromátidas más cortas. Se han descrito varias técnicas de tinción que utilizan Hoechst 33258, naranja de acridina o tinciones dobles como Hoechst 33258 y Giemsa o solamente tratamiento térmico y Giemsa.

La cromátida más corta, la menos modificada por BUdR, es la que se tiñe más intensamente. La cromátida más larga es la que se tiñe menos intensamente o tiene algo de fluorescencia naranja con naranja de acridina. Esta característica de las dos cromátidas hermanas permite la observación de intercambios entre ellas.

g) Asimetría cromatídica con bandas Q.

Esto ha sido observado con tratamientos discontinuos, tales como 24 h con tratamiento con BUdR seguido por 36 h de tratamiento con dosis concentradas de timidina. En este caso la cromátida más larga es homogénea, mientras que la más corta presenta bandas Q. Esta técnica es de suma utilidad ya que permite el reconocimiento combinado de bandas Q y la identificación del cromosoma X de replicación tardía, el cual es altamente fluorescente.

h) Asimetría cromatídica y bandas R de las dos cromátidas.

Un tratamiento doble con BUdR permite disociar la asimetría y segmentación de las cromátidas completamente. El primer tratamiento es con una concentración baja de BUdR (1 μ g/ml) para las últimas 24-30 h. El segundo tratamiento para las últimas 7 h es con una cantidad concentrada de BUdR (100 μ g/ml). En este caso las cromátidas son del mismo largo y ambas tienen un patrón de bandas R.

Los métodos que involucran un tratamiento preliminar con BUdR han probado ser de particular interés por varias razones. A nivel práctico son muy sencillos de realizar y altamente reproducibles. Las bandas que producen son de excelente calidad y la elongación de los cromosomas permite la identificación de un número mayor de bandas que con los métodos comunes. Por otra parte la información que proporcionan es considerable (bandas, intercambios de cromátidas reconocimiento de segmentos heterocromáticos) A nivel teórico permiten estudiar problemas de replicación cromosómica y su relación con bandas R y Q o con intercambios de cromátidas.

8. METODOS DE BANDEO DE ALTA RESOLUCION.

En la actualidad se han desarrollado métodos que permiten extender la resolución de los métodos de bandas al estudio de cromosomas menos condensados que los de la metafase media, como los de prometafase o profase.

Estos cromosomas se obtienen reduciendo el tiempo de exposición a colchicina o colcemida (10-30 min) y con concentraciones sumamente pequeñas (0.05 μ g/ml), lo cual permite la identificación de un número mucho mayor de bandas, debido al desdoblamiento de cada banda en sus componentes, lo cual permite detectar anomalías que no serían observadas con las técnicas comunes, permitiendo la caracterización de ciertas enfermedades y son de gran ayuda en el estudio de las neoplasias (232,233).

También se han introducido métodos que permiten la sincronización celular para obtener un mayor número de mitosis, que utilizan ametopterina o un exceso de bloqueadores de timina y el uso de agentes que inhiben parcialmente la condensación cromosómica (actinomicina D y bromodeoxiuridina) - - (232,233).

Los métodos de sincronización producen cromosomas con índices mitóticos más bajos, pero con un mayor porcentaje de células en estadios tempranos de mitosis. Con los métodos de bandas de alta resolución pueden obtenerse 550 bandas en metafase temprana, 850 en prometafase y aún llegar a cerca de 2,000 en profase, en lugar de las 322 por grupo haploide de la metafase media (68,219,234).

Se ha desarrollado una técnica de sincronización celular que con células normales da 12-15% de células en estadios

tempranos. Cuando el procedimiento se sigue cuidadosamente es posible obtener rutinariamente 1-3% de células en profase tardía y prometafase y 3-5% en metafase temprana y metafase media (193,232,233).

Usando un gran número de cromosomas bien bandeados -- (10%) la posición característica, ancho e intensidad de tinción de cada banda en cada estadio han sido determinados -- cuantitativamente para cada cromosoma. De estos estudios, se ha observado que las bandas en metafase son el resultado de la coalescencia de subbandas finas de los estadios tempranos y que cada banda y sus subbandas correspondientes -- mantienen una localización precisa a través del proceso de contracción cromosómica (68,146,232).

En contraste con el idiograma de la Conferencia de -- París (1971) (fig. 4 Capítulo II), las representaciones diagramáticas de los cromosomas mitóticos con las nuevas técnicas tienen las siguientes características (193,232):

1. Se visualizan 395 bandas en metafase media en lugar de 320 del esquema de París (1971). Esto puede deberse en parte al uso de una exposición corta a una dosis baja de colchicina y a técnicas de tinción para bandas G que no requieran pretratamiento.
2. Aún cuando los cromosomas representan un continuo, se ha hallado que la mayoría de los cromosomas pueden realmente -- ser clasificados por su tamaño relativo y patrones típicos de bandas dentro de cuatro categorías: metafase media, metafase temprana, prometafase y profase tardía.
3. En la descripción de los patrones de bandas, seis tonos diferentes de negro, gris y blanco se distinguen, los esquemas en cada estadio representan el número de bandas discernibles en más de un cromosoma. Cuando se clasifican en esta forma, hay aproximadamente 400 bandas por grupo haploide en

metafase media, 550 en metafase temprana, 750 en prometafase y 1000 en profase tardía. Un número adicional de bandas -- (> 200) son vistas en profases más elongadas.

Aún cuando se ha tratado de mantener el idiograma de París (1971) para la clasificación de las bandas de alta resolución se tienen algunas ambigüedades para la descripción de la localización precisa de un gen particular (193,232).

Método para obtener Bandas G con tripsina en cromosomas en prometafase (235)

Material: preparaciones cromosómicas de células en prometafase y profase tardía derivadas de cultivos a 72 h de linfocitos estimulados con fitohemaglutinina, Las células se exponen a colchicina (0.2 μ g/ml de concentración final) por 15 min antes de la cosecha. Tratamiento hipotónico con -- KCl 0.075 M y fijación en metanol-ácido acético 3:1 siguiendo el procedimiento estándar.

La aplicación de las células a las laminillas es el paso más crítico para obtener un bandeado adecuado. Es conveniente usar portaobjetos limpiados con alcohol y cubiertos con una capa delgada de agua desionizada fría, se obtienen sumergiendo los portaobjetos limpios en etanol al 95% y enjuagándolos rápidamente en agua desionizada fría. Las laminillas se colocan inmediatamente en un ángulo de 45° y la suspensión de células fijadas se gotea sobre ellos. Los portaobjetos después se lavan con fijador fresco y se dejan secar al aire. Dependiendo de la temperatura ambiente y humedad, se puede utilizar una platina caliente para acelerar el proceso. Un extendido óptimo es indicado por la apariencia definida de los cromosomas en objetivos 16x y 40x en contraste de fases. Un halo luminoso refractante alrededor del cromosoma indica que los cromosomas serán difíciles de ban-

dear con el método tripsina-Giemsa (GTG) y que las condiciones de secado deberán ser modificadas.

Bandeo cromosómico:

Antes de que las preparaciones sean sometidas a bandas GTG es necesario envejecerlas. Este proceso es temperatura dependiente y se lleva a cabo en una semana a temperatura ambiente, 3 días a 55°C, a 65°C toda la noche o a 95°C por 10-20 min. Los tratamientos con temperaturas elevadas permiten bandear pronto las preparaciones y dan resultados más consistentes con respecto a la calidad de las bandas, mientras que el almacenamiento a temperaturas más bajas por tiempos mayores tiene una influencia significativa de la humedad relativa.

Las laminillas se sumergen en tripsina al 0.05% en solución salina isotónica por 15-60 s (Seabright, 1971). El tiempo óptimo de tripsina tiene que determinarse para cada lote de laminillas. La solución de tripsina es eliminada - lavando en dos cambios rápidos de solución salina isotónica o alcohol. El alcohol (etanol 96%) detiene en forma más efectiva la acción de la tripsina, permitiendo un control más exacto de su tiempo de acción. Las laminillas se secan al aire y se colocan horizontalmente en varillas de tinción y se cubren con 5 ml de solución de tinción (1 ml de - - Wright o Giemsa y 4 ml de solución amortiguadora de fosfatos de Sorensen pH 7.0) por 90 s a 2 min. Las laminillas se enjuagan con agua desionizada. Esto reduce la precipitación de componenets de tinción. Se secan al aire y se examinan al microscopio.

Técnica de cultivo de linfocitos sincronizados con ametopte rina (193,233).

Se cultivan linfocitos de sangre periférica hepariniza

da (0.2 ml) en 5 ml de medio de cultivo RPMI 1630 ó 1340 - suplementado con 20% de suero de ternera fetal, 2% de penicilina-estreptomicina (5,000 U/ml de penicilina y 500µg/ml de estreptomicina) y 0.2 ml de fitohemaglutinina M por - - 72 h a 37°C. Después se adiciona ametopterina (metotrexate) a una concentración final de 10^{-7} M (50 µl de una solución 10^{-5} M a cada 5 ml de cultivo) para inducir la sincronización. Después de 17 h de incubación a 37°C, las células son liberadas del bloqueo mediante dos lavados con medio no suplementado a incubadas nuevamente en medio completo con - - - - 10-12 µg/ml de BUdR por 5 h (puede utilizarse timidina - - 10^{-5} M, 1% de una solución 10^{-3} M). Durante los últimos - - 9 - 10 min se exponen a una concentración final de colcemida de 0.5 µg/ml (50 µl de una solución de 10 µg/ml) a cada -- 10 ml de cultivo) a 37°C o a temperatura ambiente.

Se transfiere a tubos cónicos de centrifuga de 15 ml y se centrifuga a 200xg durante 8 min. Las células suspendidas de nuevo se incuban en KCl 0.074 ó 0.075 M por 10 min a 37°C, se centrifugan a 200xg durante 5 min y se resuspenden en fijador fresco (metanol-ácido acético 3:1). El fijador se adiciona gota a gota mientras las células son agitadas. Se dejan en el primer fijador por 20-30 min a temperatura ambiente, después de lo cual se les dan seis cambios de fijador por 20-30 min a temperatura ambiente, después de lo cual se les dan seis cambios de fijador. Si es posible las preparaciones cromosómicas deben hacerse inmediatamente; en caso contrario, se tapan los tubos con parafilm y se refrigeran. Antes de hacer las laminillas se dejan a temperatura ambiente y se les dan 2-3 cambios de fijador fresco, posteriormente las células se resuspenden en metanol-ácido acético 6:1 a una concentración muy diluida y se gotean desde una altura de 75 a 90 cm en laminillas lavadas en etanol al 70% colocadas en un ángulo de 30°. Dos o tres gotas en cada

laminilla dan generalmente un extendido excelente. Para cada muestra deben probarse laminillas frías húmedas y secas a temperatura ambiente.

Las preparaciones se tratan para obtener bandas R o G: Para bandas R se pueden teñir directamente en naranja de acridina al 0.05% en amortiguador de fosfatos 1/15M por 18 min a temperatura ambiente. Para obtener mejores resultados se pueden emplear laminillas envejecidas por 7-14 días.

Para bandas G se tiñen de 2-4 min con Wright (3 ml de amortiguador de fosfatos 0.06 M pH 6.8 + 1 ml de solución - stock de Wright al 0.25% en acetona anhidra libre de metanol) El tiempo exacto de tinción es muy importante y se requieren varios intentos para determinarlo ya que puede variar con la concentración del colorante, la edad de las laminillas, la forma de preparación, la temperatura y la humedad.

Las laminillas teñidas se lavan con agua y se montan.- Las laminillas pueden teñirse antes de 7-14 días de envejecimiento. Si las bandas no están contrastadas y definidas se dejan envejecer más. Las laminillas no teñidas adecuadamente pueden mejorar lavando y retiñendo. Por ejemplo lavando por algunos minutos al chorro de agua y retiñendo - - 30-60 s y volviendo a lavar.

Bandas R de alta resolución a partir de cultivos sincronizados con timidina (234).

Después de 72 h de cultivo de rutina de muestras de linfocitos de sangre periférica heparinizada, se adiciona timidina a una concentración final de 300 μ g/ml de medio de cultivo, después de 16-18 h de incubación a 37°C se lava dos veces en medio de cultivo y se reincuba por 5-8 h en medio con

50 μ g/ml de BUdR. Después se cosecha lavando dos veces en solución de Hank y dando tratamiento hipotónico con KCl - 0.075M. Se dan tres cambios de fijador 3:1 y 2:1. Las preparaciones cromosómicas se hacen goteando la suspensión de células sobre laminillas frías perfectamente limpias y con una película de agua destilada. Para obtener un mejor extendido de las metafases se secan a 90°C por 5 min.

Las laminillas se tiñen con naranja de acridina - - (0.005% pH 6.7) por 5-10 min, se montan en amortiguador y se observan al microscopio equipado con iluminación fluorescente.

Bandas R y G de alta resolución en la misma preparación - (236).

Después de 72 h en cultivo se adiciona a los linfocitos BUdR a una concentración final de 200 μ g/ml, por aproximadamente 15-17 h (toda la noche). Posteriormente las células se lavan dos veces con medio (TC 199) y se incuban de nuevo con medio completo (TC 199 + suero humano + - - 0.3 μ g/ml de timidina) por 6-7 h. Se cosecha en la forma habitual, aumentando el número de cambios con fijador para obtener una mejor separación de los cromosomas.

Pueden utilizarse las siguientes tinciones:

- a) Tinción con naranja de acridina: 20 min en una solución 0.05 μ g/ml en amortiguador de fosfatos pH 5, se lavan y montan en amortiguador.
- b) Giemsa después de naranja de acridina. Las mitosis observadas bajo luz U.V. son tratadas en solución salina -- amortiguada de Earl pH 6.5 a 87°C por 10-60 s y teñidas con Giemsa.
- c) Giemsa después de tinción con Hoechst 33258. Se tiñe -

15 min en Hoechst 33258 a una concentración de 1 μ g/ml en 2xSSC, amortiguador o agua. Las laminillas montadas en 2xSSC se exponen por 30-90 min bajo una lámpara de vapor de mercurio HBO 200 a una distancia de 30 cm. Se puede usar una lámpara U.V. bactericida por 24 h. Las laminillas se enjuagan y se tiñen por 7 min en Giemsa al 1.5%. Sin ningún otro tratamiento se observan buenas bandas; sin embargo, para un mejor contraste puede ser necesario tratarlas antes de teñir con 2X SSC por 1 hr a 60°C para mejorar bandas G y con solución salina amortiguada de Earl por 5-20 s a 87°C para obtener mejores bandas R.

Tratamientos y tinciones sucesivas pueden realizarse para lograr más detalles en ciertos segmentos cromosómicos.

9. METODOLOGIA EMPLEADA EN EL LABORATORIO DE CITOGENETICA DEL SERVICIO DE GENETICA DEL HOSPITAL GENERAL DE MEXICO S. S. A.

La metodología que se desarrolla en el laboratorio de citogenética del servicio de Genética Médica del Hospital General de México S.S.A. cubre fundamentalmente funciones asistenciales. Los métodos que se emplean son sencillos y económicos, debido a que el volumen de pacientes que se reciben es considerable y el presupuesto con que se cuenta es bajo. Como rutina se realiza cariotipo por la técnica habitual a partir de cultivos de linfocitos de sangre periférica, en pacientes con trastornos del sistema hematopoyético en médula ósea y en algunos casos de esterilidad masculina se realiza meiosis a partir de biopsia de testículo.

Se utilizan métodos de bandas G y C en aquéllos casos en que se detectaron anomalías estructurales o numéricas por

el método habitual, para identificar al o los cromosomas implicados. También se bñdean los cariotipos de pacientes -- con retraso mental y aborto habitual aún cuando no se hallan observado anomalías aparentes.

En casos especiales, que presentan aberraciones cromosómicomicas complejas que no pudieron ser caracterizadas con los métodos anteriores se recurre a otros métodos de bandas más específicos para lograr su caracterización precisa.

En pacientes con problemas de diferenciación sexual se realiza una sexocromatina como examen preliminar esperando -- siempre a tener el resultado del cariotipo.

A. Sexocromatina (cromatina X) en células de descamación de la mucosa oral.

1. Raspar la mucosa interna de la mejilla con un abatelen--guas, una espátula metálica o un portaobjetos limpio. -- Desechar el primer raspado y repetir la operación.
2. Hacer un frotis con el raspado sobre un portaobjetos lim--pio y desengrasado. Añadir una o dos gotas de solución de aceto-orceína. Colocar un cubre objetos. Eliminar el exceso de colorante.
3. Observar al microscopio. La cromatina X o corpúsculo de Barr se aprecia como una partícula intensamente teñida -- adherida a la membrana nuclear y que no desaparece al mo--ver el micrométrico del microscopio. En mujeres normales el número promedio de células con cromatina X es de 18 -- 60%.

Solución de aceto-orceína para cromatina X.

Colocar un gramo de orceína en 50 ml de ácido acético glacial. Agitar durante dos horas con calor sin que llegue a ebullición (40-50°C). Aforar a 100 ml con metanol absoluto y agitar durante 30 min. Filtrar para eliminar precipitados del colorante.

B. Métodos para obtener preparaciones cromosómicas.

a. Cariotipo en linfocitos de sangre periférica.

1. Tomar sangre en condiciones estériles en jeringa heparinizada.
2. Colocar 7-9 gotas de sangre en 5 ml de medio de cultivo (0.5 ml de suero de ternera fetal (10%) + 4.5 ml de medio de cultivo de Mc Coy 5a + penicilina 2,000 U/ml + estreptomicina 275 μ g/ml + 0.2 ml de fitohemaglutinina M). Preparar 2 frascos para cada paciente.
3. Incubar durante 70 h - 70 h y media a 37°C Adicionar -- 0.5 ml de solución de colchicina al 0.2 % (en agua destilada estéril), e incubar por 1.5 - 2 h 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 min.
5. Decantar el sobrenadante y resuspender el botón. Agregar 5 ml de solución hipotónica (KCl 0.075M) a 37°C agitando en el vortex. Dejar reposar durante 20 min a 37°C.
6. Centrifugar a 3,000 rpm durante 5 min decantar el sobrenadante y agregar gota a gota y agitando en el vortex 5 ml de fijador fresco (metanol-ácido acético 3:1). Dejar reposar durante 30 min a temperatura ambiente.
7. Centrifugar a 3,000 rpm durante 5 min, eliminar el sobrenadante y resuspender en 5 ml de fijador. Centrifugar nuevamente. Repetir esta operación cuantas veces sea necesario para obtener un botón blanco y un sobrenadante transparente (4 veces aproximadamente).

8. Para hacer las preparaciones decantar el sobrenadante -- y adicionar 10 gotas de fijador para resuspender. Tomar con la pipeta pasteur y dejar caer 2-3 gotas sobre cada laminilla perfectamente limpia y desengrasada desde una altura de 10-15 cm. Dejar secar al aire.
9. Teñir con Giemsa durante 5 min (3ml de Giemsa + 47 ml de amortiguador de fosfatos pH 6.8 o agua destilada). Lavar con agua corriente y dejar secar.
10. Observar al microscopio. Si las metafases están muy cerradas se pueden abrir haciendo las laminillas desde una altura mayor o dando más cambios de fijador. En ocasiones es necesario hacer las laminillas a la flama (sobre portaobjetos bañados en alcohol al 70% y pasando por la flama para secar). Si por el contrario las metafases es tán rotas, es posible refrigerar el botón para que se -- cierren las mitosis durante toda la noche y posteriormente hacer las laminillas.

De cada paciente se analizan al microscopio 11 metafases. En casos de mosaicos se cuentan 50 metafases para conocer la proporción de células normales y anormales.

b. Cariotipo en médula ósea (237).

1. Agregar 0.2-0.5 ml de aspirado de médula ósea hepariniza_ do a 10 ml de la siguiente solución: 9 partes de KCl -- 0.075 M + 1 parte de solución de tripsina-EDTA al 0.25% + colchicina a una concentración final de 0.08 μ g/ml; la cual se pone previamente a 37°C.
2. Incubar a 37°C durante 30 min. Vaciar a tubos cónicos de centrifuga y centrifugar a 3,000 rpm durante 5 min.
3. Decantar el sobrenadante, suspender de nuevo el botón y fijar en metanol-ácido acético 3:1 fresco. Dejar reposar 30 min a temperatura ambiente.

4. Centrifugar a 3,000 rpm durante 5 min y suspender de nuevo en fijador. Repetir cuantos cambios sean necesarios (8 aproximadamente).
5. Las preparaciones se hacen por secado al aire o a la flama, obteniéndose mejores resultados a la flama. Se tiñen con Giemsa (3ml de Giemsa + 47 ml de agua destilada o -- amortiguador de fosfato pH 6.8) durante 5-8 min.
6. Se observan al microscopio y se analizan.
7. Parte de las laminillas se someten a técnicas de bandas G para tener un análisis más preciso.

c. Meiosis masculina en biopsia de testículo (238).

1. Colectar la biopsia de testículo en solución hipotónica (citrato de sodio al 1%) a 37°C.
2. Incubar a 37°C durante aproximadamente 30 min. Después de lo cual, cortar los túbulos muy finamente con unas tijeras o una hoja de bisturí en una caja Petri.
3. Pasar la suspensión con una pipeta pasteur a un tubo cónico y centrifugar a 1,500 rpm 10 min (suspensiones más ligeras dan mejores resultados).
4. Decantar el sobrenadante, dejando sólo citrato suficiente para cubrir las células y suspenderlas de nuevo agitando el tubo.
5. Agregar fijador (metanol-ácido acético glacial 3:1) despacio por la pared del tubo hasta tener el doble del volumen, pipetear energicamente para romper acumulos de células. Completar con fijador 5 ml. Centrifugar 10 min a 1,500 rpm
6. Decantar el sobrenadante. Agregar 5 ml de fijador y dejar a temperatura ambiente por 30 min. Centrifugar 10 min a 1,500 rpm. Repetir uno o dos cambios más de fija-

dor.

7. Para hacer las laminillas agregar 1 ml de fijador para resuspender. Hacer las laminillas y dejar secar al aire. Teñir con Giemsa durante 5 min (3ml de Giemsa + 47 ml de amortiguador de fosfatos pH 6.8 o agua destilada). Lavar con agua corriente. Dejar secar.
8. Observar al microscopio para identificar los diferentes estadios la meiosis masculina.

C. Métodos de Bando.

a. Bandas G.

Las preparaciones cromosómicas se secan al aire y se dejan envejecer durante una semana. Se colocan las laminillas por aproximadamente 30-45 s en una solución que contiene 3 ml de solución de tripsina al 1% + 47 ml de amortiguador de fosfatos pH 6.8 en baño maría a 37°C.

Se lavan con solución salina isotónica y posteriormente en agua corriente. Se tiñen durante un minuto en Giemsa (3ml de Giemsa + 47 ml de amortiguador de fosfatos pH 6.8) Lavar con agua corriente y secar.

Se observan al microscopio y se localizan metafases bien bandeadas y con cromosomas separados para analizarlas al microscopio. Algunas veces el análisis se facilita recurriendo a la fotografía.

Nota: Los tiempos de tripsina deben probarse para cada caso.

Solución de tripsina al 1%.

Se disuelve un gramo de tripsina en 100 ml de amortiguador de fosfatos 0.01 M a pH 6.8 libre de calcio y magnesio - (con EDTA al 0.02%) Agitar durante 5-6 h en agitador magnético. Filtrar y fraccionar en alícuotas pequeñas (5-10 ml para guardar congelada).

Solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8 (Sorensen).

KH_2PO_4 - 6.63 g
 Na_2HPO_4 - 2.56 g
 H_2O cbp - 1,000 ml.

b. Bandas C.

1. Colocar las laminillas en HCl 0.2 N por 15-30 min
2. Lavar con agua destilada
3. Colocar en $\text{Ba}(\text{OH})_2$ (0.065 M) a 37°C por 15-30 min
4. Lavar con agua destilada a 37°C
5. Colocar las laminillas en 2xSSC (8.82 g de citrato de sodio + 17.53 g de NaCl en 1,000 ml de agua destilada) a 60°C durante 2 h.
6. Lavar con agua destilada a 60°C y con agua corriente.
7. Teñir en Giemsa (5ml de Giemsa + 45 ml de buffer de fosfatos pH 6.8)
8. Observar y analizar al microscopio.

VII. APLICACIONES CLINICAS .

La herencia de ciertas características fenotípicas ha sido reconocida por siglos, pero no fue sino hasta 1911 cuando se supo que los genes están arreglados linealmente en los cromosomas. Este descubrimiento fue seguido de otros tales como el número cromosómico humano y la asignación de cuadros clínicos a aberraciones cromosómicas específicas. La citogenética pronto alcanzó una gran importancia en el diagnóstico y comprensión de enfermedades, llevando al desarrollo de nuevos métodos simplificados de análisis cromosómico. El estudio de cromosomas a nivel del ADN podría proveer un nuevo indicio de la expresión genética y permitiría establecer una correlación entre el fenotipo y el genotipo.

La comprensión de la enfermedad genética debe incluir la identificación de la mutación a nivel de la secuencia de ADN y el análisis de las consecuencias de este cambio que producen los signos y síntomas clínicos observables. La lesión genética puede deberse a una delección, una mutación puntual o a una transposición en un gen estructural o en una secuencia de ADN con funciones regulatorias. Estas alteraciones resultarían en una modificación a nivel de transcripción a ARN, en su procesamiento o en la traducción a proteínas (239).

Es por esto que el conocimiento de la organización y estructura del genoma humano permite un mejor entendimiento de sus funciones y por consiguiente de su patología.

La citogenética junto con las técnicas modernas de la genética molecular tiene una función muy importante dentro de la genética clínica, ya que permite la identificación in-

dividual de los cromosomas y de regiones específicas de --- ellos, así como la localización geográfica del material genético en los cromosomas, permitiendo el estudio visual de un locus en particular, de su actividad y aún de su secuencia nucleótidos y forma de organización. En la actualidad se conoce la localización bastante precisa de aproximadamente 450 genes y la secuencia de nucleótidos de algunos segmentos del genoma y por otra parte se conocen más de 3,000 enfermedades hereditarias que siguen patrones mendelianos -- (240) (tabla 10).

En el último cuarto de siglo se han visto anomalías relacionadas con cambios en prácticamente todos los cromosomas. Además de los síndromes por anomalías cromosómicas descritos en el período pre-bandas (1956-1970), se han descrito otros incrementando su número. Las investigaciones citogenéticas son importantes en la determinación de los factores causales de los disturbios del desarrollo sexual, retardo mental, malformaciones congénitas múltiples, abortos espontáneos de repetición y procesos malignos (241).

El desarrollo de nuevas técnicas citogenéticas ampliará el conocimiento de la estructura y función cromosómica que son vitales para la solución de algunos problemas básicos de la biología, tales como los procesos que transforman a una célula normal en maligna y los procesos responsables del envejecimiento celular. Una clarificación de la naturaleza de los polimorfismos cromosómicos y el establecimiento de frecuencias en diferentes poblaciones será necesario para estudiar su ligamiento con rasgos patológicos. El uso de enzimas de restricción y tecnología de ADN recombinante permitirá el delineamiento de nuevos síndromes y la localización de los genes responsables en regiones cromosómicas específicas, así como el establecimiento de frecuencias de recombinación.

TABLA 10

I. NUMERO DE LOCI AUTOSOMICOS Y DEL CROMOSOMA X ASIGNADOS (1981)
(240).

ASIGNACIONES AUTOSOMICAS			ASIGNACIONES AL CROMOSOMA X		
Confirmadas	Provisionales	Inconsistentes	Confirmadas	En el límite	TOTAL
180	120	45	116	118	579

II. NUMERO DE LOCI IDENTIFICADOS POR FENOTIPOS MENDELIANO (1981)
(240).

	CONFIRMADOS	PROBABLES
Autosomicos dominantes	918	883
Autosomicos recesivos	601	692
Ligados al X	116	123
TOTAL	1,635	1,698

TOTAL GENERAL 3,333

1. SINDROMES SECUNDARIOS A ANOMALIAS CROMOSOMICAS.

En general las enfermedades genéticas se consideran relacionadas con genes mutantes simples, defectos cromosómicos o herencia multifactorial.

Las anomalías cromosómicas ocurren en 1-2% de recién nacidos vivos, siendo similar la proporción entre anomalías numéricas y estructurales (2,242,243). La frecuencia de aberraciones de los sexocromosomas es de 2.6 por 1,000 nacimientos y la de los autosomas es de aproximadamente 5.75 por 1,000 (2,242). Dentro de las aberraciones numéricas, las trisomías de los autosomas y las aneuploidías de los cromosomas sexuales ocurren con aproximadamente la misma frecuencia, siendo las más comunes la trisomía 21 (1/700-800 nacimientos) y el 47, XXY(1/900) (2,242). El rearrreglo estructural más común es la translocación robertsoniana o fusión céntrica entre dos cromosomas acrocéntricos, en particular entre los cromosomas del grupo D (principalmente 13/14), - siendo su frecuencia de aproximadamente 1/1,200 nacimientos (242). En la tabla 11 se muestran las frecuencias de alguna de las aberraciones cromosómicas más comunes en recién nacidos (242).

En general una anomalía cromosómica, ya sea en número o estructura, que produzca un desbalance genético (por pérdida, ganancia o rearrreglos del material genético) producirá un desarrollo embrionario anormal, lo cual conducirá a diferentes malformaciones que dependerán de los cromosomas y de la cantidad de material genético involucrados. De las anomalías cromosómicas, únicamente condiciones trisómicas de algunos autosomas son compatibles con la vida, ya sea en forma pura, como mosaicos o trisomias parciales. Tres de ellas están bien establecidas, las de los cromosomas 21,-

TABLA 11

FRECUENCIA DE ALGUNAS ABERRACIONES CROMOSOMICAS EN
 REGION NACIDOS VIVOS (242)

AUTOSOMAS		SEXOCROMOSOMAS*	
Cariotipos	Frecc/1,000	Cariotipos	Frecc/1,000
+ 21	1.25	47,XXY	1.13
+ 18	0.15	47,XYY	1.02
+ 13	0.08	47,XXX	1.08
Deleciones	0.09	45,X	0.39
t D/D	0.79		
t D/G	0.20		
Translocaciones			
Recíprocas	0.85		

Se incluyeron mosaicos

18 y 13 en forma pura, otras como la trisomía 8 en forma de mosaico y la 22 en forma pura o mosaico.

Como se observa en la tabla 11, las aneuploidías de los cromosomas sexuales (47, XXX; 47, XXY; 47, XYY) son frecuentes en cambio la única monosomía compatible con la vida es la del cromosoma X (45, XO) o síndrome de Turner. Las monosomías de los autosomas se abortan muy tempranamente y solo se han descrito algunos casos de monosomía 21, aparentemente pura, aunque no puede descartarse que se trate de mosaicos no detectados (1, 2, 244).

La frecuencia de anomalías cromosómicas se eleva considerablemente al estudiar material de abortos espontáneos, llegando a ser de 20 a 50% según diferentes reportes (2, 243, 245). De éstos las trisomías autosómicas constituyen la mayor parte (40-50%) siendo las más frecuentes las del cromosoma 16, seguidas de las monosomías X (45, XO) y las triploidías (20-25% en ambos casos) (2, 245).

Los datos combinados de estudios en recién nacidos vivos y en productos de aborto espontáneo permiten concluir que aproximadamente 4-20% de todas las concepciones son cromosómicamente anormales y que en 90% de los casos se abortan espontáneamente durante el primer trimestre del embarazo (2, 243, 246). Estas incluyen todas las triploidías, tetraploidías y monosomías autosómicas, la mayoría de las trisomías autosómicas (excepto para el 21), algunos mosaicos y rearrreglos estructurales y raramente aneuploidías de los cromosomas sexuales, con excepción del síndrome de Turner (45, XO) cuyo rango de supervivencia es de 1 en 300 (2, 245).

Las triploidías y tetraploidías puras en el hombre son incompatibles con la vida, sin embargo, éstas han sido repor

tadas ocasionalmente, limitándose su supervivencia a unas horas (243). Estos recién nacidos presentan gran variedad de malformaciones congénitas tales como retraso en el desarrollo intrauterino, defectos esqueléticos, anomalías genitales y en aquellos casos que sobreviven (mosaicos) -- existe retraso mental (247). Los estudios citogenéticos en abortos espontáneos indican que las triploidias son relativamente comunes en el hombre, llegando a 1% de todas las concepciones, pero la mortalidad embrionaria sobrepasa el 99% (243, 247, 248).

Algunos posibles mecanismos se postulan para explicar la ocurrencia de triploidia en el hombre. Los cigotos triploides con complementos cromosómicos sexuales XX, XXY, XYY pueden ocurrir a través de :

- 1) un error mitótico en precursores de células germinales llevando a la formación de un gameto diploide.
- 2) incorporación o supresión de un cuerpo polar o supresión de la primera o segunda división meiótica materna.
- 3) fertilización del óvulo por dos espermatozoides (dispermia) o por un espermatozoide diploide producido a través de un error en la primera o segunda división meiótica paterna.
- 4) un error mitótico inicial resultando en duplicación y no división de los pronúcleos femenino o masculino (249).

Las tetraploidías con complemento cromosómico sexual XXXX o XYYY ocurren con la misma frecuencia y por lo tanto se postula como el mecanismo más probable para su formación la duplicación normal de los cromosomas en la primera mitosis y la supresión de la ruptura del cigoto (248).

El uso de las técnicas de bandas ha permitido estudiar

el origen de las triploidías y tetraploidías en el hombre, demostrando que los factores paternos, principalmente dispermia, son las fuentes predominantes de triploidias en el hombre (248).

Una anomalía cromosómica no necesariamente implica un defecto cualitativo de los genes, pero si una anomalía cuantitativa en sus funciones. El problema básico es un disturbio en el balance genético que altera los mecanismos de control que regulan la morfogénesis. El resultado es la ocurrencia de malformaciones múltiples. Generalmente defectos simples no llevan a la identificación de cambios cromosómicos y éstos sólo pueden relacionarse con grupos de malformaciones o síndromes (241).

Las anomalías cromosómicas pueden ocasionar alteraciones en mayor o menor grado en todas las células y tejidos del cuerpo, estas deficiencias pueden ser bioquímicas, morfológicas o funcionales. Dependiendo de los cromosomas involucrados y de la cantidad de material genético activo en exceso o ausente, será posible o no la vida postnatal. La mayor parte de las aberraciones cromosómicas de los autosomas se acompañan de defectos esqueléticos y cardíacos, facies característica, y retraso psicomotor y mental (2, 243). Las anomalías autosómicas invariablemente causan subnormalidad mental, la cual parece ser proporcional a la cantidad de material genético activo que produce las alteraciones del balance genético activo (2, 241).

En material de abortos espontáneos se han reportado trisomias para casi todos los autosomas, excepto para el 1, 5 y 17 (67, 246). La distribución de trisomías autosómicas que viven lo suficiente para ser reconocidas y estudiadas citológicamente no es al azar (tabla 12). Esto puede deberse a la formación diferencial de gametos no balanceados. Uno de los factores que afecta la no disyunción es el

TABLA 12

FRECUENCIA DE TRANSLOCACIONES AUTOSOMICAS EN MATERIAL
DE 349 ABORTOS ESPONTANEOS (67)

GRUPO	TRISOMIA	FRECUENCIA	GRUPO	TRISOMIA	FRECUENCIA	
A	1	0	D	13	12.3*	
	2	12		14	32	
	3	2		15	32	
B	4	4	E	16	104	
	5	0		17	0	
C	6	1	F	18	23.5*	
	7	14		19	1	
	8	15		20	5	
	9	12		G	21	59.5*
	10	10			22	37
	11	1				
	12	3				

Se añadieron los números estimados de recién nacidos vivos.

número y distribución de quiasmas meióticos en los bivalentes. En el hombre, los quiasmas, parecen formarse de acuerdo con el tamaño cromosómico, lo que significa que cromosomas del mismo tamaño tendrán la misma frecuencia de quiasmas y el rango de no disyunción debería ser comparable. Sin embargo, la incidencia de abortos trisómicos es diferente aún para cromosomas cuya tendencia a la no disyunción debería ser la misma (67).

Los gametos nulisómicos deben formarse con mayor frecuencia que los disómicos, ya que son producidos por no disyunción o pérdida cromosómica, mientras que los disómicos sólo se forman por no disyunción. Debido a que prácticamente no se han encontrado monosomías autosómicas en material de aborto, es obvio que la selección para la viabilidad determina principalmente cuales cigotos se desarrollarán lo suficiente para que el embarazo sea reconocido. Así la diferencia en la frecuencia de abortos trisómicos reconocibles para cromosomas de tamaño comparable, debe reflejar la viabilidad del embrión (67).

Para explicar el hecho de que sólo trisomías para tres autosomas, 21, 18 y 13, ocurran con una frecuencia apreciable en recién nacidos vivos, se han postulado varias hipótesis: Patau (1963) presentó un modelo de trisomías letales: genes que en condición trisómica matarían al embrión antes del nacimiento (249). Posteriormente Yunis (1965) se señaló que estos tres cromosomas son de replicación relativamente tardía, característica de heterocromatina, siendo también los más brillantes con bandas Q dentro de su grupo (30, 57, 68).

Otras observaciones apoyan que las regiones de bandas Q oscuras son especialmente ricas en genes. Los síntomas -

característicos del síndrome de Down parecen ser producidos por el segmento Q oscuro distal del cromosoma 21 (21 q 22) mientras que trisomias de la región proximal brillante son únicamente responsables de ligero retraso mental, ocurriendo lo mismo con la monosomía para esta banda. Esto mismo se puede correlacionar con bandas G de alta resolución (67,68).

En el síndrome de Down el grado de defecto mental y otras malformaciones varía grandemente. Se considera que el cromosoma 21 es relativamente inerte genéticamente; su fluorescencia es alta comparada con la del cromosoma 22, lo que parecería apoyar este concepto. En otras trisomías autosómicas el grado de malformaciones y defecto mental es mucho más profundo, el cerebro está más afectado en el Síndrome de Patau (trisomía 13) que en el síndrome de Edwards (trisomía 18) viéndose otra vez la relación con el tamaño cromosómico y la cantidad de material genético activo (2).

Korenberg y cols. compararon la viabilidad de segmentos cromosómicos humanos encontrados como monosomias o trisomias. Con anterioridad habían demostrado que las regiones Q relativamente brillantes son significativamente más viables, medidas por la existencia de individuos anormales con deleciones o translocaciones no balanceadas que involucran regiones cromosómicas específicas. Un buen ejemplo de este concepto es la frecuencia de trisomias y monosomías parciales del cromosoma 18 el cual es relativamente brillante comparado con los cromosomas 17, 19 y 20 que son más oscuros. Similarmente, la frecuencia de condiciones no balanceadas es relativamente alta para segmentos Q brillantes de los cromosomas 4 y 5 si se comparan con los cromosomas 3 y 6 que son de tamaño similar (67).

Las variadas técnicas de bandeo cromosómico han abierto

una nueva era en el estudio de diferencias longitudinales en los cromosomas, sin embargo, aún segmentos con bandas similares, pueden ser funcionalmente distintos y llevar a diferenciación de ciertas regiones cromosómicas con mayor detalle que el que proporcionan las características tintoriales. Esto debe esperarse dado que las regiones cromosómicas muestran patrones no al azar con respecto a varios fenómenos y proveen evidencias de diferencias en función y posiblemente en estructura. Esto es demostrado por la mayor frecuencia de trisomias para aquellos cromosomas con bandas Q más brillantes (67).

La densidad y posiblemente las funciones críticas de los genes en las "manchas calientes" (regiones cromosómicas que tienen una densidad de quiasmas mayor de 5) explicarían sus efectos letales en embriones trisómicos. Las "manchas calientes" corresponderían a las trisomias letales de Patau. Posiblemente estas regiones contengan genes repetidos debido a su densidad génica ya que en la interfase están en forma de asas a diferencia de otros segmentos cromosómicos, lo que explicaría la alta frecuencia de quiasmas mitóticos en ellas. Se conocen 6 "manchas calientes" prominentes en 3p, 6p, 11q, 12q, 17q y 19 (p ó q) (67).

Las anomalías estructurales de los cromosomas son producto de rupturas que conllevan a pérdida de material produciendo falta de balance genético. Cuando ocurren rupturas en dos cromosomas, pueden establecerse rearrreglos o translocaciones balanceadas y no producir efectos fenotípicos en los individuos portadores, sin embargo, es probable que produzcan gametos no balanceados durante la meiosis. Los diferentes rearrreglos cromosómicos: translocaciones, isocromosomas, pérdidas o deleciones, duplicaciones, inversiones, etc. pueden dar lugar a una gran variedad de -

individuos no balanceados en los cuales se observan monosomías o trisomías parciales o puede estar alterado únicamente el orden lineal de los genes.

Los cromosomas acrocéntricos (grupos D y G) pueden estar involucrados en translocaciones robertsonianas y tienen un significado clínico particular ya que dos de ellos están involucrados en trisomías autosómicas viables (trisomías 13 y 21). Estos rearrreglos son los más comunes en el hombre, aún cuando difieren las frecuencias con que están involucrados cromosomas específicos (55).

En las translocaciones robertsonianas con formación de dicéntricos, la cantidad de ADN satélite es menor que en los homólogos normales, pero no está ausente, indicando su localización entre el centrómero y la región de organizadores nucleolares y demostrando que los puntos de ruptura ocurren en el ADN satélite. En cambio en las translocaciones robertsonianas con formación de monocéntricos, hay ausencia de ADN satélite del cromosoma que perdió el centrómero. La mayor frecuencia de este tipo de rearrreglos puede explicarse por remanentes de actividad nucleolar y por la pérdida de ADN satélite, aparentemente sin funciones génicas y de genes ribosomales los cuales se encuentran en copias múltiples (30,54,55).

La frecuencia de rearrreglos estructurales en material de abortos es de aproximadamente 2.5% y en una pequeña proporción de casos (0.8%) éstos son heredados (245). En recién nacidos vivos su frecuencia es 0.3% (242).

Una mayor información de la frecuencia y rangos de mutación de rearrreglos estructurales cromosómicos en el hombre se ha obtenido de estudios en recién nacidos vivos. Sorprendentemente poca atención se ha puesto a estas anomalías en material de abortos espontáneos a pesar de que su frecuencia es

aproximadamente 10 veces mayor. Anomalías cromosómicas estructurales se encuentran en 1.2% de todos los abortos espontáneos clínicamente reconocibles (250).

Los rangos de mutación gamética de rearrreglos cromosómicos estructurales ha sido estudiada en base a estudios en recién nacidos vivos y abortos espontáneos. El rango de mutación para los rearrreglos que sobreviven hasta que sea reconocida la concepción es de 2.20×10^{-4} para rearrreglos balanceados, 3.54×10^{-4} para translocaciones robertsonianas no balanceadas y 3.42×10^{-4} para rearrreglos no robertsonianos no balanceados. Esto da un rango de mutación para todos los rearrreglos estructurales de aproximadamente 1×10^{-3} . El rearrreglo simple más común es la translocación robertsoniana entre los cromosomas 13 y 14 con un rango de mutación de 1.2×10^{-4} (250).

Las translocaciones robertsonianas tienen una frecuencia ligeramente mayor en abortos espontáneos que en recién nacidos vivos, al igual que el resto de las translocaciones balanceadas. Este exceso puede deberse a nuevos mutantes en translocaciones recíprocas de novo aparentemente balanceadas que son incompatibles con la vida fetal y terminan en abortos -- (250).

El uso de técnicas cromosómicas de alta resolución permite la detección de pequeñas duplicaciones y deleciones, las cuales pueden estar asociadas con anomalías clínicas leves y ligero retraso mental. También incrementan la diferenciación de una región cromosómica y permiten la detección de inversiones paracéntricas y translocaciones recíprocas involucrando regiones cromosómicas del mismo tamaño y con patrones de bandas similares (68,235).

El uso de cromosomas de alta resolución y la existencia de idiogramas que reflejen sus características, permitirá a los citogenetistas definir la localización de puntos de ruptura y reunión con mayor exactitud; permitiendo ver que las deleciones intersticiales son más frecuentes que las terminales. En general el uso de métodos de bandeo de alta resolución permitirá una mejor correlación fenotipo/cariotipo y avances en el mapeo génico regional (68,235).

Se han realizado numerosas investigaciones para conocer las causas de anomalías citogenéticas. Sin embargo, los únicos datos relevantes son la relación entre edad materna avanzada e incidencia de trisomía 21, trisomía 18 y síndrome de Klinefelter. Se supone que el óvulo envejecido presenta mayor riesgo de no disyunción (2, 251, 252). La curva de distribución de frecuencias de síndrome de Down es bimodal con un máximo a los 28 años y otro a los 36-37, correspondiendo el primero al máximo de natalidad y a la mayoría de las translocaciones esporádicas o hereditarias, el segundo esta estrechamente relacionado con la edad materna avanzada (251,252, 253). Muchos autores han tratado de relacionar edad paterna avanzada y trisomía 21, sin embargo, aún existen datos contradictorios al respecto (254,255).

2. IMPLICACIONES DE LOS POLIMORFISMOS CROMOSOMICOS EN LA GENETICA CLINICA.

Los polimorfismos cromosómicos o heteromorfismos (conferencia de París 1975) de los cromosomas humanos constituyen un campo fascinante de la citogenética. Las técnicas más usadas para su detección son: bandas Q, bandas C, bandas R y la tinción con plata para NOR de los cromosomas acrocéntricos - (21, 256).

Debido a los avances recientes en las técnicas de banda se ha incrementado el número de sitios heteromórficos reconocibles en el genoma humano y probablemente en un futuro cercano se reconocerán muchos más (21,184,235,257). El uso de múltiples técnicas de bandas consecutivamente contribuye a una mejor elucidación de la morfología de cada cromosoma, aún cuando no haya una relación directa entre el polimorfismo identificado por una u otra técnica. Los sitios heteromórficos comunes de los cromosomas humanos son los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos (13-15,21 y 22), el área centromérica de los cromosomas 3 y 4, el brazo largo del Y y las regiones de constricción secundaria de los cromosomas 1, 9 y 16. Sin embargo, cada cromosoma tiene cierto grado de polimorfismo en su banda centromérica ya sea en tamaño o posición. Sólo las formas extremas son probablemente observadas y referidas. Variantes no usuales han sido reportadas para los cromosomas 6, 11, 12, 17 y 19, etc. aparentemente sin efectos fenotípicos (21,256,257).

Los polimorfismos de los cromosomas humanos son muy variables, el cariotipo de un individuo puede ser bien caracterizado usando múltiples técnicas de manera que sea como una tarjeta de identidad única. Los polimorfismos son consistentes en una persona (sólo se han reportado unas cuantas excepciones de mosaicos somáticos) y son heredados en forma mendeliana (excepto para pocos casos documentados de variaciones de novo) (256,257).

Los polimorfismos se pueden usar para varios estudios tales como: mecanismos de producción de triploidias, mecanismos involucrados en la producción de mosaicos y estudio de quimeras, contaminación de cultivos de líquido amniótico por células maternas y seguir el destino de células transfundidas o transplantadas (256,257).

Los polimorfismos se han usado para establecer paternidad, y tienen una importancia particular en la medicina legal y forense y otra de sus aplicaciones es las pruebas de cigocidad en gametos. También pueden usarse extensivamente como marcadores en el mapeo génico por hibridación de células somáticas y para determinar el origen del cromosoma extra en las trisomias (256, 257)

Los sitios polimórficos del genoma son generalmente heterocromáticos conteniendo cantidades variables de diferentes clases de ADN de secuencias altamente repetitivas, algunos de ellos llamados ADNs satélite (36, 42, 47, 51, 53, 56). Se cree que estas secuencias carecen de genes estructurales, no son traducidas y son en su mayoría de replicación tardía, por lo que es tolerada una gran variabilidad. Por otra parte todo en la naturaleza tiene una razón de ser, la función de la heterocromatina aún no ha sido elucidada y muchas hipótesis se han formulado al respecto, entre éstas la hipótesis "salvavidas" (body guard) de Hsu (53, 70, 258).

Los heteromorfismos cromosómicos se consideraban sin ningún significado clínico. Sin embargo, se han acumulado una gran cantidad de datos, los cuales muestran que no son variaciones sin sentido y afectan el desarrollo normal. Esto está basado en la observación de la alta incidencia de estos heteromorfismos en individuos clínicamente anormales comparados con controles normales (256).

Obviamente el significado clínico de estos polimorfismos ha sido estudiado por varios autores y se han implicado en: infertilidad, malformaciones congénitas, retraso mental y cáncer. Las conclusiones no son unánimes y pueden resultar controversiales y los mecanismos son inciertos. Hay pocas posibilidades de comparar un estudio con otro ya que se utilizan diferentes técnicas y criterios de evaluación y además debe considerarse una variabilidad étnica, por lo que para cada

grupo étnico se requiere un grupo control que marque la frecuencia de estos polimorfismos en la población normal (256).

La incidencia de polimorfismos cromosómicos en recién nacidos vivos se ha estimado en 17.8 por 1,000, siendo las más comunes variaciones en el tamaño de los brazos cortos y satélites en los cromosomas acrocéntricos y del cromosoma Y particularmente en su longitud (10.0 por 1,000 para Yq+ y 3.9 por 1,000 para Yq-). (242).

El Y puede observarse desde un pequeño fragmento hasta un elemento muy largo tanto en individuos fenotípicamente normales como anormales. Se ha tratado de correlacionar la presencia de un Y grande con criminalidad y agresividad, sin embargo, estos estudio no son concluyentes (256,259).

Se ha observado un incremento en el número de aborto en familias con cromosoma Y grande y la presencia de cromosomas Y pequeños en padres de niños con síndrome de Down y en casos de oligospermia severa o azoospermia, sin embargo, en otros trabajos no se encuentran diferencias entre el tamaño del Y en individuos fértiles e infértiles (256,260).

Hay evidencias sugestivas de que variaciones de brazos cortos y satélites de los cromosomas acrocéntricos pueden tener efectos en el desarrollo. En pacientes con síndrome de Down se ha encontrado una elevada frecuencia de cromosomas acrocéntricos con un incremento en el tamaño de sus brazos cortos. También se han reportado incrementos de heteromorfismos en padres de niños con síndrome de Down comparados con controles normales. Sin embargo otros autores no han encontrado esta asociación. Un estudio para relacionar CI y tamaño de satélites en niños con retraso mental o desórdenes psiquiátricos no dió resultados concluyentes (256).

Muchos estudios han reportado asociación significativa de heteromorfismos de constricciones secundarias de los cromosomas 1, 9 y 16^a anormalidades clínicas: Defectos de desarrollo similares a los síndromes de Patau y Meckel se han asignado al efecto patogénico de variantes lqh +. Se ha mostrado que heteromorfismos del cromosoma 1 predisponen a formas de malignidad principalmente en ovario, incluyendo linfomas. Un incremento en la frecuencia de constricciones secundarias prominentes de los cromosomas 1, 9 y 16 se han observado en individuos con malformaciones congénitas, desórdenes psiquiátricos y CI bajo. Estas variantes también se han encontrado con una frecuencia mayor en parejas con abortos espontáneos recurrentes (256, 261).

Existen muy pocos estudios sobre el significado clínico de los heteromorfismos de bandas Q individuales. Buscando diferencias entre polimorfismos Q en poblaciones normales y con retraso mental no se encontró ninguna asociación. También existen datos controversiales con respecto a polimorfismo del cromosoma 3 en mujeres oligofrénicas (256).

Los heteromorfismos cromosómicos sólo están asociados con malformaciones en algunos portadores. Esto hace difícil encontrar tal asociación y dilucidar los mecanismos involucrados en la producción del efecto deletéreo del fenotipo. Sin embargo los heteromorfismos cromosómicos se observan con menor frecuencia en individuos fenotípicamente normales y están aumentados en pacientes con anomalías de desarrollo. Se puede postular que el incremento en la heterocromatina y los desórdenes de desarrollo son resultado de un mecanismo común, que no está relacionado como causa y efecto, pero sí como fenómenos coexistentes (256).

Se ha sugerido que los heteromorfismos siempre involucran

regiones heterocromáticas siendo la cantidad de heterocromatina diferente en estos individuos. La cantidad de cambios en el contenido heterocromático en los límites del cariotipo normal puede correlacionarse con el fenotipo de individuos aparentemente normales en la población general y las características cuantitativas y no específicas de desórdenes del desarrollo humano son determinadas probablemente por el efecto de heterocromatina adicional (256).

La presencia de heteromorfismos puede interferir con la división celular, produciendo una disyunción anormal e interfiriendo en el desarrollo de manera similar a una "carga genética estructural". Se ha sugerido que puede producir alteraciones del desarrollo por varios mecanismos: ya sea por un cambio en posición génica, una mutación en el gen del sitio de ruptura cromosómica o por pequeñas duplicaciones o deficiencias. La presencia de grandes áreas heterocromáticas cerca de los centrómeros puede ser causa de disturbios de segregación meiótica. Las variables menores también pueden interferir la meiosis, causando mala segregación. Se ha sugerido que los polimorfismos de heterocromatina pueden alterar el apareamiento meiótico. La presencia de variantes extremadamente heteromórficas puede reducir el índice de reproducción e incrementar el riesgo de anomalías cromosómicas en la prole (256, 262).

Los heteromorfismos exhibidos por los cromosomas, se deben principalmente a cambios en la cantidad, tamaño y posición heterocromatina, influyen el sistema meiótico, el cual puede tener importantes consecuencias adaptativas o evolutivas. El proceso de desarrollo normal puede ser afectado por un cambio en la cantidad de heterocromatina que altera las propiedades de recombinación del cromosoma. Estudios meióticos en individuos que exhiben heteromorfismos pronunciados del cario-

tipo pueden ayudar a entender el papel de estos heteromorfismos en el desarrollo normal (53, 67, 70, 256, 257).

Las diferentes clases de ADN repetitivo están distribuidas en forma no equitativa en diferentes cromosomas y sería razonable pensar que cada clase tuviera un umbral y una función particular. Un mejor entendimiento de este campo se alcanzará probablemente cuando sean posibles determinaciones más exactas a nivel molecular (53, 70, 257).

Se ha sugerido que la presencia de variables no usuales puede por sí misma ser evidencia de cierta inestabilidad cromosómica hereditaria. Un rango relativamente alto de rupturas en individuos portadores de polimorfismos no usuales, particularmente de las regiones de constricción secundaria de los cromosomas 1, 9 y 16 ha sido reportado, así como también se ha observado un incremento en la susceptibilidad in vitro a agentes químicos y radiaciones en tales individuos. Una explicación podría ser que cierto defecto de reparación del ADN cause inestabilidad cromosómica mayor en sitios heterocromáticos que eucromáticos del genoma. Un apareamiento anormal de las secuencias repetitivas del ADN y subsecuentemente un entrecruzamiento desigual puede ocurrir fácilmente y ser tolerado debido a que la heterocromatina no es traducida y pueden encontrarse una gran variedad de polimorfismos (257).

Los polimorfismos parecen ser heredados sin variación de una generación a otra, la inestabilidad cromosómica puede -- causar deleciones o duplicaciones mínimas, submicroscópicas e indetectables de material genético activo de genes estructurales, dando defectos congénitos y malformaciones frecuentemente encontradas en individuos portadores de variables heteromórficas. El polimorfismo en este caso es causal y no origen del defecto ya que ambos son debidos a inestabilidad cromosó-

mica. Los sitios de unión de heterocromatina-eucromatina son más susceptibles a esta inestabilidad siendo razonable pensar que cuando ocurren mutaciones, deleciones o duplicaciones euromáticas frecuentemente involucran los sitios adyacentes al área heterocromática. Esto puede explicar porque ciertos síndromes genéticos en ocasiones se encuentran asociados con variantes particulares. Otra explicación para tal asociación puede ser la influencia directa de las secuencias repetitivas (en particular cantidad y composición) en genes estructurales adyacentes sin ningún cambio real en el material euromático (257).

Debido a que el apareamiento erróneo de secuencias repetitivas de ADN con el subsecuente entrecruzamiento desigual ocurren tanto en meiosis como en células somáticas; se han reportado casos muy raros de mosaicismos somáticos de variantes heterocromáticas (257).

Hsu propuso que las grandes áreas de secuencias repetitivas no traducidas del ADN tenían la función de proteger la eucromatina de replicación temprana y más importante, por absorción de los daños del medio ambiente (hipótesis "salvavidas") (258). Esto puede ser verdad en el caso de los agentes químicos, pero un incremento en la cantidad de estas secuencias puede incrementar el riesgo cuando se considera una infección viral. Se tienen evidencias indirectas de la relación entre la cantidad de variantes heteromórficas particulares y resistencia o susceptibilidad a virus Coxsackie B. El incremento en el rango de rupturas frecuentemente encontrado en portadores de variantes heteromórficas, en lugar de ser consecuencia de una inestabilidad cromosómica heredada y de una susceptibilidad genética general puede ser el resultado de una infección latente persistente de virus lentos. Además, una infección crónica suprime la inmunocompetencia y la susceptibilidad a otras infecciones puede aumentarse también. Es

interesante señalar que la fragilidad de los bloques de heterocromatina constitutiva de los cromosomas 1, 9 y 16 se ha encontrado asociada con inmunodeficiencias selectivas o combinadas siendo la deficiencia de IgM la más común (257).

Otro cromosoma sujeto a integración viral es el Y, habiéndose reportado mayor riesgo reproductivo y defectos congénitos asociados con variantes grandes del cromosoma Y (256, 259). El incremento en la cantidad de un ADN repetitivo particular, involucrado en el polimorfismo, podría ser responsable de la pérdida reproductiva. Sin embargo, la hipótesis de un eventual favorecimiento de integración de ADN viral y no sólo la cantidad de secuencias repetitivas explicaría porque otros heteromorfismos similares del Y no están asociados con riesgo reproductivo (257).

La pérdida o ganancia de cromosomas Y en leucemias es un enigmático problema que podría deberse a integración de ADN viral en la heterocromatina del brazo largo del Y. Además se han encontrado rearrreglos estructurales del Y en leucemias mielocíticas crónicas (263).

Los polimorfismos involucrados en resistencia o susceptibilidad a ciertos virus parecen ocurrir también en los organizadores nucleolares de los cromosomas acrocéntricos, aún cuando se desconoce el mecanismo. En familias con malformaciones del sistema nervioso central (SNC) se encontró una frecuencia significativa de polimorfismos de los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos. Las malformaciones del SNC probablemente tengan un origen multifactorial y los estudios epidemiológicos apoyan el involucramiento viral, pero aún se desconoce si son virus de ARN o si el factor genético involucrado implica sensibilidad a esos virus (257).

En conclusión los defectos congénitos son eventualmente causados por infecciones virales en útero. El efecto teratogénico de tal infección viral puede ser diferente de acuerdo a la susceptibilidad o resistencia genética del embrión o a su inmunocompetencia. Todos estos factores parecen estar relacionados con polimorfismos cromosómicos en formas múltiples (257).

Los sitios frágiles de los cromosomas humanos también se han considerado como fuente de polimorfismos. Sutherland y otros autores consideran que éstos son sitios de modificación viral o integración y que los defectos congénitos encontrados en familias en donde se segregan tales polimorfismos no son específicos. La hipótesis de involucramiento viral con todas sus implicaciones (activación, replicación, susceptibilidad del huésped, inmunocompetencia, etc), puede contestar algunos enigmas con respecto a los sitios frágiles. (257,264).

La tendencia a aneuploidía en individuos portadores de variantes polimórficas ha sido evaluada y discutida. A pesar de que los resultados de diferentes estudios son controversiales, existe la creencia de que algunos polimorfismos tales como las variantes 15 p+ incrementan el riesgo de aneuploidia (257). Debido a la posible interacción entre ciertos cromosomas diferentes, la tendencia a la aneuploidia puede ser inespecífica y por otra parte, algunos reportes sugieren que el cromosoma homólogo al polimórfico puede estar preferentemente involucrado. La trisomía 9 parcial y completa se ha reportado frecuentemente en pacientes con un 9 polimórfico y se han encontrado trisomías 22 asociadas con variantes del cromosoma 22. Un incremento significativo en la incidencia de cromosomas 21 polimórficos presentando grandes NORs se ha encontrado en pacientes con síndrome de Down. Cuando los satélites son pequeños estas variantes pueden verse sin plata. Interesante

mente una alta incidencia de 21 p+ ha sido encontrada en un grupo de pacientes con cariotipos normales, pero presentando ciertas características clínicas de síndrome de Down, sin embargo, es difícil excluir a priori una influencia fenotípica del polimorfismo, lo cual no parece muy probable. Se debe tener en mente la posibilidad de un mosaico de trisomía 21 en baja proporción no detectado (257).

En conclusión, se considera que los polimorfismos cromosómicos tienen un significado clínico y que pueden, algunas veces ser responsables de defectos congénitos. Los mecanismos propuestos son sólo conjeturas y es difícil de verificarlos. A continuación se señalan algunas de ellas (257).

- 1) Un involucramiento directo, no específico, de los polimorfismos heterocromáticos puede ser su eventual influencia en los procesos metabólicos, particularmente importantes en el desarrollo embrionario.
- 2) la participación de la heterocromatina en los mecanismos de recombinación meiótica puede influenciar el desarrollo y la incidencia de aneuploidía.
- 3) los polimorfismos pueden, por sí mismos, ser la evidencia de inestabilidad cromosómica y además susceptibilidad a daño ambiental, el cual puede causar detrimento en el desarrollo embrionario.
- 4) los sitios polimórficos parecen estar involucrados, probablemente en diferentes formas, las cuales deben aún clarificarse, en susceptibilidad, resistencia y quizá integración viral; una posible relación entre infecciones virales y defectos congénitos o malformaciones es conocida (257).

3. ABERRACIONES CROMOSOMICAS EN ENFERMEDADES CON PATRONES DE HERENCIA MENDELIANA

Ciertos padecimientos que siguen patrones de herencia mendeliana pueden presentar anomalías cromosómicas - (265). Entre estos se encuentran un grupo de raros padecimientos hereditarios que en linfocitos de sangre periférica y en fibroblastos presentan una frecuencia elevada de aberraciones cromosómicas estructurales. Estos desórdenes se conocen como "síndromes de inestabilidad cromosómica" e incluyen la ataxia telangiectasia, el síndrome de Bloom, la anemia de Fanconi y el xeroderma pigmentoso. Tienen en común ser autosómicos recesivos, con una tendencia elevada al desarrollo de neoplasias así como una disposición más o menos pronunciada a presentar rupturas cromosómicas, encontrándose a menudo cuadrirradiales y manteniendo un número cromosómico diploide. En el síndrome de Bloom se ha observado también un incremento en el intercambio de cromátidas hermanas (193,265).

Se ha postulado que en estos padecimientos se encuentran alterados los mecanismos de reparación de daño producido al ADN por diferentes agentes. En el xeroderma pigmentoso no se repara adecuadamente el daño producido por luz U.V. por una actividad deficiente de la endonucleasa de reparación (99,193,265). En la ataxia telangiectasia las células tienen problemas para reparar el daño producido por rayos X. (193). En la anemia de Fanconi existe mayor susceptibilidad a agentes que producen enlaces cruzados en el ADN tales como las mostazas nitrogenadas y especialmente la luz ultravioleta y se ha postulado que la enzima con actividad deficiente es una ligasa de reparación (193,266). En el síndrome de Bloom se ha observado un movimiento lento de las horquillas de replicación durante la síntesis de ADN(193).

En la actualidad se han descrito nuevos síndromes de inestabilidad cromosómica, con cambios cromosómicos similares a los de los padecimientos anteriores, pero al parecer sin una incidencia alta de neoplasias. Entre estos están: la incontinencia pigmenti, la cual se debe a un gen dominante ligado al X, siendo letal en individuos de sexo masculino encontrándose cambios cromosómicos (gaps y otras anomalías) en mujeres afectadas y en sus madres portadoras (193).

En la esclerodermia o esclerosis sistémica progresiva cuya genética se desconoce y en casos familiares se ha dado como autosómica dominante (99,193), se encuentran rearrreglos cromosómicos en porcentajes importantes en sangre periférica también se ha observado un incremento de intercambios de cromátidas hermanas; lo que se ha utilizado para el diagnóstico temprano de la enfermedad (193). Se han propuesto varias teorías para explicar las rupturas cromosómicas en estos pacientes que incluyen: fallas en mecanismos de reparación del ADN, agentes virales y la existencia de un factor sérico de "ruptura". En los pacientes con esclerodermia se han detectado anticuerpos contra Sc170 que es una proteína de peso molecular 70,000 propia de la esclerodermia y que se encuentra asociada con una cinasa o forma la cinasa misma, la cual es capaz de fosforilar a Sc170 y a H1. Se ha postulado que en presencia de anticuerpos se bloquea la actividad de cinasa y al no haber fosforilación de H1 se tiene una menor condensación de la cromatina, lo que podría originar las rupturas cromosómicas (267).

En otros padecimientos como la prokeratosis de Mibelli (autosómico dominante), la anemia por deficiencia de glutatión reductasa (autosómica dominante), la agranulocitosis de Kostmann (autosómica recesiva) y el síndrome de células basales nevoides (autosómico dominante) también se han reportado

anomalías cromosómicas semejantes a las de los síndromes de inestabilidad cromosómica (193).

En el síndrome de Roberts y en la focomelia SC que son condiciones autosómicas recesivas, con retardo en el crecimiento pre y post natal, reducción simétrica de miembros y anomalías craneofaciales, se han reportado anomalías en los centrómeros de los cromosomas. Las bandas C indican falta de cohesión de la heterocromatina paracentromérica lo que parece indicar que la heterocromatina está involucrada, ya que esto también se observa en el cromosoma Y y sobre todo en las regiones heterocromáticas de los cromosomas 1, 9 y 16 (265, 268).

Entre los desórdenes recesivos ligados al cromosoma X se encuentra el retraso mental ligado al X que se ha asociado con cromosomas X marcadores y un sitio frágil en la región distal Xq27 o Xq28 en pacientes con retraso mental y macroorquidismo (269, 270).

La localización cromosómica de mutaciones responsables de muchas enfermedades se conoce en la actualidad principalmente a través de la asignación del gen estructura para la enzima deficiente en cada uno. En desórdenes tales como la β talasemia se tiene una definición a nivel nucleotídico de las sustituciones (mutaciones sin sentido) y deleciones de largo variable que ocurren en el gen de la β globina. Deleciones a un nivel más grueso se han relacionado con otras anomalías y se consideran en la interfase entre aberraciones cromosómicas y mutaciones génicas (240). Por ejemplo, en el síndrome de Prader Willi, que se caracteriza por retraso mental, hipotonía en la infancia, hiperfagia, obesidad, retraso en el desarrollo psicomotor, manos y pies pequeños e hipogonadismo hipogonadotrópico, el 50% de los

casos estudiados citogenéticamente presentan anomalías cromosómicas de la región paracéntrica del 15, involucrando la banda 15q11-15q12, cuya delección determinaría este síndrome. En los casos que carecen de anomalías cromosómicas se ha postulado que o bien esta anomalía es tan pequeña que no se detecta por métodos empleados o se trate de entidades diferentes y con un patrón de herencia autosómico recesivo como se había propuesto originalmente para este padecimiento. En todo paciente en que se sospeche este síndrome deben realizarse bandas de alta resolución (99,240,271).

Se ha sugerido que una pequeña delección en Xp (Xp21) - puede ser la causa de la distrofia muscular de tipo Duchenne (recesiva ligada al cromosoma X) por los estudios realizados en mujeres afectadas portadoras de translocaciones X/autoso_gma debido a la inactivación selectiva del cromosoma X normal en sus células (240,272). Se ha reportado que una pequeña delección en el cromosoma 20 conduce al síndrome de Sipple - (neoplasia endócrina múltiple tipo II) de herencia autosómica dominante (99,240).

En los síndromes de Cornelia de Lange (autosómico recesivo), de Langer-Gedion (autosómico dominante) y de Holt-Oram (autosómico dominante) se ha reportado que pequeñas delecciones cromosómicas podrían estar implicadas en su etiología - - (99,240).

Los refinados métodos de bandas han aumentado grandemente la definición de "nuevos síndromes cromosómicos" debido a que aseguran la colección de casos en "cultivo puro" en los cuales se puede analizar el fenotipo. Además, la anomalía cromosómica puede ser fuertemente sospechada únicamente en bases clínicas y es posible en la actualidad la interpretación del fenotipo en aberraciones cromosómicas como reflejo del contenido génico específico. Así el síndrome de ojo

de gato (autosómico dominante) se debe probablemente a una pequeña duplicación de 22qter -q11 (99,240).

4. CITOGENTICA Y CANCER

El cáncer es una forma de crecimiento celular maligno e incontrolable, que ocurre en un organismo a través de continuas generaciones de células. El crecimiento anormal y - por lo tanto su inhibición están íntimamente conectados con los mecanismos de división celular, por lo que se requiere del conocimiento de los principios citológicos que lo rigen para su manejo (193).

La función de los cambios cromosómicos en la transformación de una célula normal a una neoplásica ha sido motivo de estudio y controversia por más de 60 años. Las observaciones durante los 20 años previos al bandeo cromosómico (1950-1970) indicaban que con una sola excepción (el cromosoma filadelfia (Ph) en la leucemia granulocítica crónica), el número y el patrón cromosómico en las células neoplásicas parecía ser bastante variable y los cambios cromosómicos se consideraban como un fenómeno secundario irrelevante. Sin embargo, la aplicación de las técnicas de bandas ha permitido observar que éste era un concepto erróneo y actualmente existen datos indicando cambios cromosómicos no al azar, particularmente translocaciones recíprocas entre un cromosoma constante con un sitio de ruptura específico (cromosoma donador) y un sitio receptor variable, las cuales están asociadas específicamente con ciertos tumores humanos (193,273). En más de 20 neoplasias se han encontrado anomalías cromosómicas específicas y en la actualidad parece probable que la mayoría - de los tumores malignos tengan un defecto cromosómico, por

lo que el estudio citogenético en el cáncer será importante en la subclasificación y entendimiento de la etiología de las neoplasias (274).

El principal avance en este tipo de estudios se obtiene del estudio de los patrones cromosómicos en varios desórdenes hematológicos, sobretodo en las leucemias mielocíticas crónica y aguda. El estudio de las anomalías cromosómicas en las leucemias tiene tres funciones: una es permitir un diagnóstico más exacto y por lo tanto escoger el tratamiento más adecuado para cada paciente; la segunda es servir como un indicador pronóstico y la tercera es proveer evidencias de como sitios cromosómicos alterados afectan la regulación génica (273,275).

El análisis de patrones cromosómicos, para ser revelador de una enfermedad maligna, debe basarse en el estudio del cariotipo de las células tumorales. En el caso de las leucemias, generalmente se utiliza un aspirado de médula ósea, el cual se procesa inmediatamente o se cultiva por periodos cortos (273). Cuando se encuentra un cariotipo anormal en las células leucémicas es importante analizar células de tejidos no afectados y en la mayoría de los casos tienen células normales. Las anomalías cromosómicas observadas en las células leucémicas representaría mutaciones somáticas. La observación por lo menos dos células "pseudodiploides" o "hiperdiploides" o tres células "hipodiploides" con la misma anomalía, se considera evidencia de una clona anormal. Pacientes cuyas células no muestran alteraciones o en casos en que las alteraciones involucren cromosomas diferentes en células diferentes, se consideran normales. Cambios cromosómicos aislados pueden deberse a artefactos técnicos a errores mitóticos al azar (273).

La aplicación reciente de técnicas cromosómicas de alte

resolución al estudio de las neoplasias hace posible obtener un mayor número de mitosis finamente bandeadas, lo cual permite visualizar defectos cromosómicos que antes resultaban indetectables y llegar a determinar sitios específicos en donde parecen estar localizados "genes cancerígenos". El incremento de resolución dado por las nuevas técnicas cuando se aplican al estudio de las leucemias sugeriría que el hallazgo de que aproximadamente 50% de los pacientes con leucemias agudas no linfocíticas tienen un cariotipo anormal es incorrecto (273,275). Estudiando un grupo de 20 pacientes no tratados con leucemias agudas no linfocíticas, Yunis y cols. encontraron anomalías cromosómicas en todos los casos (274). Sugiriendo que la mayoría de las leucemias agudas no linfocíticas y quizá otras neoplasias tienen aberraciones cromosómicas estructurales o numéricas (274).

La primera enfermedad maligna que se asoció con un defecto cromosómico consistente fue la leucemia mielóide crónica (o granulocítica). Aproximadamente 90% de los adultos con este desorden tienen un cromosoma filadelfia (Ph) en el cual el segmento distal de los brazos largos del cromosoma 22 está translocado a otro cromosoma, frecuentemente al extremo terminal del brazo largo del 9, $t(9;22)$. En aproximadamente 5% de todos los casos reportados de leucemia mielocítica crónica, la porción distal del brazo largo del 22 se encuentra translocada a otro cromosoma y ocasionalmente se pueden involucrar tres cromosomas en translocaciones más complejas. Con bandas de alta resolución se ha identificado el sitio de ruptura como la banda 22q11, lo que hace posible suponer que una secuencia específica de ADN estuviera relacionada con el desarrollo y mantenimiento del proceso maligno (273,274). Se ha postulado que el desarrollo de la neoplasia puede deberse a un efecto de posición del segmento translocado (240). La presencia de cromosoma filadelfia en esta enfermedad tiene

importancia pronóstica ya que los pacientes Ph positivo responden mejor a la quimioterapia que los Ph negativo y sobreviven períodos más largos (42 meses contra 15 de los Ph negativo) (232, 273, 277).

Un cambio en el cariotipo de un paciente Ph sugiere fuertemente que el paciente está en fase aguda y éste cambio puede preceder a los síntomas clínicos de una crisis blástica por 3-4 meses. La evolución cromosómica en la fase aguda involucra una o más de las siguientes anomalías en orden de frecuencia, además del Ph: (1) doble Ph, (2) adición de un cromosoma 8, (3) anomalías de 17q (isocromosomas) y (4) monosomía del 7 (273, 277).

En las leucemias agudas, linfocítica y no linfocítica, la presencia de una anomalía cromosómica está asociada con un pronóstico más severo, excepto si se encuentra una translocación (8:21) (q22;q22), encontrándose en 8% de los pacientes con leucemia aguda no linfocítica (M1 y M2) en ausencia de pérdida de cromosomas sexuales. Los pacientes con leucemia mieloblástica aguda (M1 y M2) con anomalías en todas las metafases tienen el peor pronóstico entre los pacientes con leucemia aguda no linfocítica, mientras que los pacientes con leucemia mielode aguda (M1 y M2) con todas las metafases normales tienen el mejor pronóstico (273, 274, 275).

En aproximadamente 50% de los pacientes con leucemia aguda promielocítica (M3) en las variedades hipergranular o microgranular está presente una t(15;17) (q24;q22) (273, 274, 275, 276).

En pacientes con leucemias no linfocíticas agudas se han reportado anomalías cromosómicas aisladas tales como: t(11;6)(q23;q27) en una leucemia - mielomonocítica (M4) y en otros casos de M4 se encontró que el cromosoma receptor para el segmento del 11 era el 17 ó el 10 (274).

Existe además un gran grupo de leucemias agudas no linfocíticas (25%) con anomalías cromosómicas, que tienen una variedad de defectos cromosómicos estructurales o numéricos no al azar, incluyendo uno o más de cuatro cambios particulares en 85% de los casos; principalmente se encuentran: monosomía o delección parcial del cromosoma 5, monosomía o delección parcial del 7, trisomía 8 y trisomía 21, Siendo las más comunes la trisomía 8 y la monosomía del 7 (274).

Los casos de leucemia mieloblástica aguda con cromosoma Ph se han reclasificado como casos de leucemia mielóide crónica en transformación blástica incluyendo aún casos que parecerían de leucemia linfoblástica aguda (273). Sin embargo recientemente se ha reconsiderado a los pacientes sin historia previa de leucemia mielóide crónica con Ph positivo como una entidad diferente. En la actualidad aún resulta difícil ver cual es la interrelación de las leucemias con Ph positivo (273).

Los estudios de bandedo en series consecutivas de pacientes con leucemia linfocítica aguda son pocos, encontrándose aneuploidia en aproximadamente la mitad de estos pacientes. Sin embargo aún debe determinarse, si la aneuploidia o la presencia de una anomalía cromosómica específica tienen importancia pronóstica (275). Se han descrito tres translocaciones recíprocas en pacientes con leucemia aguda linfocítica; las translocaciones (4;11), t(9;22) y t(8;14) y se encuentran en aproximadamente un tercio de los adultos y una décima parte de los niños con esta enfermedad. Su identificación parece ser de importancia clínica, ya que los pacientes que las presentan tienen un pronóstico pobre y necesitan una terapia agresiva (273,274).

En el pasado, los estudios cromosómicos en pacientes con leucemia linfocítica crónica habían revelado principalmente -

cariotiposnormales. Esto reflejaría la ausencia de células malignas en división ya que en estos padecimientos las células anormales son generalmente de tipo B, requiriendo del uso de mitógenos específicos. Recientemente se ha encontrado un cromosoma 14 anormal (14q+), similar al encontrado en el linfoma de Burkitt y ocasionalmente la presencia de un cromosoma 12 supernumerario (273).

En pacientes que desarrollan una leucemia aguda después de un tratamiento citotóxico o de radioterapia por un tumor maligno primario (generalmente linfoma maligno o mieloma múltiple) siempre están presentes anomalías cromosómicas clonales. El hallazgo de una anomalía cromosómica en un paciente con un cáncer tratado previamente, con citopenia o pancitopenia aisladas es diagnóstico de preleucemia. Las anomalías específicas en la mayoría de los pacientes con tumores malignos secundarios, tales como pérdida de cromosomas 5 ó 7, así como en estado hipodiploide se encuentran en aproximadamente 25% de los pacientes con leucemia aguda no linfocítica de novo (275).

Una clona cromosómicamente anormal es demostrable en la médula ósea de un número significativo de pacientes con desórdenes hematológicos que tienen un riesgo elevado para el desarrollo subsecuente de una leucemia. Estos estados preleucémicos incluyen una variedad de citopenias (anemia sideroblástica, refractaria, etc) y desórdenes mieloproliferativos indiferenciados y trombocitosis primaria), así como en algunos síndromes de la infancia (síndromes de inestabilidad cromosómica o casos de hipoplasia o displasia medular inesplicable). Las alteraciones citogenéticas que ocurren no al azar en estas discracias son frecuentemente similares a las observadas en las leucemias no linfocíticas agudas y en la fase acelerada de la leucemia mieloide crónica: monosomía para el -

cromosoma 7, trisomía para 8,9 y 21, así como para el brazo largo del 1 (1q+); deleciones del 5,20 y 21(5q-, 20q- y 21q-) y un isocromosoma derivado del 17 (i17q) (276,278)

Estos hallazgos apoyan el hecho de que a pesar de las diferencias clínicas, estos desórdenes preleucémicos están caracterizados por la presencia en los tejidos hematopoyéticos de una clona de células derivadas de una célula totipotencial alterada. Además los datos sugieren que las preleucemias, las leucemias crónicas y las leucemias agudas pueden ser fundamentalmente enfermedades similares, difiriendo primariamente de la expansión de la clona anormal (278).

Los estudios cromosómicos pueden ser de valor pronóstico en las preleucemiascitopénicas. Pacientes con anomalías muestran menos supervivencia y tienen un riesgo elevado de desarrollar una leucemia aguda no linfocítica. En los desórdenes mieloproliferativos y preleucémicos de la infancia las alteraciones no son claramente predictivas y las clones aberrantes pueden persistir por años sin progresión clínica (193,276,278).

Los cambios cromosómicos en los varios tipos de linfomas no han sido rigurosamente establecidos debido a varios factores; por una parte no se cuenta con un sistema uniforme de clasificación de linfomas y las anomalías citogenéticas se describen utilizando por lo menos tres sistemas de nomenclatura, lo cual lleva a una gran dificultad para comparar los resultados de los diferentes estudios ya que se desconoce el tipo de células que presentan las anomalías cromosómicas. Por otra parte se tienen dificultades para la obtención de metafases (279).

En los estudios citogénéticos previos a los métodos de

bandas realizados en linfomas no Hodgkin se reportó poliploidía en más del 50% de los casos estudiados, la mayoría cerca de la triploidía o tetraploidía. En cambio en los linfomas no Hodgkin se reportaban metafases normales, debido probablemente a que se estaban estudiando células de reacción del huésped, las cuales son muy abundantes en estos padecimientos (279). Con los métodos de bandas se encontró que una proporción importante de linfomas contiene un cromosoma marcador -14q+. En el linfoma de Burkitt se había demostrado que el marcador 14q+ era debido a una translocación (8;14)(q24;q32). Estudios recientes señalan que el 8q- es más característico y específico de los linfomas de Burkitt que el 14q+, ya que existen translocaciones entre el cromosoma 8 y el 2 ó 22 (y no el 14) en un número significativo de casos. A pesar de que el cromosoma 14 parece ser el receptor más común para material translocado en linfomas no Burkitt, el cromosoma donador puede ser el 1, 2, 4, 6, 10, 11, 14 y 18. A la fecha aún no se ha establecido la relación entre un donador específico y el tipo de linfoma (274,279). Sin embargo es importante señalar que en el cromosoma 14 se encuentran los genes que codifican para las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas, lo cual probablemente esté relacionado con el desarrollo de la neoplasia (193,240,279).

Después de los linfomas, el retinoblastoma es el tumor sólido mejor estudiado citogenéticamente. En los casos en que el retinoblastoma está asociado con retraso mental o defectos congénitos (aproximadamente 1% de los casos), todas las células del organismo muestran una deleción parcial del brazo largo del cromosoma 13 (síndrome de deleción 13q). El tamaño del segmento perdido varía en los diferentes pacientes, pero tienen en común la deleción de la banda 13q14. Con el uso de métodos de alta resolución se ha demostrado que el segmento crítico es el tercio medio de la banda 13q14 y es donde probablemente se encuentra el locus que determina

el retinoblastoma (274). En pacientes con delección de la banda 13q14 o trisomía de la misma se ha demostrado efecto de dosis génica para la estearasa D, la cual debe estar cercanamente ligada a los genes del retinoblastoma y se ha utilizado la medición de su actividad como criterio diagnóstico de las diferentes formas de retinoblastoma (280). En la actualidad parece que en los casos esporádicos de retinoblastoma unilateral que abarca 50% de los casos) y en los casos familiares transmitidos como autosómicos dominantes (generalmente bilateral y que comprende aproximadamente 50% de los casos) se encuentra la delección de la banda 13q14 en las células del tumor (99,240,274).

Un tipo específico de tumor de Wilms, asociado con aniridia bilateral, (aproximadamente 1% de todos los pacientes con tumor de Wilms) se ha reportado asociado con una delección intersticial de los brazos cortos del cromosoma 11, generalmente involucrando las bandas p11-13 ó p13-14. En la mayoría de los casos esta condición es esporádica, sin embargo en estudios recientes en familias con aniridia y tumor de Wilms se ha demostrado la pérdida de la banda p13-14. Con bandas de alta resolución la banda correspondería a los dos tercios distales de la banda p13, confirmando que los genes de aniridia y tumor de Wilms se encuentran adyacentes. Existe la posibilidad de que diferentes genes estén afectados, ya que esta neoplasia puede formar parte de diferentes síndromes (por ejemplo asociado con hemihipertrofia, pseudohermafroditismo, glomerulonefritis o macro-órganos) (274).

Se han encontrado defectos cromosómicos en otros tumores sólidos. El cistoadenocarcinoma seroso papilar del ovario presenta una translocación recíproca entre los cromosomas 6 y 14 (q21;q24), en el meningioma se ha reportado en 90% de los casos monosomía parcial o total del 22 y en los tumores mixtos de las glándulas paratiroides se han encontrado translo-

caciones involucrando los cromosomas 3 y 8 (274).

En la actualidad, debido a los adelantos técnicos para el cultivo de tumores sólidos, es posible el análisis cromosómico como rutina para subclasificar los tumores sólidos y predecir el pronóstico del paciente (274).

Seihsa sugerido que en el carcinoma papilar de vejiga la presencia de tetraploidía, o de un marcador cromosómico, junto con invasión de carcinoma moderadamente diferenciado, tiene un pronóstico letal, por lo que estaría indicada la resección temprana (193,274).

En la tabla 13 se muestran algunas de las anomalías cromosómicas asociadas con neoplasias.

Los cambios cromosómicos relativamente consistentes, especialmente translocaciones específicas, que están asociadas con una neoplasia en particular proveen de evidencias sobre posibles efectos de estos cambios en la transformación de una célula normal en maligna. El significado de estas aberraciones cromosómicas se desconoce, sin embargo, se han propuesto varias hipótesis (281): (1) que las células con anomalías cromosómicas son más susceptibles a agentes carcinogénicos (químicos, radiaciones o virus), (2) que la duplicación o delección de material genético es el factor etiológico primario en la malignidad, (3) que las aberraciones son resultado del proceso mismo de la enfermedad y (4) que las aberraciones cromosómicas y la predisposición al cáncer sean el efecto de un factor genético común quizá a través de inestabilidad cromosómica.

TABLA 13

NEOPLASIAS CON ABERRACIONES CROMOSOMICAS ESPECIFICAS
(193,274)

Tipo	Categoría Citogenética	Punto crítico de ruptura cromosó
Leucemia mieloide crónica	t(9;22)	22q11
Leucemias no linfocíticas agudas		
Mielógena (M1,M2)	t(8;21)	
Mielóide (M1,M2)	t(9;22)	
Promielocítica (M3)	t(15;17)	
Mielomonocítica (M4)	t(7;11)	11q23
Mielógena (M1,M2)	-7	
Leucemias linfocíticas agudas	t(4;11)	
De células B	t(9;22)	
	t(8;14)	
Policitemia Vera	del20q ?	
Trombocitosis primaria	del21q ?	
Linfomas no Hodgkin		
Burkitt africano y no africano	t(8;14)	8q24.1
No Burkitt	t(1;14)	1q23
	t(8;14)	8q22
	t(10;14)	10q24
	t(11;14)	11q13
	t(14;14)	14q24
	t(18;14)	18q21
Tumores sólidos		
Cistoadenocarcinoma papilar del ovario	t(6;14)	
Tumor mixto de glandula paratiroides	t(3;8)	
Meningioma	del22q	
Retinoblastoma	del13q14	
Retinoblastoma con retraso mental	del13q14*	13q14
Tumor de Wilms con aniridia	del11p13*	11p13

* Encontrado en todas las células del organismo

5. UTILIZACION DE TECNOLOGIA DE ADN RECOMBINANTE EN GENETICA CLINICA.

Los métodos de análisis de ADN recombinante, incluyendo el mapeo con endonucleasas de restricción, clonado de genes, determinación de secuencias de ADN y ensayo de expresión génica permiten en la actualidad el estudio de las bases moleculares de las enfermedades genéticas humanas (239,282).

La tecnología de ADN recombinante permite el aislamiento de bibliotecas de secuencias de ADN correspondiendo al genoma completo de un individuo o a las secuencias expresadas en cada tipo de célula. Las pruebas gen específicas aisladas de estas bibliotecas pueden utilizarse para la identificación de secuencias de ADN dentro del genoma que son necesarias para la función génica normal y para el estudio de las consecuencias de mutaciones y rearrreglos en estas secuencias que producen los síntomas clínicos de la enfermedad genética. Los polimorfismos de secuencias de ADN pueden utilizarse para construir un mapa de ligamiento génico de todo el genoma lo que permitirá el desarrollo de métodos de diagnóstico prenatal para enfermedades monogénicas, aún cuando se desconozca el defecto bioquímico(239).

La tecnología de ADN recombinante (ingeniería genética) permite el aislamiento y análisis de los genes. Teóricamente cualquier secuencia de ADN puede ser insertada en un plásmido o fago vector y propagada indefinidamente. El gen de interés y el vector son modificados bioquímicamente, ligados y el ADN recombinante resultante, usado para transformar un huésped bacteriano, generalmente E.coli (239). Si el gen es realmente aislado en forma relativamente pura por técnicas estándar, puede clonarse directamente en un plásmido o fago. Esta meto

todología es válida para ARNr o para mensajeros muy abundantes. La molécula recombinante resultante es referida como una prueba génica específica y cuando se hibridiza con ADN humano sólo reaccionará con la secuencia génica humana que es específica. En la mayoría de los casos, los ARNm eucarióticos no pueden purificarse fácilmente y la preparación de pruebas específicas requiere del ensamblado previo de una biblioteca de secuencias de ADN seguido de la identificación de la molécula recombinante de interés (239). Las bibliotecas de genes pueden obtenerse a partir del ADNc, son representativas de las secuencias de ARNm expresadas en el tipo de célula utilizada y generalmente contienen entre 10,000 y 20,000 recombinantes. También pueden obtenerse bibliotecas génicas a partir del genoma integro e incluirán secuencias codificadoras y no codificadoras, es decir secuencias de ADN de copia única y repetitivas; si el tamaño promedio de las secuencias clonadas es de 20kb, se obtendrán 7×10^5 recombinantes individuales. A partir de cromosomas específicos aislados de células somáticas híbridas roedor-humano o por citometría de flujo, se obtienen también bibliotecas génicas (239).

El método más común para la identificación de secuencias de ADN en bibliotecas es la hibridación in situ. También se utilizan métodos inmunológicos cuando se cuenta con anticuerpos específicos. Por último pueden utilizarse pruebas de complementación cuando la secuencia específica codifica para una proteína capaz de complementar una mutación bacteriana (239).

Una vez que la prueba gen específica ha sido seleccionada puede usarse para analizar la organización génica por mapeo de las secuencias que la rodean en el genoma con la técnica de manchas de Southern que consiste en cortar el genoma humano mediante una endonucleasa de restricción en aproximadamente 500,000 fragmentos de 10^2 - 10^5 pb. Es importante seleccionar

una enzima que no corte la secuencia a estudiar. Los fragmentos se separan por electroforesis en gel de agarosa y se denaturan con álcalis. Los fragmentos se colocan en filtros de nitrocelulosa pasando una solución salina a través del gel, se fijan al papel horneando a 80°C y se someten a hibridación con pruebas génicas radioactivas específicas. Los fragmentos que contengan parte o la secuencia específica, aparecen como manchas oscuras después de autorradiografía. Si se utilizan diferentes enzimas de restricción con la misma prueba, puede irse construyendo un mapa de ligamiento. En esta forma se han construido mapas físicos de los genes de β y δ globinas (239,283).

Con la tecnología de ADN recombinante se puede hacer un análisis de genes disfuncionales a nivel de ADN. El tipo de material más adecuado para este tipo de estudio son genes identificados y aislados como por ejemplo en las hemoglobinopatías y enfermedades de la colágena. La presencia de deleciones en el gen mismo o en secuencias flanqueadoras puede ser identificada por cambios en el tamaño de las manchas de Southern y -- pueden mapearse utilizando una gran variedad de enzimas de -- restricción. En esta forma se han mapeado deleciones en el gen de la β globina asociadas con talasemias. Deleciones de menos de 50 pb no son detectadas por esta técnica, a menos que supriman el sitio de corte de una enzima de restricción. (239,284). Las mutaciones puntuales son más difíciles de detectar ya que la probabilidad de que caigan en un sitio de corte de las enzimas de restricción es baja. Sin embargo, en casos en que la mutación es responsable directamente del fenotipo alterado si pueden aplicarse estos métodos, tal como en la anemia de células falciformes, donde ha ocurrido una mutación puntual en el gen de la β globina que resulta en un cambio en la tripleta del ARNm de GAG a GUG y un cambio de ácido glutámico por valina (239,285).

El análisis de los genes disfuncionales puede también hacerse en forma indirecta en base a mapeo, utilizando enzimas de restricción para detectar polimorfismos en las secuencias de ADN. En este tipo de pruebas la función de la secuencia de ADN no tiene ninguna importancia (239). Los polimorfismos de sitios de enzimas de restricción se ha observado que ocurren con una frecuencia de uno en cada 100-200 pb alrededor de los genes de $A\gamma$, $G\gamma$ y β y δ globinas y la frecuencia de heterocigocidad para loci variables es de 0.28. Por lo tanto es un problema estimar el número de tales marcadores polimórficos y de sus posibles combinaciones o haplotipos (239). Sin embargo, esta tecnología ya ha sido aplicada al diagnóstico prenatal de la anemia de células falciformes y de la β talasemia (284,286). La ventaja de esta metodología es su rapidez (5-10 días) y es capaz de detectar portadores, además de no requerir de muestras de sangre fetal sino de células de líquido amniótico que tienen un menor riesgo en su obtención.

En el caso de anemia de células falciforme, Kan y Dozy reportaron un polimorfismo para el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción Hpa I a aproximadamente 5 kb del extremo 3' del gen estructural de la β globina en el cromosoma 11 (284). La ausencia de este sitio da un fragmento de 13.0 kb en lugar del fragmento usual de 7.6 kb conteniendo al gen de la globina, raramente el gen de la β globina aparece como un fragmento de 7.0 kb al tratarse con esta enzima. - - Existe además un desequilibrio de ligamiento con respecto al fragmento de 13.0 kb y el alelo mutante del locus de la globina que conduce a la anemia de células falciformes. Los estudios iniciales reportaban que el 80% de los individuos que llevaban el alelo S también exhibían el fragmento de 13.0 kb (286,287,288). Sin embargo, los reportes subsecuentes muestran que el grado de asociación puede ser algo menor, si se

aumenta el tamaño de la muestra, y que por otra parte también varía de acuerdo con la población de que se trate, por lo que para propósitos de consejo genético debe evaluarse su frecuencia en la población a estudiar (286,287,288).

En el caso de las β talasemias, el utilizar polimorfismos de sitios de reconocimiento de enzimas de restricción - para diagnóstico prenatal no es adecuado, debido por una parte a que existen diferentes tipos de mutaciones responsables de este padecimiento, tales como deleciones en el extremo terminal del gen, mutaciones puntuales que forman codones de terminación, mutaciones puntuales dentro de secuencias de intervención. Además, existen un sinnúmero de polimorfismos en los sitios de reconocimiento de diferentes enzimas de restricción, lo cual con su uso combinado da diferentes haplotipos, los cuales varían en frecuencia de una población a otra. Para poder aplicar esta tecnología con fines de diagnóstico prenatal sería necesario un estudio extensivo de las poblaciones afectadas y normales (282).

La tecnología de ADN recombinante y en especial de las manchas Southern se ha utilizado para la asignación de genes a cromosomas específicos utilizando líneas celulares híbridas roedor-humano apropiadas. En esta forma se han mapeado los genes de las globinas β y δ y $A\gamma$ y $G\gamma$ en los brazos cortos del cromosoma 11. Este tipo de procedimientos está limitado por el acceso a la línea celular híbrida adecuada y por otra parte es útil ya que no depende de la expresión del gen (239).

La tecnología de ADN recombinante también tiene un gran potencia dentro del estudio de los rearrreglos cromosómicos en las neoplasias, ya que puede permitir la localización de secuencias específicas probablemente involucradas en los procesos malignos (239).

6. ESTADÍSTICA DEL SERVICIO DE GENÉTICA DEL HOSPITAL GENERAL DE MEXICO S.S.A. (1980-1982).

Al servicio de Genética del Hospital General de México S.S.A. acuden a consulta de primera vez un promedio de 549 pacientes por año (tabla 14). La mayoría provienen de la consulta externa y de los demás servicios del hospital y un pequeño número corresponde a pacientes referidos por otros hospitales.

A más de 50% de estos pacientes se les efectúa un estudio citogenético; a la mayor parte en sangre periférica (90% y únicamente a los que presentan enfermedades hematopoyéticas se les practica en médula ósea (Tabla 14).

Las principales causas por las que se realiza un cariotipo son: alteraciones de la diferenciación sexual (27%), retraso mental y/o psicomotor (15%), malformaciones congénitas o aberraciones cromosómicas (10%), trastornos hematopoyéticos (10%) y otras en menor proporción, como se muestra en la tabla 15.

Se efectuaron estudios citogenéticos con diferentes técnicas de bandas en 26% de los cariotipos realizados por la técnica habitual tiñendo únicamente con Giemsa. Estos corresponden a cariotipos en que se detectaron anomalías estructurales o numéricas, excepto en los casos de trisomía 21 regular, en los cuales basta con la presencia de un cromosoma extra del grupo G en el cariotipo y la correlación con la clínica para afirmar que se trata de un 21. También se han deado los cariotipos de la mayoría de los pacientes con retraso mental y/o psicomotor, así como de aquéllos con malformaciones congénitas múltiples que no caen dentro de un síndrome definido y los de las parejas con abortos espontáneos de repetición o esterilidad. La mayoría de estos estudios die-

ron como resultado cariotipos normales; siendo, sin embargo, importante su realización para descartar una aberración cromosómica como causa del trastorno. Por otra parte dadas las limitaciones y carencias del servicio, probablemente pasen desapercibidas anomalías estructurales pequeñas, que no son detectables por los métodos empleados, ya que no se realizan estudios de alta resolución. Sobre todo, esto es aplicable a los casos estudiados de retinoblastoma, tumor de Wilms, - síndrome de Prader Willi y síndrome de Cornelia de Lange en que se requieren bandas de alta resolución para localizar las anomalías cromosómicas (240,271,274,280) (tabla 15). En ocasiones aunque lo indicado fuera utilizar técnicas de bandas, fue imposible obtenerlas por tener material insuficiente o de mala calidad y a que muchas veces fue imposible tomar una nueva muestra porque el paciente ya no acudiera al servicio o falleciera.

Las tablas 16 y 17 muestran los resultados de los cariotipos realizados en sangre periférica. En la tabla 16 se dividen los cariotipos que presentaron anomalías (17.8% del total) en : autosómicas y de los cromosomas sexuales, que corresponden a 12.2% y 5.6% respectivamente del total de cariotipos realizados. En los estudios citogenéticos se detectó un pequeño número de cariotipos con polimorfismos cromosómicos - (4.2%)(tabla 16), los cuales no se buscaron intencionalmente, sino que se reportaron por ser muy notorios. Si se realizara un estudio para detectarlos seguramente aumentaría notablemente su proporción. En la tabla 18 se muestran los polimorfismos detectados.

Como se observa en la tabla 16 la mayoría de los cariotipos no presentaron alteraciones (69%). Es importante señalar que dentro de este grupo se encuentran los cariotipos de pacientes con esclerodermia y un testigo para cada uno de --

ellos, que entraron en un protocolo de investigación. En estos cariotipos se detectaron rupturas, "gaps", acéntricos, dicéntricos y otras anomalías estructurales primarias y es necesario realizarlos junto con un testigo para descartar que éstas se deban al manejo o metodología empleados.

Los cariotipos sin resultado (9%), tabla 16, corresponden a aquéllos en que fue imposible el análisis por mala calidad del material, material insuficiente o a que no hubiera transformación blástica en el cultivo. Además no fue posible repetirlos por las causas expuestas con anterioridad.

En la tabla 17 los cariotipos con anormalidades se agrupan de acuerdo con el tipo de aberración, ya sean numéricas o estructurales. Las anomalías numéricas ocupan una proporción mucho mayor 78.4% contra 21.6% de las estructurales.

La proporción con que se presentaron las aberraciones de los autosomas (12.2% de los estudios realizados es más del doble de la de aberraciones de los sexocromosomas (5,6%) lo cual contrasta con el gran número de pacientes que acuden a consulta por alteraciones de la diferenciación sexual (27%) de los pacientes a quienes se realiza un cariotipo), sin embargo, la mayor parte de estos pacientes tienen alteraciones a otros niveles o son normales y sólo una pequeña parte (16.5%) presentan anomalías de los sexocromosomas, principalmente aneuploidias. En cambio, las aberraciones de los autosomas, que también son en su mayoría numéricas, incluyen un alto porcentaje de casos de trisomía 21 (72.2% y 51% de todos los cariotipos anormales en sangre periférica) (tabla 19).

En las tablas 19,20 y 21 se desglosan las aberraciones de los autosomas detectadas. La mayor parte de los casos de

síndrome de Down se deben a una trisomía 21 regular (23% de las aberraciones de autosomas ó 88.5% de los casos de síndrome de Down) y sólo una pequeña parte son mosaicos (2.8% de las aberraciones de autosomas y 3.8% de los casos de síndrome de Down) o son producto de translocaciones (5.6 y 7.7% respectivamente) -- (Tabla 20) A los padres de niños con síndrome de Down por translocaciones ocurrieron de novo en los pacientes. Todas eran translocaciones robertsonianas D/G o G/G dos casos de $t(14q;21q)$, y dos casos con $t(21q;21q)$ excepto un caso visto en 1980 que corresponde a una translocación $t(21;21)$ en tandem, las cuales son sumamente raras (46XY tan $(21;21)$)(con formación de un cromosoma dicéntrico comparable en tamaño a un cromosoma del grupo D) - - (Fig. 22) (Tabla 20).

Únicamente se detectaron trisomías puras de los cromosomas 21, 18 y 13, no detectándose tampoco ninguna trisomía parcial - (tabla 19) .

De las translocaciones encontradas, la mayor proporción corresponde a translocaciones de tipo robertsoniano, principalmente $t(13q;14q)$ (tabla 20). El hecho que en 1981 se hayan visto 8 pacientes con translocación D/D $(13q;14q)$ se debió a que se estudió a la familia de una paciente que acudió a consulta por aborto habitual y a que su hermana había tenido un producto con estigmas de síndrome de Patau, hallándose la translocación en ella, su madre y 5 hermanos (fig 22). El otro caso visto ese mismo año corresponde a un niño de 5 años que acudió por retraso mental y psicomotor (tabla 20).

De las translocaciones no robertsonianas, la translocación aparentemente balanceada $(1;20)(p21;p12)$ detectada en 1982 ocurrió de novo en una niña de 3 años que acudió por presentar retraso psicomotor $(46,XX t(1;20)(p21;p12))$ (fig.23). En los casos de translocación $(6q;7q)$ $(46XY t(6;7)(q21;q34))$ se detecto prime-

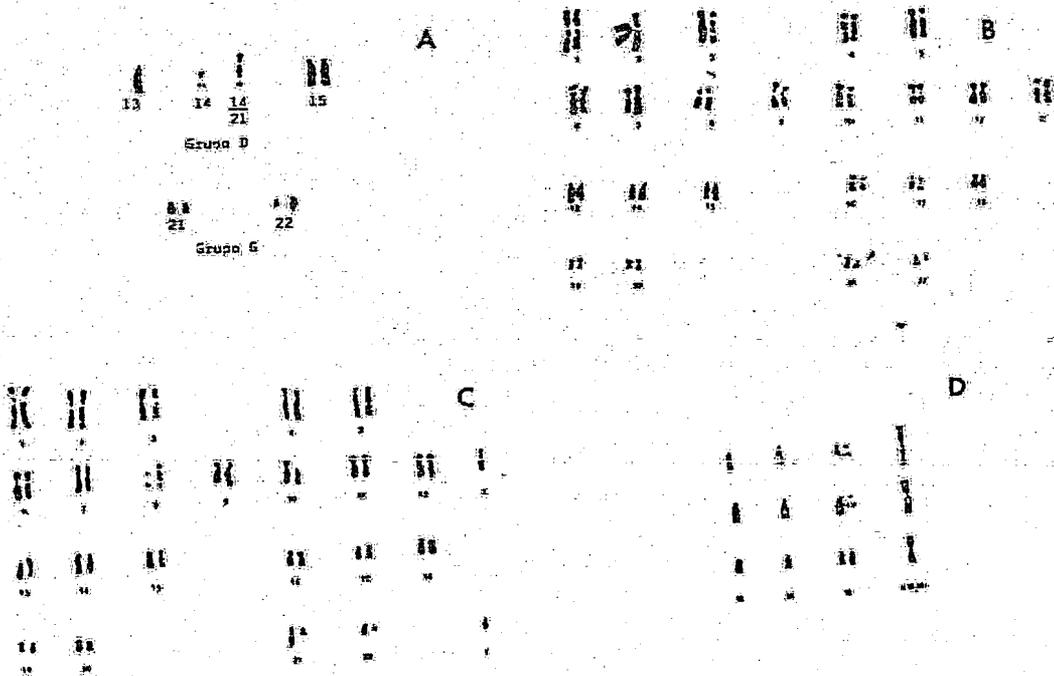


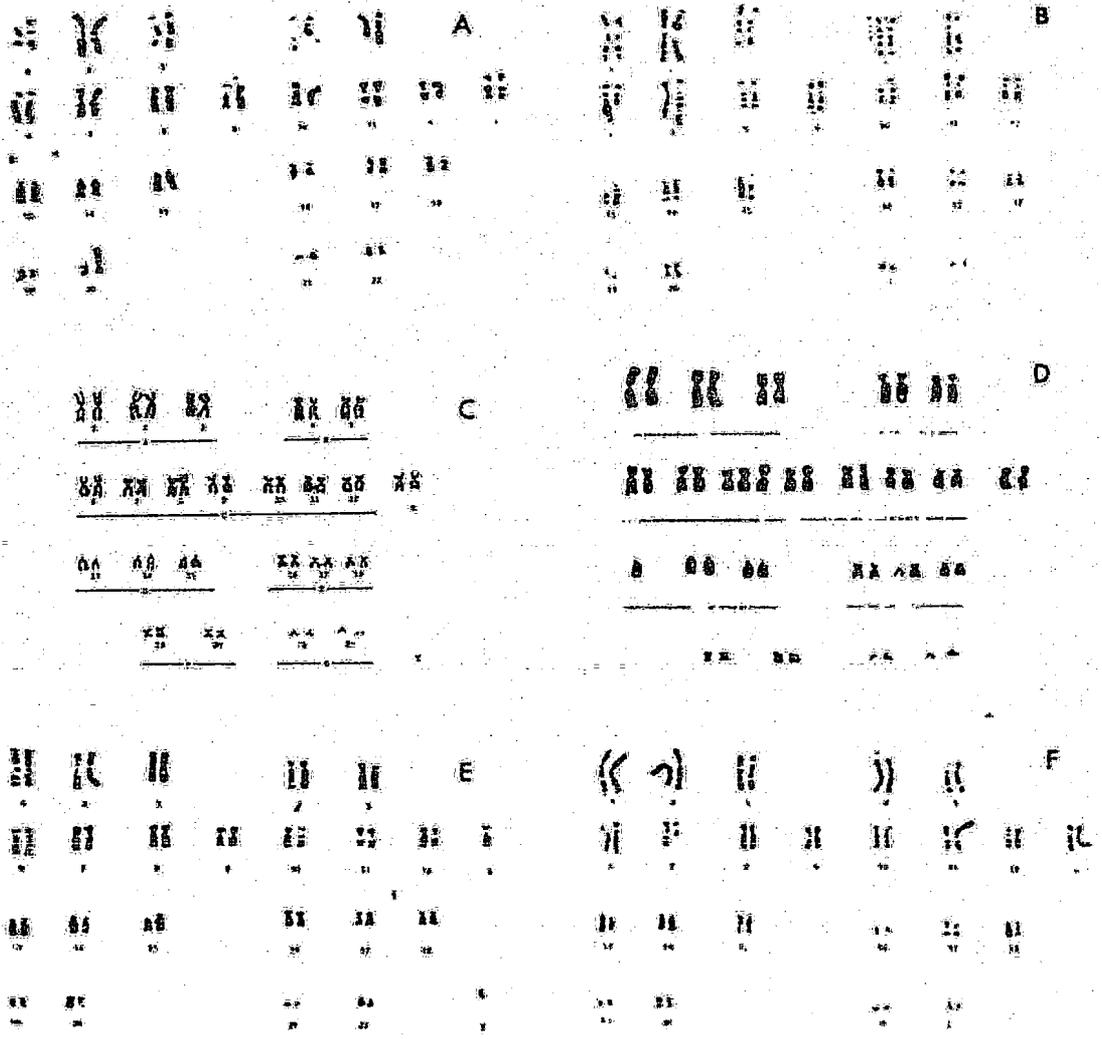
Figura 22. Translocaciones entre cromosomas acrocéntricos. A. $t(14q;21q)$ con síndrome de Down. B. Cariotipo $46,XX t(21q;21q)$. C. Cariotipo $46,XY tan(21;21)$. D. $t(13q;14q)$.

ramente en un niño de 5 meses que acudió para consejo genético por paladar hendido y debido a su facies peculiar, se le realizó cariotipo, detectándose la translocación balanceada, resultando la madre la portadora de dicha translocación (fig.23).

El caso de translocación C/D se detectó en la sangre de una niña recién nacida con malformaciones congénitas múltiples enviada del Hospital Juárez, en el cariotipo se contaron 46 cromosomas, faltando un cromosoma del grupo D y sobrando un cromosoma aparentemente del grupo A por lo que se pensó en una trisomía - trece; sin embargo al realizar cariotipo a los padres se detectó en la madre una translocación balanceada (Cp;Dq), por lo que el producto era monosómico para la mayor parte del cromosoma D, excepto la porción translocada al C y trisómico para la mayor parte del cromosoma C, excepto la parte translocada al D. El material de estos cultivos no era bueno y no fue posible bandearlos, además el bebé falleció y los padres no regresaron al servicio por su resultado, siendo imposible localizarlos (fig.23) (Tabla 20).

Dentro de las aberraciones estructurales de los autosomas se detectaron dos pacientes con síndrome de cri du chat (maullido de gato) o síndrome 5p⁻ uno de ellos un niño de 7 años que presentaba retraso psicomotor y el otro una niña de 2 meses y medio que presentaba el llanto característico, junto con otros signos del síndrome. En ambos había pérdida de la banda 5p15.2 que se ha reportado como responsable del síndrome (290). (Fig 23) (tabla 21). Además, se detectaron monosomias parciales de 13 q y 18 p. Se encontraron también dos inversiones pericéntricas una del cromosoma 7 y la otra del 11 (tabla 21).

A la consulta acude un alto porcentaje (27%) de pacientes con alteraciones de la diferenciación sexual que incluyen: amenorrea primaria, ginecomastia, clitoromegalia, hipospadias, criptorquidia, hernia inguinal, hipogonadismo, ambigüedad genital y



gura 23. Aberraciones de los autosomas. A. Cariotipo - ,XX t(1;20)(p21;p12). B. Cariotipo 46,XY t(6;7)(q21; 4). C. Cariotipo 46,XX t(Cp;Dq). D. Cariotipo -- ,XX C+ D-. E. Cariotipo 46,XY del(5p). F. Carioti- 47, XXY t(7;11)(q21;p15).

y pacientes con estigmas de síndrome de Turner o de síndrome Klinefelter o como probables disgenesias gonadales o - - - pseudohermafroditismos; se incluyeron también en este grupo a los pacientes que acudieron por homosexualidad (1 ó 2 por año). Sólo un pequeño número de estos pacientes (16 de 85) - presenta anomalías de los sexocromosomas. Sin embargo es necesaria la realización de estudios citogenéticos por varias razones: (1) para descartar anomalías cromosómicas (2) para detectar alteraciones de la diferenciación sexual a otros niveles, (3) para hacer diagnóstico diferencial con síndromes con patrones de herencia mendeliana que podrían confundirse clínicamente con errores de los sexocromosomas y (4) para verificar la normalidad de algunos pacientes como aquéllos que presentan hipospadias, criptorquidia, hernia inguinal, etc.

Las alteraciones de la diferenciación sexual pueden ser - producidas en tres diferentes niveles: (1) por errores en los cromosomas sexuales, (2) por errores en el sexo gonadal y (3) por errores en el sexo fenotípico (290).

Los estados intersexuales secundarios a anomalías de los cromosomas sexuales se deben principalmente a errores en la disyunción originando individuos aneuploides. La mayoría de estas anomalías no presentan malformaciones de genitales internos o externos, algunos se acompañan de alteraciones somáticas, pero en casi todos existen trastornos gonadales, con el consiguiente desarrollo anormal de los caracteres sexuales secundarios siendo casi todos estériles (290)

Los errores en el sexo gonadal, se refieren a errores en la diferenciación gonadal embrionaria, dando como resultado gónadas que no corresponden al sexo cromosómico, e incluyen; los hermafroditismos verdaderos, hombre XX y las disgenesias gonadales puras XX y XY(290).

Los errores en el sexo fenotípico corresponden a los pseudohermafroditismos masculinos y femeninos en los cuales el sexo genético coincide con el sexo gonadal pero presentan alteraciones variables en el sexo fenotípico (290).

En la tabla 22 se presentan los diferentes cariotipos con aberraciones de los cromosomas sexuales. La mayor proporción corresponde a los pacientes con síndrome de Turner (45,XO) - - (48,9%), seguido por los pacientes con síndrome de Klinefelter (47,XXY)(36.2%) incluyendo en ambos casos diferentes rearrreglos y mosaicos. En 1981 se detectaron cuatro pacientes con isocromosoma para los brazos largos del X, dos en forma pura y dos en forma de mosaico con una línea 45,XO, los cuales son poco frecuentes (fig. 24). Así mismo se encontró una paciente con síndrome de Turner por delección casi total de los brazos cortos del X (46 X del (Xp))(fig. 24). El fenotipo en los pacientes con delecciones de los brazos cortos del X se supone que varía dependiendo del segmento perdido, al parecer la ruptura p11-pter produce disgenesia gonadal y estigmas de Turner, en cambio en pérdida de p21 a pter las pacientes pueden ser fértiles y no presentan estigmas del síndrome de Turner. También se ha postulado que los estigmas se pueden deber al estado hemicingoto de algunos genes del cromosoma X, que podrían estar bajo el control de un gen autosómico, debido a la heterogeneidad clínica encontrada en pacientes con pérdida del mismo segmento (291).

En 1980 se detectó un paciente con Síndrome de Klinefelter que acudió a la consulta por esterilidad y presenta varias líneas celulares una 47, Xi (Xq)Y, 48, Xi(Xq)i(Xq)Y y una normal -- 46,XY(fig 24). En la literatura únicamente se han reportado dos casos de síndrome de Klinefelter con isocromosoma para brazos largos del X, con una única línea celular (47, Xi(Xq)Y)(292)

No se encontró ninguna paciente con triple X en forma pura las que se detectaron fueron mosaicos (46,XX/47,XXX;45,XO/47,XXX;

Los errores en el sexo fenotípico corresponden a los pseudohermafroditismos masculinos y femeninos en los cuales el sexo genético coincide con el sexo gonadal pero presentan alteraciones variables en el sexo fenotípico (290).

En la tabla 22 se presentan los diferentes cariotipos con aberraciones de los cromosomas sexuales. La mayor proporción corresponde a los pacientes con síndrome de Turner (45,X0) - - (48,9%), seguido por los pacientes con síndrome de Klinefelter (47,XXY)(36.2%) incluyendo en ambos casos diferentes rearrreglos y mosaicos. En 1981 se detectaron cuatro pacientes con isocromosoma para los brazos largos del X, dos en forma pura y dos en forma de mosaico con una línea 45,X0, los cuales son poco frecuentes (fig. 24). Así mismo se encontró una paciente con síndrome de Turner por delección casi total de los brazos cortos del X (46 X del (Xp))(fig. 24). El fenotipo en los pacientes con delecciones de los brazos cortos del X se supone que varía dependiendo del segmento perdido, al parecer la ruptura p11-pter produce disgenesia gonadal y estigmas de Turner, en cambio en pérdida de p21 a pter las pacientes pueden ser fértiles y no presentan estigmas del síndrome de Turner. También se ha postulado que los estigmas se pueden deber al estado hemicigoto de algunos genes del cromosoma X, que podrían estar bajo el control de un gen autosómico, debido a la heterogeneidad clínica encontrada en pacientes con pérdida del mismo segmento (291).

En 1980 se detectó un paciente con Síndrome de Klinefelter que acudió a la consulta por esterilidad y presenta varias líneas celulares una 47, Xi (Xq)Y, 48, Xi(Xq)i(Xq)Y y una normal -- 46,XY(fig 24). En la literatura únicamente se han reportado dos casos de síndrome de Klinefelter con isocromosoma para brazos largos del X, con una única línea celular (47,Xi(Xq)Y)(292)

No se encontró ninguna paciente con triple X en forma pura las que se detectaron fueron mosaicos (46,XX/47,XXX;45,X0/47,XXX;

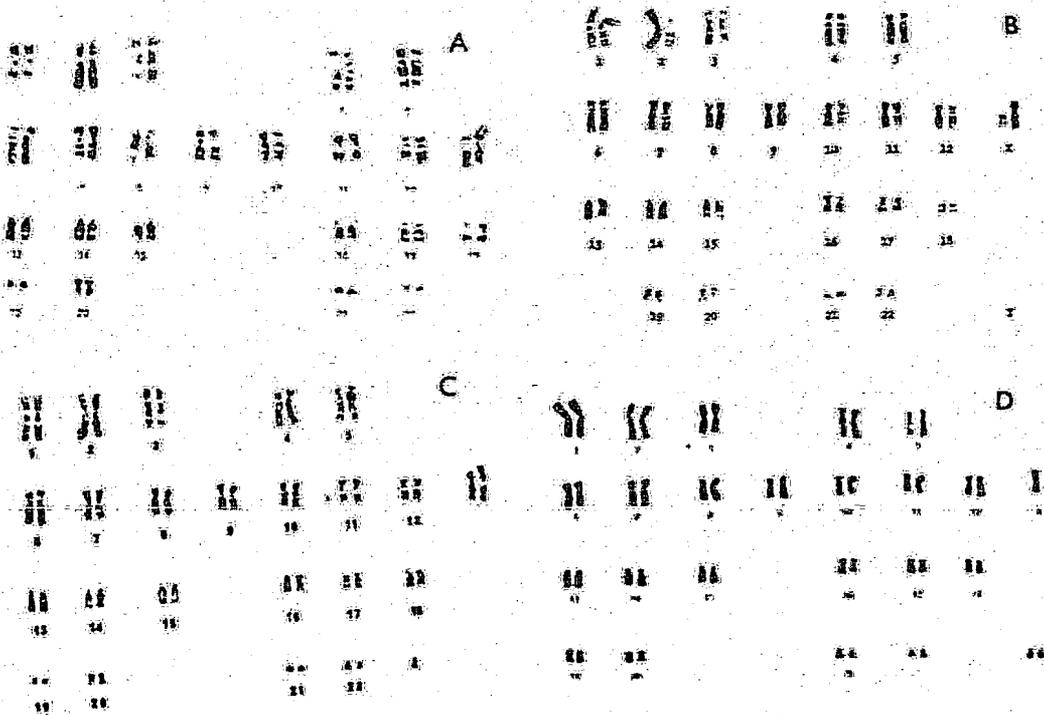


Figura 24. Aberraciones de los cromosomas sexuales
 A. Cariotipo 46,Xi(Xq). B. Cariotipo 46,Xdel(Xp)
 C. Cariotipo 47,Xi(Xq)Y. D. Cariotipo 47,XXY.

45,XO/46,XX/47,XXX) con diferentes proporciones para cada línea celular en cada paciente. (tabla 22). En los tres años sólo se encontró un individuo con cariotipo 47,XVY, que correspondió a un paciente de 17 años que acudió por retraso mental (fig 24).

También se detectaron dos pacientes con disgenesia gonadal mixta 45,X/46,XY los cuales presentan fenotipos variables que van del francamente femenino, con estigmas de Turner, al masculino (293). En los casos vistos uno era un individuo con fenotipo masculino de 28 años con genitales ambiguos y el otro era femenino de 16 años y acudió por amenorrea primaria.

En la tabla 23 se observan las alteraciones detectadas en los diferentes niveles de la diferenciación sexual. La mayor parte corresponden a errores en el sexo cromosómico, en los errores del sexo gonadal se detectaron 5 disgenesias gonadales puras - - XX, una XY y dos varones XX en los 3 años. Así mismo se encontraron 2 pseudohermafroditismos masculinos y 5 deficiencias de 21 - hidroxilasa o hiperplasia suprarrenal congénita que corresponden a los pseudohermafroditismos femeninos.

En tres casos (uno cada año) se observaron anomalías de cromosomas sexuales y autosomas en el mismo paciente. Dos de ellos se vieron como probables síndromes de Down; resultando uno de ellos mosaico para síndrome de Turner y Down por una translocación 14/21, con cariotipo: 45,XX t(14q;21q)/45,XO t(14q;21q) en 1981 y el otro fue un mosaico para trisomía 21, síndrome de - - Klinefelter con trisomía 21 y una línea normal cuyo cariotipo fue: 47,XY 21+/48,XXY 21+/46,XY (en 1980). El tercer caso se trata de un niño de 7 meses que acudió por retraso psicomotor leve y en quien al realizar el cariotipo por el método habitual se pensó tenía una trisomía 18, ya que se encontraron 47 cromosomas, sobrando aparentemente un E. Sin embargo, al bandearlo se encontró que era un síndrome de Klinefelter con una translocación balanceada 7/11 47,XXY t(7;11)(q21;p15) (en 1982) (fig. 23).

En lo que se refiere a los pacientes con trastornos hematópoyéticos y sus cariotipos realizados en médula ósea (tabla 24) se aprecia un incremento franco en su número en 1982, con respecto a los años anteriores, esto se debe a que inicialmente sólo se realizaba cariotipo a los pacientes con leucemia granulocítica crónica comprobada o probable y de ahí también el que se encontrara una gran proporción de cariotipos con cromosoma filadelfia positivo. El cariotipo en la médula ósea estaba limitado a buscar cromosoma Ph, reportándose también la presencia de rupturas múltiples o cromosomas pulverizados que indican que el paciente se encuentra en una fase aguda (crisis blástica) o estar recibiendo quimioterapia. Estos cariotipos no se bandeaban debido a problemas con la calidad de los cromosomas; se comenzaron a bandear a fines de 1982, encontrándose un paciente con un síndrome mieloproliferativo y varias líneas celulares, una Ph positivo, y otra con trisomía 8.

Los cariotipos sin resultado de la tabla 25 corresponden a casos en que el material del aspirado medular fue insuficiente o que el estado del paciente (fase aguda o recibiendo quimioterapia) no permitiera realizar el análisis cromosómico.

TABLA 14

RELACION DEL No. DE PACIENTES QUE ACUDEN
POR PRIMERA VEZ A CONSULTA Y LA REALIZA-
CION DE CARIOTIPOS.

	1982		1981		1980		Promedio	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Pacientes	556	-	573	-	517	-	549	-
Cariotipos	312	56	323	56	310	60	315	57
En sangre								
Periférica	272	87	296	92	283	91	284	90
En médula ósea	40	13	27	8	27	9	31	10
Estudios con								
Bandas	80	26	75	23	92	30	82	26

TABLA 15

CAUSAS POR LAS QUE SE REALIZO CARIOTIPO A LOS
PACIENTES.

	1982		1981		1980		Promedio	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Retraso mental y/o psicomotor	52	16.6	49	15	38	12	46	15
Hiperquinesia	2	0.6	0	0	0	0	1	0.3
Probable Síndrome Down	40	13	37	11	32	10	36	11
Malformaciones congénitas múltiplas	32	10	35	11	45	15	37	12
Padres o hermanos de pacientes con aberraciones cromosómicas o malformaciones	24	8	34	11	32	10	30	10
Aborto habitual	7	2	2	0.6	12	4	7	2
Esterilidad	3	1	3	1	6	2	4	1
Alteraciones de la diferenciación sexual	86	27.5	91	28	79	25	85	27
Retinoblastoma	0	0	0	0	3	1	1	0.3
Tumor de Wilms familiar	1	0.3	0	0	0	0	0	0
Síndrome de Cornelia de Lange	1	0.3	0	0	0	0	0	0
Síndrome de Prader Willi	1	0.3	1	0.3	0	0	1	0.3
Esclerodermia	3	1	17	5	12	4	11	3.5
Controles Esclerodermia	3	1	17	5	12	4	11	3.5
Trastornos hematopoyéticos	40	13	27	8	27	9	32	10
Otras	17	5.4	10	4	12	4	13	4
Total	312	100	323	99.9	310	100	315	99.9

TABLA 16

RESULTADOS DE LOS CARIOTIPOS REALIZADOS EN SANGRE
PERIFERICA.

	1982		1981		1980		Promedio	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Con aberraciones de los autosomas	37	13.6	38	13.0	31	11	35	12.2
Con aberraciones de los cromosomas sexuales.	9	3.4	18	6.1	20	7	16	5.6
Con polimorfismos	18	6.6	12	4	7	2.5	12	4.2
Sin alteraciones *	185	68	203	68.5	198	70.0	195	69
Sin resultado	23	8.4	25	8.4	27	9.5	25	9
TOTAL	272	100	296	100	283	100	263	100

* Se incluyen los cariotipos de los pacientes con esclerodermia y sus controles. Estos cariotipos presentan alteraciones cromosómicas primarias tales como gaps, rupturas, tetrádas, dicéntricos, etc.

TABLA 17

CARIOTIPOS CON ABERRACIONES CROMOSOMICAS ESTRUCTURALES
Y NUMERICAS EN SANGRE PERIFERICA

	1982		1982		1980		Promedio	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
ABERRACIONES NUMERICAS								
De autosomas	29	63	25	44.6	23	45.1	26	51
De sexocromosomas	9	19.6	13	23.2	19	37.3	14	27.4
Subtotal:	38	82.6	38	67.8	42	82.4	40	78.4
ABERRACIONES ESTRUCTURALES								
De autosomas	8	17.4	13	23.2	8	15.7	9	17.7
De sexocromosomas	0	0	5	9.0	1	2	2	3.9
Subtotal:	8	17.4	18	32.2	9	17.6	11	21.6
TOTAL ABERRACIONES	46	100	56	100	51	100	51	100

TABLA 18

PRINCIPALES POLIMORFISMOS ENCONTRADOS EN LOS CARIOTIPOS

	1982	1981	1980
1qh+	3	1	0
9qh+	3	1	0
16qh+	2	2	2
Dp+	3	2	1
Gp+	4	1	1
Dp-	0	0	1
Gp-	0	1	0
Yq+	3	3	2
Yq-	0	1	0
Total	18	12	7

TABLA 19

CARIOTIPOS CON ABERRACIONES DE LOS
AUTOSOMAS

	1982 No. %	1981 No. %	1980 No. %	Promedio No. %
SINDROME DOWN				
Trisomia 21 regular	28 75.7	23 60.6	20 64.5	23 63.8
Mosaicos (46,XX6XY/47,XX ó XY 21+)	0 0	0 0	2 6.5	1 2.8
Por translocación D/G ó G/G	1 2.7	1 2.6	3 9.7	2 5.6
Subtotal	29 78.4	24 63.2	25 80.7	26 72.2
TRISOMIA 18	0 0	1 2.6	1 3.2	1 2.8
TRISOMIA 13	1 2.7	1 2.6	0 0	1 2.8
Translocaciones *	2 5.4	10 26.4	4 12.9	5 13.8
Balancedas y no Balancedas				
DELECCIONES (monosomias parciales)	4 10.8	1 2.6	1 3.2	2 5.6
INVERSIONES	1 2.7	1 2.6	0 0	1 2.8
TOTAL:	37 100	38 100	31 100	36 100

* No se incluyen los pacientes con síndrome de Down por translocación.

TABLA 20

TRANSLOCACIONES ENCONTRADAS EN LOS CARIOTIPOS

	1982	1981	1980
ROBERTSONIANAS			
D/D balanceadas	0	8	2
D/E (14q;21q) con S. de Down	0	1	1
G/C (21q;21q) con S. Down	1	0	1
SUBTOTAL	1	9	4
NO ROBERTSONIANAS			
(21q;21q) en tandem con S. Down	0	0	1
(7;11) balanceada	1	0	0
(1;20) balanceada	1	0	0
(6;7) balanceada	0	2	0
E/D balanceada	0	0	1
E/D no balanceada	0	0	1 trisomia monosomia
TOTAL	3	11	7

TABLA 21

DELECCIONES E INVERSIONES ENCONTRADAS EN LOS
CARIOTIPOS

	1982	1981	1980
DELECCIONES			
(MONOSOMIAS PARCIALES)			
5p-	2	0	0
13q-	0	0	1
18p-	2	1	0
SUBTOTAL	4	1	1
INVERSIONES			
7	0	1	0
11	1	0	0
SUBTOTAL	1	1	0
TOTAL	5	2	1

TABLA 22

ABERRACIONES DE LOS CROMOSOMAS SEXUALES

	1982		1981		1980		Promedio	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
SINDROME TURNER								
45,X	4	44.5	3	16.7	3	15	3	18.75
45,X/46,XX	1	11.1	2	11.1	5	25	3	18.75
46,XXp-	0	0	1	5.6	0	0	0	0
46,Xi(Xq)	0	0	2	11.1	0	0	1	6.25
46,Xi(Xq)/45,X	0	0	2	11.1	0	0	1	6.25
SUBTOTAL	5	55.6	10	55.6	8	40	8	50.00
SINDROME KLINEFELTER								
47,XXY	3	33.3	3	16.7	4	20	3	18.75
46,XY/47,XXY	1	11.1	1	5.6	4	20	2	12.5
46,XY/47,Xi(Xq)Y/48, Xi(Xq)i(Xq)Y	0	0	0	0	1	5	1	6.25
SUBTOTAL	4	44.4	4	22.1	9	45	6	37.5
TRIPLE X								
46,XX/47,XXX	0	0	0	0	1	5	0	0
45,X/47,XXX	0	0	1	5.6	1	5	1	6.25
45,X/46,XX/47,XXX	0	0	0	0	1	5	0	0
SUBTOTAL	0	0	1	5.6	3	15	1	6.25
SINDROME XYV	0	0	1	5.6	0	0	0	0
DISGENESIA GONADAL MIX TA 45,X/46,XY	0	0	2	11.1	0	0	1	6.25
TOTAL	9	100	18	100	20	100	16	100

TABLA 23

ALTERACIONES DE LA DIFERENCIACION SEXUAL

	1982		1981		1980		Promedio	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
I. ERRORES EN EL SEXO GROMOSOMICO	9	64.3	18	75	20	83.3	16	72.8
Síndrome Turner	5	35.7	10	41.7	8	33.3	8	36.4
Síndrome Klinefelter	4	28.6	4	16.7	9	37.5	6	27.4
Triple X (mosaicos)	0	0	1	4.15	3	12.5	1	4.5
Síndrome XYY	0	0	1	4.15	0	0	0	0
Disgenesia Gonadal Mixta (45,X/46,XY)	0	0	2	8.3	0	0	1	4.5
II. ERRORES EN EL SEXO GONADAL	2	14.2	2	8.3	4	16.7	3	13.6
Disgenesia gonadal pura XX	1	7.1	1	4.15	3	12.5	2	9.1
Disgenesia gonadal pura XY	1	7.1	0	0	0	0	0	0
Varón XX	0	0	1	4.15	1	4.2	1	4.5
III. ERRORES EN EL SEXO FENOTIPICO	3	21.4	4	16.7	0	0	3	13.6
Pseudohermafroditismo masculino	1	7.1	1	4.2	0	0	1	4.5
Pseudohermafroditismo femenino	2	14.3	3	12.5	0	0	2	9.1
TOTAL	14	99.9	24	100	24	100	22	100

TABLA 24

RESULTADOS DE LOS CARIOTIPOS REALIZADOS EN
MEDULA OSEA

	1982		1981		1980		Promedio	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Con cromosoma Ph+	9	22	15	55	15	55	13	41
Con otras alteraciones *	7	18	5	19	1	4	4	14
Normales	16	40	3	11	7	26	9	28
Sin resultado	8	20	4	15	4	15	5	17
Total	40	100	27	100	27	100	31	100

* Trisomías o monosomías del grupo C, rupturas múltiples o un alto porcentaje de mitosis con cromosomas pulverizados (algunos casos además presentan Ph).

VIII. DISCUSION Y CONCLUSION

El conocimiento de la estructura de los cromosomas y de la cromatina a nivel molecular es un campo en él que aún que dan muchas interrogantes y en él que día a día se hacen nuevos descubrimientos. Esta tesis pretendió ser una revisión lo más completa posible, pero es probable que haya dejado fuera algunos de los hallazgos más recientes, los cuales podrían modificar varios de los conceptos enunciados, sin embargo la esencia básica continuaría siendo válida.

En la actualidad se cuenta con la tecnología necesaria para que en un futuro no muy lejano, se llegue a tener un conocimiento más completo del genoma humano normal y por lo tanto de su patología, ya que para entender completamente una enfermedad genética es necesaria la correlación fenotipo/genotipo a nivel de la secuencia del ADN, así como los mecanismos que regulan su expresión y su localización cromosómica.

El conocimiento de la secuencia de ADN de genes responsables de las diferentes enfermedades tendrá implicaciones importantes en la genética clínica. El diagnóstico podrá establecerse utilizando la nueva tecnología de ADN recombinante o por polimorfismos de sitios de reconocimiento para enzimas de restricción. Tal es el caso del gen de la β globina, que ha permitido el diagnóstico de la β talasemia y de la anemia de células falciformes. Este tipo de estudios pronto se extenderá a un número mayor de padecimientos conforme se vaya conociendo la estructura de los genes involucrados, su secuencia de nucleótidos codificantes para proteína (exones), secuencias líder y sobre todo las secuencias de intervención (intrones). Esto permitirá el estudio de las enfermedades -

genéticas partiendo del genotipo hacia el fenotipo, reconociendo los efectos de una alteración en la secuencia del ADN, comprobando el defecto bioquímico y observando las alteraciones producidas en el fenotipo y no retrospectivamente como se hace en la actualidad (fenotipo/genotipo).

Los nuevos modelos para la estructura cromosómica, tales como los propuestos por Comings o Yunis (30,146,168), abarcan los numerosos aspectos de la estructura de los cromosomas de mamíferos. Los modelos parten de la doble hélice de ADN y la formación de la cadena de nucleosomas, para llegar a constituir la fibra básica de la cromatina, la cual se pliega en forma de asas dentro de los cromosomas. Este último orden de empaquetamiento es diferente, dependiendo -- del tipo de secuencias de la molécula de ADN, ya sea secuencias repetitivas o de copia única y por lo tanto del tipo de cromatina (heterocromatina constitutiva centromérica o intercalar y eucromatina). Sin embargo, aún quedan cuestiones por resolver, entre ellas, la formación de estructuras especializadas tales como el centrómero o constricción primaria y su elemento funcional, el cinetócoro. Algunos autores han propuesto que se trata de una estructura derivada de la membrana nuclear, ya que contiene lipoproteínas (101,162). -- Sin embargo, recientemente se ha sugerido que se trate de un disco trilaminar con una capa densa inerte que debe comprender fibras de heterocromatina y tal vez secuencias que codifican para la formación de este organelo (268).

Los métodos de bandas han contribuido a los avances en la citogenética tanto a nivel de investigación como en el área de la genética clínica. En el área experimental ponen de manifiesto la existencia de estructuras diferentes con funciones propias dentro de los cromosomas, las cuales se comprenderán mejor cuando se logren entender totalmente los mecanismos responsables de su producción, ya que tratamientos

diferentes son capaces de producir patrones de bandas semejantes.

En el área clínica han facilitado el diagnóstico de las enfermedades secundarias a anomalías cromosómicas y la definición de nuevos síndromes, han permitido esclarecer la etiología cromosómica de padecimientos que se suponían monogénicos y siguiendo patrones de herencia mendeliana y sobre todo representan un arma de gran utilidad en el estudio de las neoplasias, ya que el hecho de encontrar segmentos cromosómicos específicos involucrados en cierto tipo de neoplasia implica que secuencias específicas de ADN pudieran ser responsables del proceso maligno. Además, un estudio detallado de los polimorfismos cromosómicos, puestos de manifiesto por los diferentes métodos de bandeo y comparando su frecuencia en población normal y enferma, permitirá comprobar si efectivamente las secuencias repetitivas de la heterocromatina -- (ADNs satélite principalmente) tienen alguna función específica o si en realidad es material genéticamente inactivo, como se propuso originalmente.

El diagnóstico de las enfermedades genéticas se ha facilitado grandemente con los adelantos técnicos recientes y el mayor conocimiento del genoma humano. Sin embargo, en el sitio de realización de esta tesis los medios con que se cuenta para efectuarlo son escasos, apoyándose principalmente en el estudio citogenético, la impresión clínica y en algunos exámenes de laboratorio.

En la mayoría de los casos se logra un diagnóstico adecuado, sin embargo, en aquéllos en que se requiere mayor precisión esto no es posible dado el elevado costo de los reactivos para realizar bandeo de alta resolución. En la actualidad se está tratando de implementar nuevas técnicas de bandas para cumplir satisfactoriamente con las funciones asistenciales del servicio.

Dado que el Hospital General de México S.S.A. es un hospital de concentración, el tipo de enfermedades genéticas que se ven en el servicio son muchas y variadas. Sin embargo, es importante recalcar que no para todos los pacientes con enfermedades genéticas se pide interconsulta, fundamente por desconocimiento de los médicos o por escasos recursos de los pacientes.

Las cifras obtenidas de la estadística aquí presentada no pueden compararse con las frecuencias de anomalías cromosómicas en población general (recién nacidos vivos), ya que se trata de una población seleccionada y no una población abierta. Sin embargo, debido a que el servicio participa desde 1977 en un programa de registro y vigilancia epidemiológica de malformaciones congénitas externas (RYVEMCE) contamos con datos en recién nacidos vivos. En este programa participa un total de 14 hospitales de la República Mexicana, de los cuales 7 se encuentran en el D. F., incluyendo al Hospital General de México, S.S.A. que contribuye con un promedio anual de 8,000 nacimientos. Las frecuencias obtenidas del RYVEMCE son: trisomía 21, 1.44/1,000 recién nacidos vivos; trisomía 18, 0.102/1,000 y trisomía 13, 0.047/1,000 (294). Estas frecuencias pueden compararse con las dadas por Nielsen en 1975, trisomía 21, 1.25/1,000; trisomía 18, 0.15/1,000 y trisomía 13, 0.08/1,000 (242). La frecuencia de trisomía 21 es ligeramente mayor que la de Nielsen, mientras que las de trisomía 18 y 13 son menores. Esto puede ser debido a que los datos de Nielsen fueron obtenidos mediante la realización de cariotipo en recién nacidos vivos consecutivos, mientras que en el RYVEMCE únicamente se realiza cariotipo en los recién nacidos malformados cuando se sospecha una cromosomopatía y tomando el total de nacimientos que fue de 126,385 con un total de 2,447 recién nacidos vivos con malformaciones congénitas externas (294).

Las frecuencias de aneuploidías de los cromosomas sexuales no pueden considerarse en este estudio, pues la mayor parte no presentan malformaciones congénitas externas y por lo tanto no son detectadas, sin embargo, es posible detectar alteraciones de la diferenciación sexual a otros niveles al realizar cariotipo a recién nacidos con ambigüedad genital, hipospadias, criptorquidia, hernia inguinal, etc.

En lo referente a los trastornos hematopoyéticos, nuestra frecuencia de cromosoma filadelfia en leucemia granulocítica crónica es cercana al 90% reportado en la literatura (273,274). En otros padecimientos las frecuencias no son significativas pues el número de casos estudiados es muy pequeño y por otra parte no se utilizaron métodos de bandas.

En la actualidad es posible el diagnóstico prenatal de un gran número de padecimientos hereditarios, entre los que se encuentran las cromosopatías, mediante la realización de cariotipo en células de descamación fetal obtenidas mediante amniocentesis en la semana 13-16 del embarazo, así mismo se puede diagnosticar un gran número de errores congénitos del metabolismo mediante la determinación de la actividad de la enzima implicada en cada caso y de diferentes hemoglobopatías, defectos de cierre del tubo neural y otros. Con el uso de los nuevos métodos de tecnología de ADN recombinante y polimorfismos de sitios de reconocimiento de enzimas de restricción pronto se podrán diagnosticar muchos más. El diagnóstico prenatal no se realiza en nuestro país, por problemas legales, pues la Constitución Mexicana sólo permite el aborto cuando demuestra violación o pone en peligro la vida de la madre, sin considerar la presencia de malformaciones congénitas u otro tipo de padecimientos hereditarios por lo que no es posible ofrecer un aborto terapéutico.

Consideramos que esta tesis ha cumplido con sus objetivos, al recopilar la información reciente sobre la estructura y funciones del genoma humano. Este material queda a disposición de todo aquel que desee consultarlo esperando que resulte de utilidad principalmente a generaciones futuras que pasen por la Facultad de Química, ya que en su biblioteca no se cuenta con ningún texto de este tipo. Además, el presentar los datos obtenidos en el Servicio de Genética del Hospital General de México permite conocer el estado actual de la genética clínica en nuestro país, marcando nuestras limitaciones y carencias.

Por lo que se recomienda para mejorar el nivel de la citogenética en nuestro país, el continuar en contacto con los adelantos efectuados en el resto del mundo y sobre todo tratar de implementar la realización de estudios más completos con ayuda de la nueva metodología. Por otra parte se pretende lograr la concientización de un número mayor de profesionistas, médicos principalmente y de la población general sobre la importancia que tiene la Genética Médica.

IX. BIBLIOGRAFIA

1. McDermott, A. 1975. Cytogenetics of man and other animals. Halsted Press. New York.
2. Ford, E., H., R. 1973. Human Chromosomes. Academic Press. New York.
3. Bartalos, M., Baramki, T., A. 1967. Medical Cytogenetics. - Williams and Wilkins Co, Baltimore.
4. Janssens, F., A. 1909. Spermatogénese dans les batraciens. V. La théorie de la chiasmotype. Nouvelle interprétation des cines de maturation. Cellule 25:387 - 411.
5. Creighton, H., S., Mc Clintock, B., A. 1931. Correlation of cytological and genetical crossing over in Zea mays. -- Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 17:492 - 497.
6. Morgan, T., H. 1910. Sex limited inheritance in Drosophila. Science 32: 120 - 122.
7. Mc Clintock, B. 1942. The fusion of broken ends of chromosomes following nuclear fusion. Proc. Natl. Acad. Sci. - U.S.A. 28:458 -- 463.
8. Painter, T., S. 1921. The Y chromosomes in mammals. Science 53: 503 - 504.
9. Painter, T., S. 1923. Studies in mammalian spermatogenesis: II. The spermatogenesis of man. J. Exp. Zool. 37:291-335.
10. Koller, P., C. 1937. The genetical and mechanical properties of sex chromosomes: III. Man. In Proceedings of the Royal Society. Edinburgh. 57: 194 - 214.
11. Tjio, S., H., Levan, A. 1956. The chromosome number of man. Hereditas. 42:1 - 6.
12. Ford, C., E., Hamerton, J., L. 1956. The chromosomes of man. Nature 178 :1020 - 1023.
13. Nowell, P., C. 1960. Phytohemagglutinin : an initiator of mitosis in cultures of normal human leucocytes. Cancer Res. 20:462 - 466.

14. Moorhead, P., S., Nowell, R., C., Mellman, W., S., Battips, D., M., Hungerford, D., A. 1960. Chromosome preparations of leucocytes cultured from peripheral blood. *Exp. Cell Res.* 20:613 - 616.
15. Schmid, W. 1963. DNA replication patterns of human chromosomes. *Cytogenetics.* 2: 175 - 193.
16. Casperson, T., A., Zech, L., Johansson, C., Modest, E., J. 1970. Identification of human chromosomes by DNA - binding - fluorescent agents. *Chromosoma.* 30:215 -227.
17. Casperson, T., A., Zech, L., Johansson, C. 1970. Analysis of human metaphase chromosomes set by aid of DNA- binding fluorescent agents. *Exp. Cell Res.* 62:490-492.
18. Levine, H. 1971. *Clinical Cytogenetics.* Little, Brown and Co. Boston.
19. An international system for human cytogenetic nomenclature. 1978. Report of the standing committee on human - cytogenetic nomenclature. the National foundation March of Dimes. *Cytogenetics and Cell Genetics.*
20. Passarge, E. 1974. The Human Karyotype. Analysis of chromosomes in mitosis and evaluation of cytogenetic data. In *Methods in Human Cytogenetics.* Schwarzacher, H., G., = Wolf, V., Springer Verlag. New York. 135 - 205.
21. Miller, O., J., Miller, A. D., Warburton, D. 1973. Application of new staining techniques to the study of human chromosomes. In *Progress in Medical genetics: IX.* Steinberg, A. - G. ed., Grome and Startton. New York. 1 - 47.
22. Arrighi, F. E., Saunders, G. F. 1972. The relationship between repetitious DNA and constitutive heterochromatin - with special reference to man. In *Modern Aspects of Cytogenetics: Constitutive Heterochromatin in Man.* (R. A. Pfeiffer, ed.), Symp. Med. Hoechst. Schattauer, Stuttgart. 6: 113-133.
23. Yunis, J. J. 1972. Constitutive Heterochromatin and the repeated DNA sequences of mammals. In *Modern Aspects of Cytogenetics: Constitutive Heterochromatin in man.* (R. A. Pfeiffer, ed.), Symp. Med. Hoechst. Schattauer, Stuttgart. 6: 5 - 17.
24. Brown, S. W. 1966. Heterochromatin. *Science.* 151:417 - 425.
25. Ohno, S. 1967. *Sex Chromosomes and Sex Linked Genes.* Springer-Verlag. New York.

26. Lyon, M.F. 1961. Gene action in the X chromosome of the mouse (Mus musculus L.). Nature 190:372 - 373.
27. Lyon, M.F. 1962. Sex chromatin and gene action in the mammalian X chromosome. Amer. J. Hum. Genet. 14:135 - 148.
28. Gall, J.B., Pardue, M.L. 1971. Nucleic acid hybridization in cytological preparations. In Methods in Enzymology. Nucleic Acids, Part. D. (L. Grossman and K. Moldave, eds.) Academic Press. New York. 21:470 - 480.
29. Arrighi, F.E., Hsu, T.C. 1971. Localization of heterochromatin in human chromosomes. Cytogenetics. 10:81 - 86.
30. Yunis, J.J., Tsai, M.Y., Willey, A.M. 1977. Molecular Organization and Function of the Human Genome. In Molecular Structure of Human Chromosomes. Yunis, J.J. ed. Academic Press. New York. 1 - 34.
31. Lewin, B. 1980. Gene Expression: II. Eucaryotic Chromosomes. John Wiley and Sons. New York.
32. Galau, G.A., Britten, R.J., Davidson, E.H. 1974. A measurement of the sequence complexity of the polysomal messenger RNA in sea urchin embryos. Cell. 2:9 - 20.
33. Lewin, B. 1975. Units of transcription and translation: sequence components of heterogeneous nuclear RNA and messenger RNA. Cell. 4:77 - 93.
34. Davidson, E.H., Hough, B.R., Amenson, C.S., Britten, R.J. 1973. General interspersion of repetitive with nonrepetitive sequence elements in the DNA of Xenopus. J. Mol. Biol. 77: 1 - 23.
35. Graham, D.E., Neufeld, B.R., Davidson, E.H., Britten, R.J. 1974. Interspersion of repetitive and nonrepetitive DNA sequences in the sea urchin genome. Cell. 1:127 - 137.
36. Schmid, C.W., Deininger, P.L. 1975. Sequence organization of the human genome. Cell. 6:345 - 358.
37. Ohta, T., Kimura, M. 1971. Functional organization of genetic material as a product of molecular evolution. Nature. 233:118 - 119.
38. Britten, R.J., Kohne, D.E. 1968. Repeated sequences in DNA. Science. 161:529 - 540.
39. Jones, K.W. 1977. Repetitive DNA and primate evolution. In Molecular Structure of Human Chromosomes. Yunis, J.J. ed. Academic Press. New York. 295 - 326.

40. Davidson, H., Galau, G.A., Angerer, R.C., Britten, R.J. 1975. Comparative aspects of DNA organization in Metazoa. *Chromosoma*. 51: 253 - 259.
41. Schmidtke, J., Epplen, J.T. 1980. Sequence organization of animal nuclear DNA. *Hum. Genet.* 55:1 - 18.
42. Saunders, G.F., Shirakawa, S.P., Saunders, P.P., Arrighi, F.E., Hsu, T.C. 1972. Populations of repeated DNA sequences in the human genome. *J. Mol. Biol.* 63:323 - 334.
43. Smith, H.O. 1979. Nucleotide sequence specificity of restriction endonucleases. *Science*. 205:455 - 462.
44. Grain, W.R., Eden, F.G., Pearson, W.R., Davidson, E.H., Britten, R.J. 1976. Absence of short period interspersion of repetitive and nonrepetitive sequences in the DNA of Drosophila melanogaster. *Chromosoma*. 56:309 - 326.
45. Wilson, D., Thomas, C. 1974. Palindromes in chromosomes. *J. Mol. Biol.* 84:115 - 144.
46. Marx, K.A., Allen, J.R., Hearst, J.E. 1976. Characterization of the repetitive human DNA families. *Biochim. Biophys. Acta*. 425:129 - 147.
47. Corneo, G., Ginelli, E., Zardi, L. 1973. Satellite and repeated sequences in human DNA. In *Modern Aspects of Cytogenetics: Constitutive Heterochromatin in Man*. (Pfeiffer, R. A. ed.) Symp. Med. Hoechst. Schattauer. Stuttgart. 6:29 - 37.
48. Ginelli, E., Corneo, G. 1976. The organization of repeated DNA sequences in the human genome. *Chromosoma*. 56:55 - 68.
49. Kit, S. 1961. Equilibrium sedimentation in density gradients of DNA preparations from animal tissues. *J. Mol. Biol.* 3:711 - 716.
50. Filipaki, J., Thiery, J.P., Bernardi, G. 1973. An analysis of the bovine genome by Cs₂SO₄-Ag⁺ density gradient centrifugation. *J. Mol. Biol.* 80:177 - 197.
51. Macaya, G., Thiery, J.P., Bernardi, G. 1977. DNA sequences in man. In *Molecular Structure of Human Chromosomes*. Yunis, J.J. ed. Academic Press. New York. 35 - 59.
52. Steffensen, D.M. 1977. Human gene localization by RNA:DNA hybridization in situ. In *Molecular Structure of Human Chromosomes*. Yunis, J.J. ed. Academic Press. New York. 60 - 89.
53. Miklos, G.L.G., John, B. 1979. Heterochromatin and satellite DNA in man: properties and prospects. *Am. J. Hum. Genet.* 31:264 - 280.

54. Gosden, J.R., Gosden, C.M., Laurie, S.S., Mitchell, A.R. 1978. The fate of DNA satellite I, II and III and ribosomal - DNA in a Familial dicentric chromosome 13, 14. *Hum. Genet.* 131 - 141.
55. Gosden, J.R., Laurie, S.S., Gosden, C.M. 1981. Satellite DNA sequences in the human acrocentric chromosomes: information from translocations and heteromorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32:243 - 251.
56. Evans, H.J., Gosden, J.R., Mitchell, A.R., Buckland, R.A. 1974. Location of human satellite DNAs on the Y chromosome. *Nature*. 251:346 - 347.
57. Sanchez, D., Yunis, J.J. 1974. The relationship between repetitive DNA and chromosomal bands in man. *Chromosoma*. -- 48:191 - 202.
58. Datt, P.J., Chuang, C.R., Saunders, G.F. 1976. Inverted repetitive sequences in the human genome. *Biochemistry*. 15:- 4120 - 4125.
59. Evans, H.J., Buckland, R.A., Pardue, M.L. 1974. Location of the genes coding for 18 S and 28 S ribosomal RNA in the human genome. *Chromosoma*. 48:405 - 426.
60. Brass, K., Krone, W. 1972. On the number of ribosomal RNA genes in man. *Humangenetik*. 14:137 - 141.
61. Young, B.D., Hall, A., Birnie, G.D. 1976. A new estimate of human ribosomal gene number. *Biochim. Biophys. Acta*. 454:- 539 - 548.
62. Steffensen, D.M., Duffey, P. 1974. Localization of 5 S ribosomal RNA genes on the human chromosome 1. *Nature*. 252: 741 743.
63. Szabo, P., Yul, C., Borun, T., et. al. 1978. Localization of the histone genes in man. *Cytogenet. Cell Genet.* 22:359 - 363.
64. Yunis, J.J., Kup, M.T., Saunders, G.F. 1977. Localization of sequences specifying messenger RNA to light-staining G Bands of human chromosomes. *Chromosoma*. 61:335 - 344.
65. Malcolm, S., Barton, P., Ferguson-Smith, M.A. 1981. The chromosomal distribution of repetitive DNA sequences within the human β globine gene cluster. *Hum. Genet.* 57:388 - 393.
66. Malcolm, S., Barton, P., Murphy, C., Williamson, R., Ferguson-Smith, M.A. 1981. Chromosomal location of a single cery - gene by in situ hybridization of human β globine genes on the short arm of chromosome 11. *Ann. Hum. Genet.* 45:135 - 141.

67. Korenberg, J.R., Therman, E., Denniston, C. 1978. Hot spots and functional organization of human chromosomes. *Hum. Genet.* 43:13 - 22.
68. Yunis, J.J., Sanchez, O. 1975. The G banded prophase chromosomes of man. *Humangenetik.* 27:167 - 172.
69. Judd, B.H., Young, M.W. 1974. An examination of the one-cistron:one chromomere concept. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 38:573 - 579.
70. Kurnit, D.M. 1979. Satellite DNA and heterochromatin variants: the case for unequal mitotic crossing over. *Hum. Genet.* 47:169 - 186.
71. Jones, K.W., Singh, L. 1981. Conserved repeated DNA sequences in vertebrate sex chromosomes. *Hum. Genet.* 58:46 - 53.
72. Davidson, E.H., Britten, R.J. 1979. Regulation of gene expression: possible role of repetitive sequences. *Science.* 204:1052 - 1059.
73. King, M.C., Wilson, A.C. 1975. Evolution at two levels in humans and chimpanzees. *Science.* 188:107 - 116.
74. Mattern, M.R., Painter, R.B. 1977. The organization of repeated sequences in the replicons of mammalian DNA. *Biophys. J.* 19:117 - 123.
75. Britten, R.J., Davidson, E.H. 1969. Gene regulation for higher cells: a theory. *Science.* 165:349 - 357.
76. Jacob, F., Momod, J. 1961. Genetic regulatory mechanism in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* 3:318 - 356.
77. Donald, L.J., Hamerton, J.L. 1978. A summary of the human-gene map. 1973 - 1977. *Cytogenet. Cell Genet.* 22:5 - 11.
78. Kuroiwa, A., Natori, S. 1979. Preferential expression of unique sequences adjacent to middle repetitive sequences in mouse cytoplasmic RNA. *Nucleic Acid. Res.* 7:751 - 764.
79. Sheller, R.A., Constantini, F.D., Kozlowski, M.R., Britten, R.J., Davidson, E.H. 1978. Specific representation of cloned repetitive DNA sequences in sea urchin RNAs. *Cell.* 15:189 - 203.
80. Constantini, F.D., Scheller, R.H., Britten, R.J., Davidson, E.H. 1978. Repetitive sequence transcripts in the mature sea urchin oocyte. *Cell.* 15:173 - 187.

81. Hudspeth, M.E.S., Timberlake, W.E., Goldberg, R.B. 1977. DNA sequence organization in the water mold *Achylya*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 4332 - 4336.
82. Darnell, J.E., Jelinek, W.R., Molloy, G.R. 1973. Biogenesis of mRNA: genetic regulation in mammalian cells. *Science*. - 181:1215 - 1221.
83. Darnell Jr, J.E. 1979. Steps in processing of mRNA: implications for gene regulation. From gene to protein: information transfer in normal and abnormal cells. Academic Press New York. 207 - 228.
84. Crick, F. 1979. Split genes and RNA splicing. *Science*. 204: 264 - 271.
85. Abelson, J. 1979. RNA processing and the intervening sequence problem. *Ann. Rev. Biochem.* 48: 1035 - 1069.
86. Pribnow, D. 1975. Nucleotide sequence of an RNA polymerase binding site on an early T7 promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72: 784 - 788.
87. Gannon, F., O'Hare, K., Perrin, F., Le Pennee, J.P., Benoist, C., Cochet, M., Breathnach, R., Royal, A., Garapin, A., Cami, E., Chambon, P. 1979. Organization and sequences at the 5' end of a cloned complete ovalbumin gene. *Nature*. 278: 428 - 434.
88. Chambon, P. 1977. The molecular biology of the eukaryotic genome is coming of age. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42: 1209 - 1234.
89. Kronenberg, H.M., Roberts, B.E., Efthymiadis, A. 1979. The 3' noncoding region of β globin mRNA is not essential for in vitro translation. *Nucleic Acids Res.* 6: 153 - 166.
90. Subramanian, K.N. 1979. Segments of simian virus 40 DNA spanning most of the leader sequence of the major late viral messenger RNA are dispensable. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 2556 -- 2560.
91. Gilbert, W. 1978. Why genes in pieces? *Nature*. 271: 501 - 503.
92. Brack, C., Hiramata, M., Lenhard-Schuller, R., Tonegawa, S. 1978. A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell*. 15: 1 - 14.
93. Sakano, H., Huppi, K., Heinrich, G., Tonegawa, S. 1979. Sequences at the somatic recombination sites of immunoglobulin light chain genes. *Nature*. 280: 288 - 294.

94. Perry, R.P. 1976. Processing of RNA. *Annu. Rev. Biochem.* 45: 606 - 629.
95. Revel, M., Groner, Y. 1978. Post-transcriptional and transcriptional controls of gene expression in eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* 47: 1079 - 1126.
96. Renwick, J.H. 1973. Gene loci on chromosomes. In *Human chromosomes*. Ford, E.H. Academic press. 315 - 322.
97. Creagan, R.P., Ruddle, F.H. 1977. New approaches to human - gene mapping by somatic cell genetics. In *Molecular Structure of Human Chromosomes*. Yunis, J.J. ed. Academic Press. New York. 90 - 143.
98. Bobrow, M., Cross, J. 1974. Differential staining of human and mouse chromosomes in interspecific cell hybrids. *Nature*. 252: 77 - 79.
99. McKusick, V.A. 1978. Mendelian inheritance in man: Catalogs of autosomal dominant, autosomal recessive and X-linked phenotypes. 5th Ed. Johns Hopkins. Baltimore.
100. *Excerpta Medica. Human Genetics. Section 22. The International Medical Abstracting Service. Amsterdam. Vols. 24 - 27. (1979 - 1981).*
101. Bahr, G.F. 1977. Chromosomes and chromatin structure. In *Molecular Structure of Human Chromosomes*. Yunis, J.J. ed. Academic Press. New York. 143 - 203.
102. Bonner, J., Dahmus, M.E., Fambrough, D., Huang, R.C., Marushige, K., Tuan, D.Y.H. 1968. The biology of isolated chromatin. *Science*. 159: 47 - 56.
103. Freese, E. 1958. The arrangement of DNA in the chromosome. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 23: 13 - 18.
104. Taylor, J.H., Woods, P.S., Hughes, W.L. 1957. The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies tritium-labeled thymidine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 43: 122 - 127.
105. Wolf, S., Perry, P. 1975. Insights on chromosome structure from sister chromatid exchange ratios and the lack of both isotope labelling and heterolabelling as determined by the F.P.S. technique. *Exp. Cell Res.* 93: 23 - 30.
106. Evans, H.J. 1977. Human cytogenetics: molecular aspects. In *Human Genetics Proceedings of the fifth International Congress of Human Genetics. Mexico. October 1976*. Armendarez, S. and Lisker, R. ed. *Excerpta Medica. Amsterdam.* 82-87.

107. Stein, G.S., Stein, J.S., Kleinsmith, L.J. 1976. Las proteínas cromosómicas y la regulación de los genes. Investigación y Ciencia. Ed. en español de Sci. Am. 1:32 -44.
108. Panyn, S., Chalkley, R. 1969. The heterogeneity of histones. I. A quantitative analysis of calf histones in very long polyacrylamide gels. Biochemistry. 8:3972 - 3979.
109. Olins, D.E., Olins, A.L. 1978. Nucleosomes: The structural - quantum in Chromosomes. Am. Sci. 66:704 -711.
110. Newrock, K.M., Cohen, L.H., Hendricks, M.B., Donnelly, R.J., Weinberg, E.S. 1978. Stage specific mRNAs coding for Subtypes of H2A and H2B histones in the sea urchin embryo. Cell. 14:327 - 336.
111. Allan, J., Hortman, P.G., Crane-Robinson, C., Aviles, F.X. 1980. The structure of histone H1 and its location in Chromatin. Nature. 288:675 -679.
112. Mc Ghee, J.D., Felsenfeld, G. 1980. Nucleosome structure. Ann. Rev. Biochem. 49: 115 - 1156.
113. Bradburg, E.M., Inglis, R.J., Mattheews, H.R. 1974. Control of cell division by very lysine rich histone (F1) phosphorylation. Nature. 247:257 -261.
114. Matsumoto, Y.I., Yasuda, H., Mita, S., et.al. 1980. Evidence for the involvement of H1 histone phosphorylation in chromosome condensation. Nature. 284:181 - 183.
115. Comings, D.E., Tack, L.O. 1973. Non-histone proteins. Exp. Cell. Res. 82:175 - 191.
116. Wu, F.C., Elgin, S.C.R., Hood, L.E. 1973. Nonhistone chromosomal proteins of rat tissues. A comparative study by - gel electrophoresis. Biochem. 12:2792.
117. Peterson, J.L., Mc Conkey, E.H. 1976. Nonhistone chromosomal proteins from HeLa cells. A survey by high resolution, two dimensional electrophoresis. J. Biol. Chem. 251:546-554.
118. Douvas, A.S., Harrington, G.A., Bonner, J. 1975. Major nonhistone proteins of rat liver chromatin: preliminary identification of myosin, actin, tubulin and tropomyosin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72:3902 - 3906.
119. Smerdon, M.J., Isenberg, I. 1976. Interactions between the subfractions of calf thymus H1 and nonhistone chromosomal proteins HMG1 and HMG2. Biochemistry. 15:4242 - 4247.

120. Walker, J.M., Goodwin, G.H., Johns, E.W. 1979. The primary-structure of the nucleosome associated chromosomal protein HMG 14. *Febs. Lett.* 100:394 - 398.
121. Goldknopf, I.L., Taylor, D.W., Baum, R.M., Yeoman, L.C., Olson, M.O.J., Prestayko, A.W., Bush, H. 1975. Isolation and characterization of protein A 24, a histone-like nonhistone chromosomal protein. *J. Biol. Chem.* 250: 7182 - 7187.
122. Matsui, S.I., Seon, B.K., Sandberg, A.A. 1979. Disappearance of a structural chromatin protein A 24 in mitosis: implications for molecular basis of chromatin condensation. - *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76:6386 - 6390.
123. Ris, H., Chandler, B.L. 1963. The ultrastructure of genetic systems in prokaryotes and eukaryotes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 28: 1 - 8.
124. Gall, J.G. 1966. Chromosome fibers studied by spreading technique. *Chromosoma*. 20: 221 - 233.
125. Du Praw, E.J. 1965. The organization of nuclei and chromosomes: a folded fiber model based on whole mount electron microscopy. *Nature*. 206:338 - 343.
126. Lampert, F. 1971. Attachment of human chromatin fibers to the nuclear membrane, as seen by electron microscopy. *Humangenetik*. 13:285 - 295.
127. Du Praw, E.J. 1966. Evidence for a "folded fiber" organization in human chromosomes. *Nature*. 209:577 - 581.
128. Kornberg, D., Klug, A. 1981. The nucleosome. *Sci. Am.* 244:48 - 60.
129. Gordunella, L. 1978. El nucleosoma. *Investigación y Ciencia*. Ed. en español de *Sci. AM.* 22:44 - 53.
130. Hewish, A.R., Burgoyne, L.A. 1973. Chromatin structure. The digestion of chromatin DNA at regularly spaced sites by nuclear DNAase. *Biochem. Biophys. Res.* 52:504 - 510.
131. Noll, M. 1974. Subunit structure of chromatin. *Nature*. 251: 249 - 251.
132. Olins, A.L., Olins, D.E. 1974. Spheroid chromatin units. (V bodies). *Science*. 183:330 - 332.
133. Oudet, P., Gross-Bellard, M., Chambon, P. 1975. Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell*. 4:281 - 300.

134. Kornberg, R.D., Thomas, J.O. 1974. Chromatin structure: oligomers of the histones. *Science*. 184:865 - 868.
135. Kornberg, R.D. 1974. Chromatin structure: a repeating unit of Histones and DNA. *Science*. 184:868 - 871.
136. Pospelov, U.A., Svetlikova, S.B., Vorobev, V.I. 1979. Nucleosome packing in chromatin as revealed by nucleasa digestion. *Nucleic Acids Res.* 6:399 - 418.
137. Rodley, G.A., Scobie, R.S., Bates, R.H., Lewitt, R.M. 1976. A possible conformation for double-stranded polynucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73:2959 - 2963.
138. Sasisekharan, V., Pattabiraman, N., Gupta, G. 1978. Some implications of an alternative structure for DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:4092 - 4096.
139. Mirzabekov, A.D., Shick, V.V., Belyavsky, A.V., Bavykin, S.G. 1978. Primary organization of nucleosome core particle of chromatin: sequence of histone arrangement along DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:4184 - 4188.
140. Thoma, F., Koller, T.H., Klug, A. 1979. Involvement of histone H 1 in the organization of the nucleosome and the salt-dependent superstructures of chromatin. *J. Cell. Biol.* 83:403 - 427.
141. Hsiang, M.W., Cole, R.D. 1977. Structure of histone H 1 in DNA complex: effect of histone H1 on DNA condensation. - *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74:4852 - 4856.
142. Renz, M., Nehls, P., Hozier, J. 1977. Involvement of histone H1 in the organization of the chromosome fiber. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 1879 - 1883.
143. Finch, J.T., Klug, A. 1976. Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73:1897 - 1901.
144. Carpenter, B.G., Balbwin, J.P., Bradburg, E.M., Ibel, K. 1976. Organization of subunits in chromatin. *Nucleic Acids Res.* 3: 1739 - 1901.
145. Butler, P.J.G., Thomas, J.O. 1980. Changes in chromatin - folding in solution. *J. Mol. Biol.* 140:505 - 529.
146. Yunis, J.J., Bahr, G.F. 1979. Chromatin fiber organization of human interphase and prophase chromosomes. *Exp. Cell-Res.* 122:63 - 72.

147. Benyajati, C., Worcel, A. 1976. Isolation, characterization and structure of the folded interphase genome of *D. melanogaster*. *Cell*. 9: 393 - 408.
148. Smerdon, M. J., Lieberman, M. W. 1978. Nucleosome rearrangement in human chromatin during UV- induced DNA repair synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75: 4238 - 4241.
149. Gottesfeld, J. M., Melton, D. A. 1978. The length of nucleosome-associated DNA is the same in both transcribed and nontranscribed regions of chromatin. *Nature*. 273: 317 - 319.
150. Mathis, D., Oudet, P., Chambon, P. 1980. Structure of transcribing chromatin. In *Progress in Nucleic Acids Research and Molecular Biology*. Cohn, W. E. ed. Academic Press. New York. 24: 1 - 55.
151. Bellard, M., Gannon, F., Chambon, P. 1977. Nucleosome structure. III. The structure and transcriptional activity of the chromatin containing the ovalbumin and globin genes in chick oviduct nuclei. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42: 779 - 791.
152. Gariglio, P., Llopis, R., Oudet, P., Chambon, P. 1979. The template of the isolated native SV40 transcriptional complex is a minichromosome. *J. Mol. Biol.* 131: 75 - 106.
153. Comings, D. E., Okada, T. A. 1970. Association of chromatin fibers with the annuli of the nuclear membrane. *Exp. Cell Res.* 62: 293 - 302.
154. Comings, D. E. 1980. Arrangement of the chromatin in the nucleus. *Hum. Genet.* 53: 131 - 143.
155. Rao, P. N. 1977. Premature chromosome condensation and the fine structure of chromosomes. In *Molecular Structure of Human Chromosomes*. Yunis, J. J. ed. Academic Press. New York. 205 - 231.
156. Schmitz, K. S., Ramanathan, B. 1980. Generation of a third-order folded structure for chromatin. *J. Theor. Biol.* 83: 297 - 311.
157. Goyanes, V. J., Matsui, S., Sandberg, A. A. 1980. The basis of chromatin fiber assembly within chromosomes studied by histone-DNA crosslinking followed by trypsin digestion. *Chromosoma*. 78: 123 - 135.
158. Kosztolányi, G., Buhler, E. M. 1978. The effect of SH - SS transition in the structural organization of mitotic chromosomes. *Hum. Genet.* 42: 83 - 88.

159. Filip, D.A., Gilly, C., Mouriquand, C. 1975. The metaphase chromosome ultrastructure. II. Helical organization of the basic chromosome fiber as revealed by acute angle-metal deposition. *Humangenetik*. 30: 155 - 165.
160. Bak, A.L., Zeuthen, J., Crick, F.H. 1977. Higher-order structure of human mitotic chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 1595 - 1599.
161. Bak, A.L., Jorgensen, A.L., Zeuthen, J. 1981. Chromosome banding and compactation. *Hum. Genet.* 57: 199 - 202.
162. Brinkley, B.R., Stubblefield, E. 1970. Ultrastructure and interaction of the kinetochore and centriole in mitosis meiosis. *Adv. Cell Biol.* 1: 119 - 185.
163. Adolph, K.W., Cheng, S.M., Paulson, J.R., Laemmli, V.K. 1977. Isolation of a protein scaffold from mitotic HeLa cell chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 4937 - 4941.
164. Paulson, J.R., Laemmli, V.K. 1977. The structure of histone depleted metaphase chromosomes. *Cell*. 12: 817 - 828.
165. Stubblefield, E., Wrang, W. 1971. Architecture of the Chinese hamster metaphase chromosome. *Chromosoma*. 32: 262 - 294.
166. Marsden, M.P.F., Laemmli, V.K. 1979. Metaphase chromosome-structure: evidence for a radial loop model. *Cell*. 17: 849 - 858.
167. Okada, T.A., Comings, D.E. 1980. A search for protein cores in chromosomes. Is the scaffold an artifact? *Am. J. Hum. Genet.* 32: 814 - 832.
168. Comings, D.E. 1978. Mechanisms of chromosome banding and implications for chromosome structure. *Ann. Rev. Genet.* 12: 25 - 46.
169. Weisblum, B., Haseth, P.L. 1972. Quinacrine, a chromosome stain specific for deoxyadenylate-deoxythymidylate-rich regions in DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 629 - 632.
170. Freeman, M.V.R., Beiser, S.M., Erlanger, B.T., Miller, D.J. - 1971. Reaction of antinucleoside antibodies with human cells in vitro. *Exp. Cell Res.* 69: 345 - 355.
171. Dev, V.G., Warburton, D., Miller, D.J., Erlanger, B.F., Beiser, S.M. 1972. Consistent pattern of binding of anti-adenosin antibodies to human metaphase chromosomes. *Exp. Cell Res.* 74: 288 - 293.
172. Comings, D.E., Kovacs, B.W., Avelino, E., Harris, D.C. 1975. Mechanism of chromosome banding. V. Quinacrine banding. *Chromosoma*. 50: 11 - 145.

173. Ellison, J.R., Barr, H.J. 1972. Quinacrine fluorescence of specific chromosome regions late replication and high-A-T content in Samoaia leonensis. Chromosoma. 36:375 - 390.
174. Rowley, J.D., Bodmer, W.F. 1971. Relationship of centromeric heterochromatin to fluorescent banding patterns of metaphase chromosomes in the mouse. Nature. 231:503 - 506.
175. Weisblum, B. 1973. Why centric regions of quinacrine treated mouse chromosomes show diminished fluorescence. Nature. 246:150 - 151.
176. Comings, D.E., Drets, M. 1976. Mechanisms of chromosome banding. IX. Are variations in DNA base composition adequate to account for quinacrine, Hoechst 33258 and daunomycin banding? Chromosoma. 56:199 - 211.
177. Gottesfeld, J.M., Bonner, J., Radda, G.K., Walker, I.O. 1974. Biophysical studies on the mechanism of quinacrine staining of chromosomes. Biochemistry. 13:2937 - 2945.
178. Distèche, C., Botemps, J. 1974. Chromosome regions containing DNAs of known base composition, specifically evidence by 2,7-di-t-butyl proflavine. Comparison with the Q-banding and relation to dye-DNA interactions. Chromosoma. 47:263 - 281.
179. Weisblum, B., Haenssler, E. 1974. Fluorometric properties of the benzimidazole derivative Hoechst 33258, a fluorescent probe specific for A-T concentration in chromosomal DNA. Chromosoma. 46:255 - 260.
180. Schnell, W. 1978. Structure and variability of human chromosomes analyzed by recent techniques. Hum. Genet. 41:1-9.
181. Korenberg, J.R., Engels, W.R. 1978. Base ratio, DNA content and quinacrine brightness of human chromosomes. Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 75:3382 - 3386.
182. Dutrillaux, B., Lejeune, J. 1971. Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. C.R. Acad. Sci. Paris. Ser. D. 272:2638 - 2640.
183. Prantera, G., Banaccorsi, S., Pimpinelli, S. 1979. Simultaneous production of Q and R bands after staining with chromomycin A₃ or olivomycin. Science. 204:79 - 80.
184. Schweizer, D. 1981. Counterstain-enhanced chromosome banding. Hum. Genet. 57:1 - 14.

185. Sahar, E., Latts, A. 1978. Enhancement of banding patterns in human metaphase chromosomes by energy transfer. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:5650 -5654.
186. Brzeschik, K.H., Kim, M.A., Johannsmann, R. 1975. Late replicating bands of human chromosomes demonstrated by fluorochrome and Giemsa staining. Humangenetik. 29:41 -59.
187. Ganner, E., Evans, H.J. 1971. The relationship between patterns of DNA replication and of quinacrine fluorescence in the human chromosomes. Chromosoma. 35:326 -341.
188. Dutrillaux, B. 1977. New chromosome techniques. In Molecular Structure of Human Chromosomes. Yunis, J.J. ed. Academic Press. New York. 233 - 265.
189. Comings, D.E. 1975. Chromosome banding. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry .23:461 - 462.
190. Sumner, A.T., Evans, H.J. 1973. Mechanism involved in the banding of chromosomes with quinacrine and Giemsa. II. The interaction of the dyes with the chromosomal components. Exp. Cell Res. 81:223 - 226.
191. Wyandt, H.E., Wysham, D.G., Minden, S.K., Anderson, R.S., Hecht, F. 1976. Mechanisms of Giemsa banding of chromosomes. I. Giemsa 11 banding with azure and eosin. Exp. Cell Res. 102: 85 - 94.
192. Wyandt, H.E., Anderson, R.S., Patil, S.R., Hecht, F. 1980. Mechanisms of Giemsa banding. II. Giemsa components and other variables in G banding. Hum. Genet. 53:211 - 215.
193. Sandberg, A.A. 1980. The chromosomes in Human Cancer and Leukemia. Elsevier. New York.
194. Comings, D.E., Avelino, E., Okada, T.A., Wyandt, H.E. 1973. The mechanism of B and G banding chromosomes. Exp. Cell Res. 77: 469 -493.
195. Sumner, A.T., Evans, H.J., Buckand, R.A. 1971. New technique for distinguishing between human chromosomes. Nature, New Biol. 232:31 - 32.
196. Schnell, W. 1971. Analysis of the human karyotype using a reassociation technique. Chromosoma. 34:448 -454.
197. Wang, H.C., Fedoroff, S. 1972. Banding in human chromosomes treated with trypsin. Nature, New Biol. 235:52 -54.
198. Seabright, M. 1971. A rapid banding technique from human chromosomes. Lancet. 2:971 - 972.

199. Schnedl, W. 1974. Banding patterns human chromosomes visualized by Giemsa staining after various pretreatments. In Methods in Human Cytogenetics. Schwarzacher, H.G. and Wolf, V. ed. Springer-Verlag, New York. 95 - 117.
200. Chaudhuri, J.P., Vogel, W., Voiculescu, I., Wolf, V. 1971. A simplified method of demonstrating Giemsa band pattern in human chromosomes. Humangenetik. 14: 83 - 84.
201. Khalid, G., Neuman, H., Flemans, R.J., Hayhoe, F.G.J. 1979. -- A comparative study of chromosome G-banding using trypsin, papain and pretreatment with emulphogene. J. Clin. Pathol. 32: 482 - 487.
202. Mc Kay, R.D.G. 1973. The mechanism of G and C banding in mammalian metaphase chromosomes. Chromosoma. 44: 1 - 14.
203. Sumner, A.T. 1973. Involvement of protein disulphides and sulphhydryls in chromosome banding. Exp. Cell Res. 83: 438 - 447.
204. Bloom, S.E., Goodpasture, C. 1976. An improved technique for selective silver staining of nucleolar organizer regions on human chromosomes. Hum. Genet. 34: 199 - 206.
205. Matsui, S., Sasaki, M. 1973. Differential staining of nucleolar organizers in mammalian chromosomes. Nature. 246: 148 - 150.
206. Miller, D.A., Tantravahi, R., Dev, V.G., Miller, O.J. 1977. Frequency of satellite association of human chromosomes is correlated with amount of Ag-staining of the nucleolar organizer region. Am. J. Hum. Genet. 29: 490 - 502.
207. Schwarzacher, H.G., Mikelsaar, A.V., Schedl, W. 1978. The nature of the Ag-staining of nucleolar organizer regions. Cytogenet. Cell Genet. 20: 24 - 39.
208. Mikelsaar, A.V., Schmid, M., Schwarzacher, H.G., Schnedl, W. 1977. Frequency of Ag-stained nucleolar organizer regions in the acrocentric chromosomes of man. Hum. Genet. 37: 73 - 77.
209. Sumner, A.T., Evans, H.J., Buckland, R.A. 1973. Mechanism involved in the banding of chromosomes with quinacrine and Giemsa I. The effect of fixation in methanol-acetic acid. Exp. Cell Res. 81: 214 - 222.
210. Domings, D.E., Okada, T.A. 1974. Mechanism of chromosome Banding II. Evidence that histones are not involved. Exp. Cell Res. 86: 202 - 206.
211. Brown, R.L., Pathak, S., Hsu, T.C. 1975. The possible role of histones in the mechanism of chromosomal G banding. Science. 189: 1090 - 1091.

212. Holmquist, G.P., Comings, D.E. 1976. Histones and G banding of chromosomes. *Science*. 193:599 - 602.
213. Simeonova, M., Tchacarov, E. 1980. Prefixation chromosome banding with heparin. *Hum. Genet.* 56:63 -66.
214. Burkholder, G.D., Duezeck, L.L. 1980. Proteins in chromosome banding I. Effect of G-banding treatments on the proteins of isolated nuclei. *Chromosoma*. 79:29 - 41.
215. Pothier, L., Gallagher, J.F., Wright, C.E., Libby, P.R. 1975. Histones in fixed cytological preparations of Chinese hamster chromosomes demonstrated by immunofluorescence. *Nature*. 255:350 - 352.
216. Bustin, M., Yamaski, H., Goldblatt, D., Shani, M., Huderman, E., Sachs, L. 1976. Histone distribution in chromosome revealed by antihistone sera. *Exp. Cell Res.* 97:440 - 444.
217. Burkholder, G.D., Duezeck, L.L. 1980. Proteins in chromosome banding II. Effect of R and C banding treatments on the proteins of isolated nuclei. *Chromosoma*. 79:43 -51.
218. Kanda, N. 1978. Differential staining in the secondary-constriction regions of human chromosomes A1, C9 and E16 by a heat hypotonic treatment technique. *Hum. Genet.* 45:-19 - 24.
219. Yunis, J.J., Ball, D.W., Sawyer, J.R. 1972. G- banding patterns of high-resolution human chromosomes. 6 - 22, X and Y. *Hum. Genet.* 49:291 -306.
220. Schwarzscher, H.G. 1974. Fluorescence microscopy of chromosomes and interphase nuclei. In *Methods in Human Cytogenetics*. Schwarzscher, H.G. and Wolf, V. eds. Springer-Verlag. New York. 83 -94
221. Yunis, J.J., Roldan, L., Yasmineh, W.G., Loe, J.C. 1971. Staining of satellite DNA in metaphase chromosomes. *Nature*. 231:532 -533.
222. Chandley, A.C., Fletcher, J.M. 1973. Centromere staining at meiosis in man. *Humangenetik*. 18:247 -252.
223. Bobrow, M., Madoy, K., Pearson, P.L. 1972. Staining of some specific regions of human chromosomes, particularly the secondary constriction of No. 9. *Nature New Biol.* 238:--122 - 124.
224. Gagné, R., Tangnay, L., Laberge, C. 1971. Differential staining patterns of heterochromatin in man. *Nature New Biol.* 232:29.

225. Patil, S.R., Merrick, S., Lubs, H.A. 1971. Identification of each human chromosome with a modified Giemsa stain. *Science*. 173:821 -822.
226. Bobrow, M., Collacot, H.E.A.C., Madan, K. 1972. Chromosome banding with acridine orange. *Lancet*. II:1311.
227. Dutrillaux, B. 1973. Nouveau systeme de marquage chromosomique: les bandes T. *Chromosoma*. 41:395 -402.
228. Zankl, H., Bernhard, S. 1977. Combined silver staining of the nucleolus organizer regions and Giemsa banding in human chromosomes. *Hum. Genet.* 37:79 - 80.
229. Howell, W.M., Black, D.A. 1978. A rapid technique for producing silver stained nucleolus organizer regions and trypsin-Giemsa bands on human chromosomes. *Hum. Genet.* 43:53 - 56.
230. Schweiser, D., Ambros, P., Andrie, M. 1978. Modification of DAPI banding on human chromosomes by prestaining with a DNA binding oligopeptide antibiotic, distamycin A. *Exp. Cell Res.* 111:327 - 332.
231. Schmid, M., Galb, H., Schempp, W., Webber, L., Schmidtke, J. 1981. Characterization of a new aberration of the Y chromosome by banding methods and DNA restriction endonuclease-analysis. *Hum. Genet.* 59:26 -35.
232. Yunis, J.J. 1981. Chromosomes and cancer: new nomenclature and future directions. *Hum. Pathol.* 12:494 - 502.
233. Yunis, J.J. 1981. New chromosome techniques in the study of human neoplasia. *Hum. Pathol.* 12:540 - 549.
234. Schollmayer, E., Schafer, D., Frisch, B., Scheleiermacher, E. 1981. High resolution analysis and differential condensation in RBA-banded human chromosomes. *Hum. Genet.* 59:187-193.
235. Francke, U., Oliver, N. 1978. Quantitative analysis of high-resolution trypsin-Giemsa bands on human prometaphase chromosomes. *Hum. Genet.* 45:137 --165.
236. Dutrillaux, B., Viegas-Pequinot, E. 1981. High resolution R and G banding on the same preparation. *Hum. Genet.* 57:93 - 95.
237. Hozier, J.C., Lindquist, L.L. 1980. Banded karyotypes from bone marrow: a clinical useful approach. *Hum. Genet.* 53:205 - 209.
238. Evans, E.P., Breckon, G., Ford, C.E. 1964. An air-drying method for meiotic preparations from mammalian testes. *Cytogenetics*. 3:289 -294.

239. Davies, K.E. 1981. The application of DNA recombinant-technology to the analysis of the human genome and genetic disease. *Hum. Genet.* 58:351 - 357.
240. Mc Kusick, V., A. 1982. The human genome through the eyes of a clinical geneticist. *Cytogenet. Cell Genet.* 32:7 - 23.
241. Matteui, M.S., Salzano, F.M. 1982. Effect of chromosome-changes on body and mind development. In *Advances in the study of Birth Defects. Vol. 5. Genetic Disorders.* (Persaud, T.V.N. ed.) A.R. Liss. Inc. New York. 67 - 87.
242. Nielsen, J., Sillesen, I. 1975. Incidence of chromosome - aberrations among 11, 148 new born children. *Humangenetik.* 30:1 - 12.
243. Warkany, J. 1971. *Congenital Malformations. Notes and Comments.* Year Book Medical Publishers. Inc. Chicago.
244. Al-Aish, M.A., de la Cruz, F., Goldsmith, E.A., et. al. 1967. Autosomal monosomy G (21-22) in a four and one half year old mentally retarded girl. *N. Engl. J. Med.* 277:777 - 782.
245. Kajii, T., Ferrier, A., Niikawa, N., Takahara, H., Ohama, K., Auirachan, S. 1980. + Anatomic and chromosomal anomalies in 639 spontaneous abortuses, *Hum. Genet.* 55:87 - 98.
246. Chandley, A.C. 1981. The origin of chromosomal aberrations in man and their potential for survival and reproduction in the adult population. *Ann. Genet.* 24:5 - 14.
247. Schindler, A.M., Mikamo, K. 1970. Triploidy in man. *Cytogenetics.* 9:116 - 122.
248. Kajii, T., Niikawa, N. 1977. Origin of triploidy and tetraploidy in man: 11 cases with chromosome markers. *Cytogenet. Cell Genet.* 18:109 - 125.
249. Patau, K. 1963. Partial trisomy. In *Second International Conference on Congenital Malformations.* New York. The International Medical Congress.
250. Jacobs, P.A. 1961. Mutation rates of Structural chromosomes rearrangements in man. *Am. J. Hum. Genet.* 33:44-54.
251. Mikkelsen, M. 1972. The effect of maternal age on the incidence of Down's syndrome. *Humangenetik.* 16:141 - 153.
252. Lamson, S.H., Hook, E.B. 1980. A simple function for maternal age specific rates of Down's syndrome in the 20 to 49 year age range and its biological implications. *Am. J. Hum. Genet.* 32:743 - 755.

253. De Grouchy, J., Turleau, C. 1978. Atlas de las enfermedades cromosómicas. Marín S.A. Barcelona, España.
254. Matsunaga, E., Akisa, C., Hidetsune, O., Kikuchi, Y. 1978. Re-examination of paternal age effect in Down's syndrome. Hum. Genet. 40:259 - 268.
255. Erikson, J.D. 1979. Paternal age and Down syndrome. Hum. Genet. 31:489 - 497.
256. Ghosh, P.K., Nand, R. 1982. The role of chromosome heteromorphism in the developmental anomalies, In Advances in the study of Birth Defects. Vol. 5. Genetic Disorders. (Persaud, T.V.N. ed.) A.R. Liss. Inc. New ork. 38 - 50.
257. Shabtai, F.S., Halbretch, I. 1982. Human chromosome polymorphism and congenital defects. In Advances in the study of Birth Defects. Vol. 5. Genetic Disorders. (Persaud, T.V. N. ed) A.R. Liss. Inc. New York. 38 - 50.
258. Hsu, T.C. 1975. A possible function of constitutive heterochromatin: the bodyguard hypothesis. Genetics. 79:(suppl.), 113.
259. Funderburk, S.J., Sparkes, R.S., Guthrie, D., Westtake, J.R. 1976. The significance of minor chromosome variants. In Fifth International Congress of Human Genetics. Mexico. 125.
260. Patil, S.R., Lubs, H.A. 1977. A possible association of long Y chromosomes and fetal loss. Hum. Genet. 35:233-239.
261. Wang, H.S., Hamerton, J.L. 1979. G-band polymorphisms of chromosomes 1, 9 y 16 in four subgroups of mentally retarded patients with diagnosed chromosome aberrations. Hum. Genet. 51:269 - 281.
262. Jacobs, P.A. 1974. Correlation between euploid structural chromosome rearrangements and mental subnormality in humans. Nature. 249:164 --173.
263. Verhest, A., Lustman, F. 1980. Y chromosome structural rearrangement in Ph chromosome negative chronic myelogenous leukemia. N. Engl. J. Med. 303:53 - 57.
264. Sutherland, G.R. 1979. Heritable fragile site on human chromosomes II. Distribution, phenotypic effects and cytogenetics. Am. J. Hum. Genet. 31:136 - 147.
265. Ray, M. 1982. Chromosomal abnormalities in single gene disorders. In Advances in the study of Birth Defects. - Vol. 5. Genetic Disorders. (Persaud, T.V.N. ed.) A.R. Liss Inc. New York. 1 - 13.

266. Hirsch-Kauffman, M., Schweiger, M., Wagner, E.F., Sperling, K. 1978. Deficiency of DNA ligase activity in Fanconi's anemia. *Hum. Genet.* 45:25 - 32.
267. Emerit, I. 1979. Chromosomal abnormalities in progressive systemic sclerosis. *Clin. Rheumat.* 5:201 - 213.
268. Erickson, J. 1983. Defining the centromere. *The American Biology Teacher.* 45:32 - 37.
269. Howard-Peebles, P.N., Stoddard, G.R. 1979. X-linked mental retardation with macro-orchidism and marker X chromosome. *Hum. Genet.* 50:247 - 251.
270. Brondum Nielsen, K., Towmerup, N., Dyggue, H., V., Schou, C. 1982. Macroorchidism and fragile site in mentally retarded males including two with the fragile site at Xq28, fra(X)(q28). *Hum. Genet.* 61:113 - 117.
271. Ledbetter, D.H., Mascarello, J., T., Ricardi, V.M., Harper, D.V., Airhart, S.D., Sobel, R.J. 1982. Chromosome 15 abnormalities and the Prader Willi syndrome. A follow-up report of 40 cases. *Am. J. Hum. Genet.* 34:278 - 285.
272. Jacobs, P.A., Hunt, P.A., Mayer, M., Bart, R.D. 1981. Duchenne muscular dystrophy (DMD) in a female with an X/autosome translocation: further evidence that DMD locus is at Xp21. *Am. J. Hum. Genet.* 33:513 - 518.
273. Rowley, J.D. 1980. Chromosome abnormalities in human leukemia. *Ann. Rev. Genet.* 14:17 - 39.
274. Yunis, J.J. 1981. Specific fine chromosomal defects in cancer: an overview. *Hum. Pathol.* 12:503 - 515.
275. Golomb, H.M., Rowley, J.D. 1981. Significance of cytogenetic abnormalities in acute leukemia. *Hum. Pathol.* 12:515 - 522.
276. Lawler, S.D. 1982. Significance of chromosome abnormalities in leukemia. *Seminars in Hematology.* 19:251 - 272.
277. Rowley, J.D. 1976. The role of cytogenetics in hematology. *Blood.* 48:1 - 17.
278. Nowell, P.C. 1981. Preleukemias. *Hum. Pathol.* 12:522 - 530.
279. Sandberg, A.A. 1981. Chromosome changes in the lymphomas. *Hum. Pathol.* 12:531 - 539.
280. Rivers, H., Turleau, C., de Grouchy, J., Junien, C., Despoisse, S., Zucker, J.M. 1981. Retinoblastoma del(13q14). Report of two patients, one with a trisomic sib due to maternal insertion. Gene Dosage effect for stearylase D. *59:211 - 214.*

281. Toomey, K.E., Rotter, J.I., Mohandas, T., Kaback, M.M. 1978. Pericentric inversion of chromosome 7 and a balanced 10:19 translocation in skin and blood of an individual with acute myelogenous leukemia. (AML) Birth Defects. Orig. Artic. Ser. 14:424-425.
282. Orkin, S.H., Kazazian, H.H., Antonarakis, S.E., Goff, S.G., Boehm, C.D., Sexton, J.P., Waber, P.G., Giardina, P.J.V. 1982. Linkage of β thalassaemia mutations and the β globin gene polymorphisms with DNA polymorphisms in human β globin gene clusters. Nature. 295: 627 - 631.
283. Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98:503 - 516.
284. Little, P.F.R., Annison, G., Darling, S., Williamson, R., Camba, L., Model, B. 1980. Model for antenatal diagnosis of β thalassaemia and other monogenic disorders by molecular analysis of linked DNA polymorphisms. Nature. 285:144 - 147.
285. Kan, Y.W., Dozy, A.M. 1978. Polymorphism of DNA sequence adjacent to human β globin structural gene: relationship to sickle mutation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:5631 -- 5635.
286. Kan, Y.W., Dozy, A.M. 1978. Antenatal diagnosis of sickle cell anemia by DNA analysis of amniotic fluid cells. Lancet. 2: 910 - 912.
287. Panny, S.R., Scott, A.F., Smith, K.D., Phillips, J.A., Kazazian, H.H., Talbot, C.C., Boehm, C.D. 1981. Population heterogeneity of the Hpa I restriction site associated with the β globin gene: implications for prenatal diagnosis. Am. J. Hum. Genet. 33:25 - 35.
288. Asmussen, M.A., Clegg, M.T. 1982. Use of restriction fragment length for genetic counseling: population genetic considerations. Am. J. Hum. Genet. 34:369 - 380.
289. Niebuhr, E. 1978. The cri du chat syndrome. Epidemiology, cytogenetics and clinical features. Hum. Genet. 44:227 - 237.
290. Kofman-Alfaro, S. 1982. Diferenciación sexual normal y patológica. Rev. Med. Hosp. Gral. Mex. 45:325 - 334.
291. Fryns, J.P., Petit, P., Van der Berghe, H. 1981. The various phenotypes in Xp deletion. Observations in eleven patients. Hum. Genet. 57:385 - 387.
292. Kalousek, D., Cushman, C.J., Rudner, M., Arronet, G.H., Fraser, F.C. 1978. 47, Xi(Xq)Y karyotype in Klinefelter's syndrome. Hum. Genet. 43: 107 - 110.

293. Kofman, S., Pérez-Palacios, G., Medina, M., Escobar, N., García, M., Ruz, L., Mutchinick, O., Lisker, R. 1981. Clinical and endocrine spectrum in patients with the 45,X/46,XV karyotype. *Hum. Genet.* 58:373 - 376.
294. Mutchinick, O., Lisker, R., Babinaky, V. 1982. Registro y vigilancia epidemiológica de malformaciones congénitas externas. *Rev. Med. Hosp. Gral. Mex.* 45:287 - 293..