

31
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

"ZARAGOZA"

EXPRESION DE SITIOS FRAGILES EN CROMOSOMAS
HUMANOS EN MEDIO DEFICIENTE DE ACIDO FOLICO,
POR LA ACCION COMPETITIVA DEL METOTREXATE,
EN CULTIVO DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

RICARDO RAMIREZ ESPINOSA



MEXICO, D. F.

1986.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

CONTENIDO.	PAGINA
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
MATERIAL Y METODO	22
RESULTADOS	27
DISCUSION Y CONCLUSIONES	38
REFERENCIAS	45

R E S U M E N .

RESUMEN.

EN ESTE TRABAJO SE ADAPTÓ LA TÉCNICA DE SUTHERLAND (1977) PARA EL CULTIVO DE LINFOCITOS, MODIFICADA PARA LA EXPRESIÓN DE SITIOS FRÁGILES EN CROMOSOMAS HUMANOS (IN VITRO). SE TRABAJARON 32 MUESTRAS DE SANGRE DE PACIENTES QUE ACUDIERON AL LABORATORIO DE GENÉTICA DEL H.G.C.M. "LA RAZA", LOS CUALES FUERON AGRUPADOS DE LA SIGUIENTE MANERA:

GRUPO I : 19 CON DIAGNOSTICO DE RETRASO MENTAL (RM).
GRUPO II : 4 MADRES DE ALGUNOS DE ESTOS INDIVIDUOS CON RM.
GRUPO III : 9 NORMALES (GRUPO CONTROL).

EL ANALISIS DE LOS CROMOSOMAS SE REALIZÓ EN CULTIVO DE LINFOCITOS, TRABAJANDO 5 CULTIVOS POR MUESTRA, CADA UNO SEMBRADO EN DIFERENTES CONDICIONES: 1) EN MEDIO 199 DEFICIENTE DE ÁCIDO FÓLICO 0.01 µg/ML (CONTROL POSITIVO); 2) EN MEDIO RPMI 1640 CON PRESENCIA DE ÁCIDO FÓLICO 1.0 µg/ML (CONTROL NEGATIVO); 3, 4 Y 5 EN EL MISMO MEDIO RPMI 1640 ADICIONÁNDOLE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE METOTREXATE (MTX 10^{-4} MG/ML) A CADA UNO; 3.913, 7.773 Y 15.54 RESPECTIVAMENTE.

LOS RESULTADOS OBTENIDOS MOSTRARON QUE EMPLEANDO EL MEDIO 199 SE OBTUVO EXPRESIÓN DE SITIOS FRÁGILES EN SOLO 2 MUESTRAS (UNA DEL GRUPO I Y UNA DEL GRUPO II), MIENTRAS QUE CON EL MEDIO RPMI 1640 SIN MTX NO HUBO EXPRESIÓN DE SITIOS FRÁGILES, Y CON MTX SI HUBO SITIOS FRÁGILES EN VARIAS MUESTRAS, ENCONTRÁNDOSE QUE LA CONCENTRACIÓN DE 3.913×10^{-4} MG/ML FUE LA MÁS ADECUADA PARA ÉSTA EXPRESIÓN.

I N T R O D U C C I O N .

INTRODUCCION.

EL ESTUDIO DE LOS CROMOSOMAS HUMANOS HA INQUIETADO A LOS CIENTIFICOS DESDE QUE FUERON DESCUBIERTAS ESTAS PEQUEÑAS ESTRUCTURAS INTRANUCLEARES. LOS PRIMEROS ESTUDIOS DE CITOGENÉTICA SE REALIZARON CASI EXCLUSIVAMENTE EN PLANTAS E INVERTEBRADOS. A PARTIR DE QUE LOS CROMOSOMAS FUERON RECONOCIDOS COMO ESTRUCTURAS BIEN DEFINIDAS, SE INICIARON TRABAJOS PARA DETERMINAR EL NÚMERO CROMOSÓMICO EN EL HOMBRE.

LA CITOGENÉTICA HA SIDO IMPULSADA POR EL DESARROLLO DE NUEVAS TÉCNICAS MICROSCÓPICAS. DESDE EL PUNTO DE VISTA MOLECULAR, EL CONOCIMIENTO DE LA ESTRUCTURA DE LA CROMATINA Y DE LOS CROMOSOMAS SE HA INVESTIGADO CON TÉCNICAS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA FACILITANDO EL ESTUDIO DE LOS CROMOSOMAS MITÓTICOS QUE PUEDEN AHORA CARACTERIZARSE POR PATRONES DE BANDAS, LO QUE FACILITA SU IDENTIFICACIÓN INDIVIDUAL (1,13).

ENTRE LOS ADELANTOS TÉCNICOS QUE HICIERON POSIBLE EL AVANCE DE LA CITOGENÉTICA HUMANA SOBRESALEN: 1) EL USO DE LA COLCHICINA COMO INHIBIDOR DE LA FORMACIÓN DE LAS FIBRAS DEL HUSO ACROMÁTICO, OBTENIENDO DURANTE LA MITOSIS EL ARRESTO DE LAS CÉLULAS EN METAFASE, LA CONDENSACIÓN DE LOS CROMOSOMAS Y LA DISPERSIÓN DE LOS MISMOS EN EL CITOPLASMA. 2) EL TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS CON UNA SOLUCIÓN HIPOTÓNICA, QUE HINCHA LAS CÉLULAS Y FAVORECE LA SEPARACIÓN DE LOS CROMOSOMAS EN METAFASE (1,12,13). DEBIDO A ESTOS ADE-

LANTOS EN LA INVESTIGACIÓN CITOGENÉTICA SE HAN PODIDO DETEC-
TAR DIFERENTES ALTERACIONES CROMOSÓMICAS Y ESTRUCTURALES
(1,13).

CARIOTIPO HUMANO.

EL TÉRMINO CARIOTIPO SE REFIERE AL ARREGLO SIS-
TEMÁTICO DEL COMPLEMENTO CROMOSÓMICO DE UNA CÉLULA. LOS
CROMOSOMAS SON ESTRUCTURAS CONSTITUIDAS DE PROTEINAS Y ÁCI-
DOS NUCLÉICOS, QUE VARIAN EN FORMA Y TAMAÑO Y TIENEN LA FA-
CILIDAD DE TEÑIRSE INTENSAMENTE CON COLORANTES BÁSICOS. Es
TAN FORMADOS POR DOS CROMÁTIDAS QUE SE ENCUENTRAN UNIDAS
POR EL CENTRÓMERO O CONSTRICCIÓN PRIMARIA, QUE A SU VEZ, ES
EL SITIO DE UNIÓN DE LAS FIBRAS DEL HUSO. LA POSICIÓN DEL
CENTRÓMERO ES VARIABLE, SI SE ENCUENTRA EN LA PARTE MEDIA
DEL CROMOSOMA, SERÁ METACÉNTRICO; SI SE ENCUENTRA DESPLAZA-
DO HACIA UN EXTREMO DANDO BRAZOS DE DIFERENTE TAMAÑO SERÁ
SUBMETACÉNTRICO; Y SI ESTA CERCA DEL EXTREMO FINAL SERÁ A-
CROCÉNTRICO, EL CUAL PUEDE PRESENTAR SATÉLITES QUE SON CUER-
POS ESFÉRICOS UNIDOS POR UN FILAMENTO CROMATÍNICO DELGADO Y
CON FUNCIÓN DE ORGANIZADORES NUCLEOLARES. EL BRAZO CORTO
DE UN CROMOSOMA SE DESIGNA POR LA LETRA (P), Y EL LARGO POR
(q) (Fig. 1). (5,24,27,45).

A LO LARGO DE LOS CROMOSOMAS SE ENCUENTRAN ES-
TRECHAMIENTOS CROMOSÓMICOS CONSTANTES EN TAMAÑO Y POSICIÓN
A LOS QUE SE LES HA LLAMADO CONSTRICCIONES SECUNDARIAS, EN

DONDE EL ÁCIDO DESOXIRIBONUCLEICO (ADN) DE ESTAS CONSTRIC-
CIONES ES DE REPLICACIÓN TARDÍA Y ALGUNAS ÁREAS DE ÉSTAS
SON SUSCEPTIBLES A SUFRIR RUPTURAS. LOS CROMOSOMAS 1,9,16
Y EL CROMOSOMA "Y" DEL CARIOTIPO HUMANO (FIG. 2) PRESENTAN
CONSTANTEMENTE ESTOS MARCADORES (5).

LA CLASIFICACIÓN BÁSICA DE LOS CROMOSOMAS HUMA-
NOS EN METAFASE FUE DERIVADA DE LA CONFERENCIA DE DENVER
(DENVER REPORT, 1960) CON REVISIONES POSTERIORES EN LAS CON-
FERENCIAS DE LONDRES (1963) Y CHICAGO (1966), EN DONDE SE A-
CORDO NUMERAR LOS AUTOSOMAS EN PARES DEL 1 AL 22 BASÁNDOSE
EN SU TAMAÑO DECRECIENTE, POSICIÓN DEL CENTRÓMERO, PRESEN-
CIA DE SATÉLITES Y CONSTRICCIONES SECUNDARIAS, MIENTRAS QUE
LOS CROMOSOMAS SEXUALES FUERON DESIGNADOS "X" Y "Y". LOS
22 PARES DE AUTOSOMAS SE DIVIDEN EN SIETE GRUPOS ORDENADOS
DE LA A A LA G (FIG. 2). (24,27,45).

LA IDENTIFICACIÓN ESPECÍFICA DE CADA UNO DE LOS
CROMOSOMAS FUE POSIBLE EN 1970 CUANDO CASPERSON Y COLS. DE-
MOSTRARON QUE LOS CROMOSOMAS TEÑIDOS CON COLORANTES DE GUI-
NACRINA PRODUCEN PATRONES CARACTERÍSTICOS Y REPRODUCIBLES
DE BANDAS HACIENDO POSIBLE LA IDENTIFICACIÓN DE CADA CROMO-
SOMA EN EL CARIOTIPO HUMANO. A PARTIR DE ENTONCES NUMERO-
SAS TÉCNICAS QUE PRODUCEN PATRONES DE BANDAS EN CROMOSOMAS
EN METAFASE HAN SIDO REPORTADAS. CADA BRAZO CROMOSÓMICO ES
TA DIVIDIDO EN CIERTO NÚMERO DE BANDAS, SIN SOLUCIÓN DE CON-
TINUIDAD. ESTAS BANDAS SE REÚNEN POR REGIONES DELIMITADAS

POR PUNTOS DE REFERENCIA (BANDAS PRINCIPALES). LAS BANDAS Y LAS REGIONES SE DEFINEN POR NÚMEROS Y EL CENTRÓMERO SIRVE DE PUNTO DE ORIGEN PARA SU NUMERACIÓN. UN PUNTO CUALQUIERA EN UN CROMOSOMA SE INDICA POR: A) EL NÚMERO DEL CROMOSOMA; B) P ó q SEGÚN LOS CASOS; C) EL NÚMERO DE LA REGIÓN Y D) EL NÚMERO DE LA BANDA. POR EJEMPLO: 3q²⁴ CORRESPONDE A UN PUNTO SITUADO APROXIMADAMENTE HACIA LA MITAD DEL BRAZO LARGO DEL CROMOSOMA 3 (45). EN LA FIGURA 3 SE MUESTRA LA REPRESENTACIÓN DIAGRAMÁTICA DE LOS PATRONES DE BANDAS Q, G Y R DE ACUERDO A LA CONFERENCIA DE PARÍS EN 1971 (45).

CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LOS CROMOSOMAS HUMANOS.

GRUPO	PARES DE CROMOSOMAS	CLASIFICACIÓN
A	1 - 3	- 1 y 3 METACÉNTRICOS, 2 SUBMETACÉNTRICO.
B	4 - 5	- SUBMETACÉNTRICOS.
C	6 - 12	- SUBMETACÉNTRICOS, MÁS PEQUEÑOS QUE LOS B.
D	13 - 15	- ACROCÉNTRICOS, CON PRESENCIA DE SATÉLITES.
E	16 - 18	- SUBMETACÉNTRICOS PEQUEÑOS.
F	19 - 20	- METACÉNTRICOS PEQUEÑOS.
G	21 - 22	- ACROCÉNTRICOS PEQUEÑOS CON SATÉLITES.
CROMOSOMAS SEXUALES	X - Y	- EL CROMOSOMA X ES SUBMETACÉNTRICO Y EL Y ES MÁS LARGO QUE LOS DEL GRUPO G Y CARECE DE SATÉLITES.

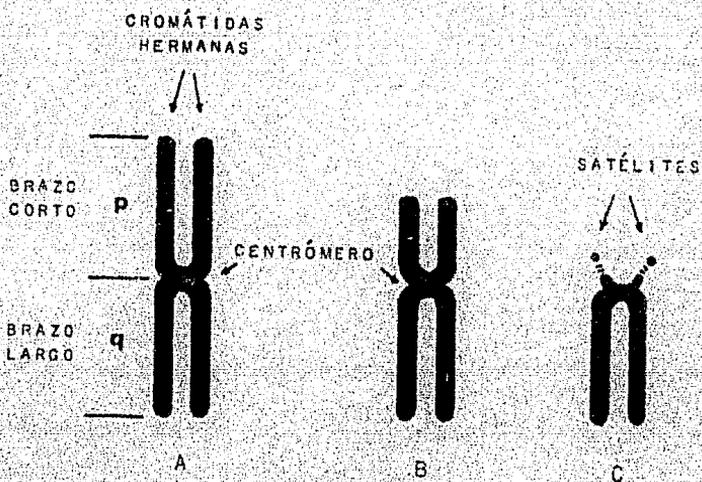


FIG. 1 : CLASIFICACIÓN DE LOS CROMOSOMAS DE ACUERDO A LA POSICIÓN DEL CENTRÓNERO; A) METACÉNTRICO; B) SUBMETACÉNTRICO Y C) ACROCÉNTRICO (45).

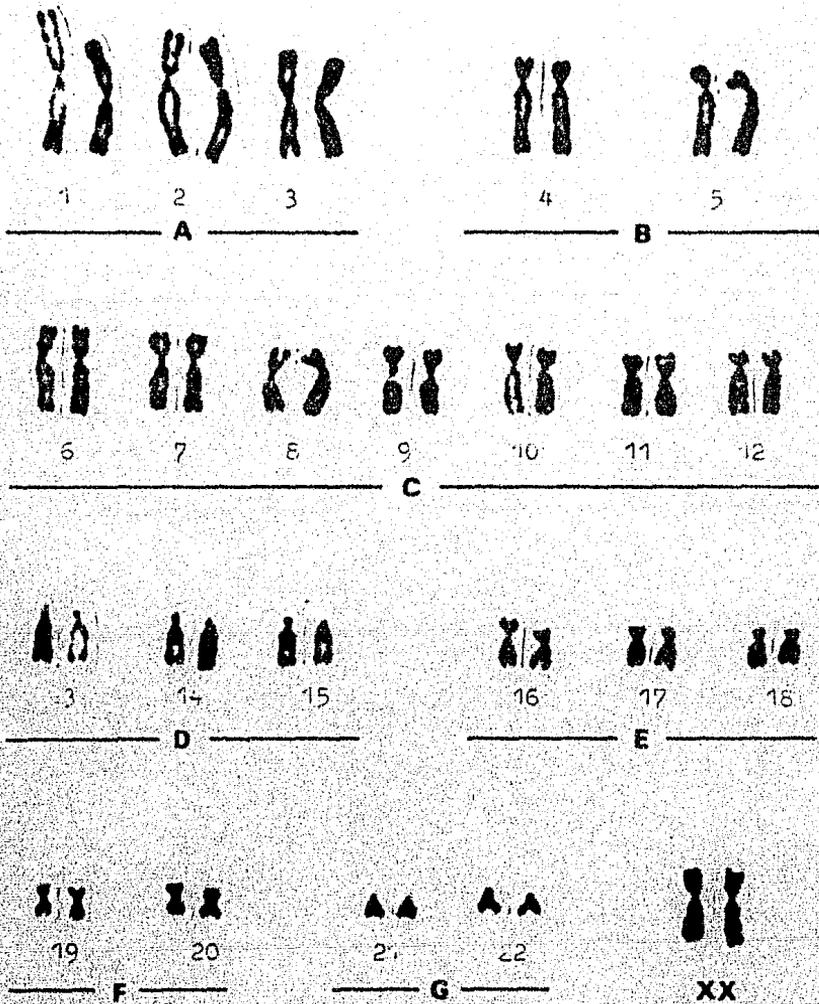


FIG. 2: CAROTIPO HUMANO NORMAL 46 XX (CLASIFICACIÓN DE ACUERDO A LA CONFERENCIA DE DENVER, 1960) (45).

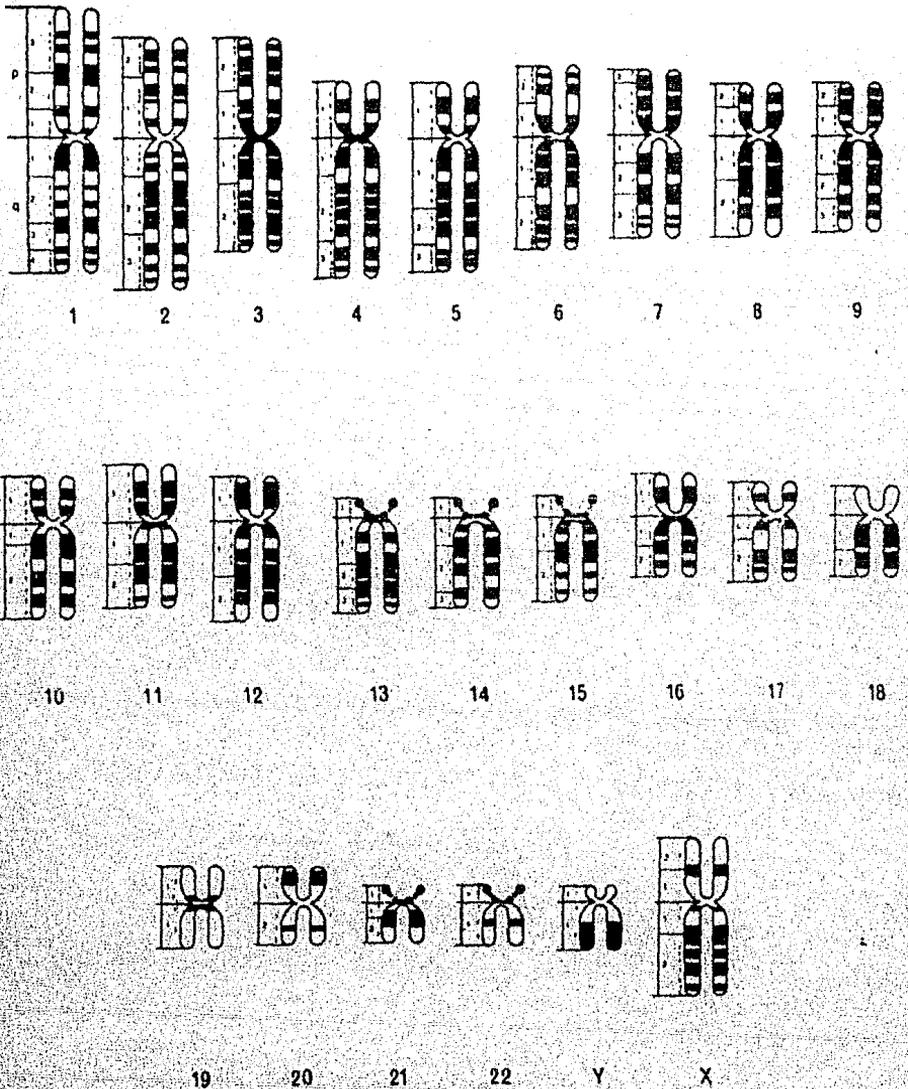


FIG. 3: IDENTIFICACIÓN DE LAS BANDAS CROMOSÓMICAS DEL CAROTIPO DE ACUERDO CON EL SISTEMA DE LA CONFERENCIA DE PARÍS, 1971 (45). BANDAS CLARAS C Y G NEGATIVAS, R POSITIVAS; BANDAS OSCURAS C Y G POSITIVAS, R NEGATIVAS.

SITIOS FRÁGILES EN CROMOSOMAS HUMANOS.

UN SITIO FRÁGIL (SF) ES UNA REGIÓN ESPECÍFICA EN UN CROMOSOMA LA CUAL SE PRESENTA COMO UNA BRECHA NO TENIDA DE ANCHURA VARIABLE QUE INVOLUCRA AMBAS CROMÁTIDAS. EL SITIO ES SIEMPRE EL MISMO PUNTO DEL CROMOSOMA DE LAS CÉLULAS DE UN INDIVIDUO O DE UNA PARENTELA Y SE HEREDA EN UNA FORMA MENDELIANA DOMINANTE. LA FRAGILIDAD PUEDE SER EVIDENTE POR LA PRODUCCIÓN DE FRAGMENTOS ACÉNTRICOS, FIGURAS TRIRADIALES Y CROMOSOMAS SUPRIMIDOS. LOS SF PUEDEN SER DESIGNADOS CON LA TRIPLETA -FRA- POR EJEMPLO, EL SF EN EL CROMOSOMA 2, EN LA BANDA 13 DE LOS BRAZOS LARGOS, SE ESCRIBIRIA: FRA(2)(q13), (11,14).

LOS SF HAN MOSTRADO SER UNO DE LOS FENÓMENOS MÁS CURIOSOS DENTRO DEL CAMPO DE LA CITOGÉNÉTICA. A EXCEPCIÓN DEL HUMANO NO HAN SIDO REPORTADOS EN OTROS MAMÍFEROS, Y NUNCA SON EVIDENTES EN EL 100 % DE CÉLULAS EXAMINADAS (19, 35).

EL TÉRMINO "SITIO FRÁGIL", FUE ACUÑADO EN 1969 POR HECHT F. (18), A TRAVÉS DEL ESTUDIO DE UNA FAMILIA CON EL SF EN EL CROMOSOMA 16. LA PRIMERA OBSERVACIÓN DE UN SF EN CROMOSOMAS HUMANOS FUE REPORTADA POR DEKABAN EN 1965, (10) ENCONTRÁNDOSE EN EL BRAZO LARGO DE UN CROMOSOMA DEL GRUPO C.

LA PRESENCIA DE SF EN LOS CROMOSOMAS HUMANOS HA SIDO ESTUDIADA PARA EXPLICAR LA POSIBLE RELACIÓN QUE EXISTE

ENTRE ÉSTOS Y EL RETRASO MENTAL (RM:) (17,21,26,29,36,46).

CONEN Y ERKAM EN 1966, (7) REPORTAN UN NIÑO CON SÍNDROME DE DOWN Y LEUCEMIA QUIEN MOSTRÓ EN UN GRAN NÚMERO DE CÉLULAS EXAMINADAS UNA FRACTURA EN EL BRAZO CORTO DEL CROMOSOMA 2 CERCA DEL CENTRÓMERO. TARTAGLIA Y COLS. EN 1966, (43) PRESENTAN UN PACIENTE CON HIPOPLASIA ERITROIDÉA CONGÉNITA QUIEN TENÍA UN SEGMENTO NO TEÑIDO EN UN BRAZO DEL CROMOSOMA 1, AFECTANDO SOLO UNA CROMÁTIDA. BROGGER EN 1968 (2) ESTUDIÓ A UN NIÑO QUE TENÍA RETRASO MENTAL CON UNA BRECHA EN EL CENTRO DE UN BRAZO DEL CROMOSOMA 3 QUE PARECE SER FRÁGIL, PERO TAMBIÉN AFECTANDO SÓLO UNA CROMÁTIDA.

LEJEUNE Y COLS. EN 1968, (22) FUERON LOS PRIMEROS EN MOSTRAR UNA SEMEJANZA DE SF COMO SI FUERAN HEREDADOS, EN ESTUDIOS QUE SE REALIZARON EN UNA MUJER Y SU HIJA, Y DESCRIBEN UN SF EN EL CROMOSOMA 2q1. FERGUSON-SMITH EN 1973, (11) ANALIZÓ UN HETEROMORFISMO QUE SE PRESENTA EN LA REGIÓN PARACÉNTRICA DE LA CONSTRICCIÓN SECUNDARIA EN EL BRAZO LARGO DEL CROMOSOMA 2, EN EL ESTUDIO DE UNA FAMILIA SE OBSERVÓ QUE LA FRAGILIDAD DE ESTE CROMOSOMA ES HEREDADA COMO BRECHAS ISOCROMÁTICAS O COMO FIGURAS TRIIRRADIALES.

GIRAUD Y COLS. EN 1976, (15) ESTUDIARON UN GRAN NÚMERO DE CROMOSOMAS DEL GRUPO C CON SF Y FUERON LOS PRIMEROS EN IDENTIFICAR ESPECIFICAMENTE LA SEMEJANZA DE LOS CROMOSOMAS DE ESTE GRUPO Y REPORTAR LOS SF EN 10q24 y 12q13. EL SF EN EL EXTREMO DISTAL DEL CROMOSOMA "X" FUE DESCRITO

PRIMERO POR LUBS EN 1969, (25) MOSTRANDO QUE ERA HEREDABLE Y QUE ESTABA ASOCIADO CON EL RETRASO MENTAL, HARVEY Y COLS. EN 1977, (17) LO CONFIRMAN.

ORIGEN DE SITIOS FRÁGILES.

LAS PRIMERAS SUPOSICIONES QUE SE HICIERON SOBRE EL ORIGEN DE LOS SF FUERON REALIZADAS POR CHAUDHURI EN 1972 (6) QUIEN EXAMINÓ LA NATURALEZA DE LAS BRECHAS EN LAS CROMÁTIDAS, CONCLUYENDO QUE LOS SF SE ORIGINABAN COMO RESULTADO DE UN DESENCOLLAMIENTO EXTREMO DEL ADN DEBIDO A UNA FALLA EN EL GRADO DE COMPACTACIÓN DEL CROMOSOMA EN METAFASE, CONSIDERANDO TRES FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA ESPIRALIZACIÓN DEL CROMOSOMA; EL ADN, LAS HISTONAS Y LOS CATIONES BIVALENTES. ADEMÁS, CONSIDERÓ QUE LOS SF PUEDEN SER HEREDADOS COMO BRECHAS ISOCROMÁTICAS QUE TENÍAN LUGAR EN ALGUNOS PROCESOS OCURRIDOS EN LA FASE G_2 DEL CICLO CELULAR, TENIENDO INFLUENCIA DIRECTA EN EL TIEMPO DE ENROLLAMIENTO DE LAS CROMÁTIDAS EN PROFASE TEMPRANA (6).

POSTERIORMENTE SURGIÓ OTRA EXPLICACIÓN SUGERIDA POR LA NATURALEZA DE LOS INHIBIDORES E INDUCTORES DE LOS SF, INDICANDO QUE EL PROCESO DE EXPRESIÓN ES MÁS PRÓBABLE QUE SEA OPERADO DURANTE LA SÍNTESIS DEL ADN (34). EL METABOLISMO DEL ÁREA INVOLUCRADA PUEDE ESTAR IMPLICADO POR LA SIGUIENTE REACCIÓN CATALIZADA POR LA ENZIMA TIMIDILATO SINTETASA:

URIDINA MONOFOSFATO (dUMP) + 5,10-METILÉN-TETRAHIDROFOLATO
(5,10-METHFA)

TIMIDILATO ↓ SINTETASA

TIMIDINA MONOFOSFATO (dTMP) + DIHIDROFOLATO (DHFA)
(ÁCIDO TIMIDÍLICO)

EL ÁCIDO DESOXITIMIDÍLICO (dTMP) SE FORMA A PARTIR DEL ÁCIDO DESOXIURIDÍLICO (dUMP) POR LA ACCIÓN DE LA TIMIDILATO SINTETASA, QUE CATALIZA LA METILACIÓN DEL RESTO URACILO EN UNA REACCIÓN QUE REQUIERE LA PARTICIPACIÓN DE UN ÁCIDO FÓLICO COMO COENZIMA, EL 5,10-METILÉN-TETRAHIDROFOLATO QUE ACTUA COMO DONADOR DE METILO (16,23).

ESTA REACCIÓN ES MÁS LENTA DE LO NORMAL CUANDO NO HAY UNA CONCENTRACIÓN ADECUADA DE ÁCIDO FÓLICO, EL CUAL ES INDISPENSABLE PARA LA SÍNTESIS DE LAS PURINAS Y DE LA TIMINA, ES DECIR, A LA PIRIMIDINA METILADA DEL ADN, YA QUE EN SU PRESENCIA SE PRODUCEN CANTIDADES MAYORES DE dTMP QUE SON REQUERIDAS PARA LA SÍNTESIS DEL ADN, Y AL NO HABER UNA PRODUCCIÓN ADECUADA DE dTMP ES CUANDO SE ORIGINA LA FORMACIÓN DE SF, IMPLICANDO QUE ÉSTOS SON DÉBILES EN LA SECCIÓN DE LA CADENA DE ADN COMPUESTA POR TIMIDINA, HACIENDO MÁS DIFÍCIL LA COMPACTACIÓN DURANTE LA MITOSIS (34).

EXPRESIÓN DE SITIOS FRÁGILES.

LA EXPRESIÓN DE LOS SF EN CULTIVO DE LINFOCITOS ES DEPENDIENTE DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO UTILIZADO, SIENDO LA DEFICIENCIA DE ÁCIDO FÓLICO Y TIMIDINA UN FACTOR NECESARIO PARA SU EXPRESIÓN, YA QUE ESTOS COMPUESTOS LA INHIBEN. EL MEDIO 199 ES DEFICIENTE DE ÁCIDO FÓLICO (YA QUE SOLAMENTE CONTIENE 0.01 MG/L). ESTUDIOS PRELIMINARES REALIZADOS POR SUTHERLAND EN 1979, HAN DEMOSTRADO QUE EL ÁCIDO FÓLICO SI TIENE IMPORTANCIA DIRECTA EN LA EXPRESIÓN DE LOS SF (32,34).

LA EXPRESIÓN DE LOS SF EN CROMOSOMAS HUMANOS OBTENIDOS DE CULTIVOS DE LINFOCITOS ES INHIBIDA POR ÁCIDO FÓLICO, TIMIDINA Y ÁCIDO FOLÍNICO, Y ES INDUCIDA POR METOTREXATE (MTX), BROMODESOXIURIDINA (BRDU), FLUORODESOXIURIDINA (FUDR), FLUORODESOXICITIDINA (FCDR) Y DISTAMICINA A (9, 19, 26, 32, 34, 38, 39, 41).

ALGUNOS SF COMO EL DEL CROMOSOMA 16 EN LOS BRAZOS q, REQUIEREN ALTAS CONCENTRACIONES DE ÁCIDO FÓLICO PARA INHIBIR SU EXPRESIÓN, SIENDO SENSIBLE HASTA 80 MG/L, A DIFERENCIA DE OTROS QUE SON COMPLETAMENTE INHIBIDOS CON CONCENTRACIONES DE 0.2 A 1.0 MG/L (34). EL TIEMPO DE ADICIÓN DE ÁCIDO FÓLICO ES IMPORTANTE PARA AQUELLOS SITIOS SENSIBLES A ÉSTE, LA EXPRESIÓN DE LOS SF ES ALTAMENTE INHIBIDA CUANDO SE ADICIONA 24 HORAS ANTES DE LA COSECHA (32,34).

EL ÁCIDO FÓLICO O FOLACINA (FIG. 4), ES UNA VITAMINA HIDROSOLUBLE QUE JUEGA UN PAPEL IMPORTANTE EN LAS REACCIONES QUE CONDUCE A LA SÍNTESIS DE LAS PURINAS Y DE LA TIMINA, ADEMÁS, PARTICIPA EN EL CRECIMIENTO Y EN LA DUPLICACIÓN DE LA CÉLULA Y SU DEFICIENCIA EN LOS MAMÍFEROS PROVOCA UNA DISMINUCIÓN DEL CRECIMIENTO Y LA APARICIÓN DE DIVERSAS FORMAS DE ANEMIA. EL SÍNTOMA BIOQUÍMICO MÁS SOBRESALIENTE DE LA DEFICIENCIA DE ÁCIDO FÓLICO ES EL IMPEDIMENTO DE LA BIOSÍNTESIS DE LAS PURINAS Y DE LA TIMINA (3,16, 23,30,40). TAMBIÉN SON UTILIZADAS PEQUEÑAS DOSIS DE ÁCIDO FÓLICO COMO TERAPIA EN ALGUNOS ESTUDIOS DE SÍNDROMES RELACIONADOS CON EL CROMOSOMA "X" FRÁGIL Y SE HA OBSERVADO UNA DISMINUCIÓN EN LA FRECUENCIA DE EXPRESIÓN DE ESTE CROMOSOMA (3,4,30,40).

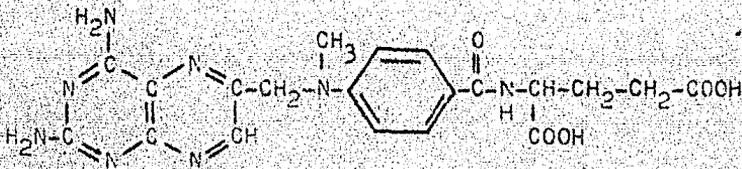
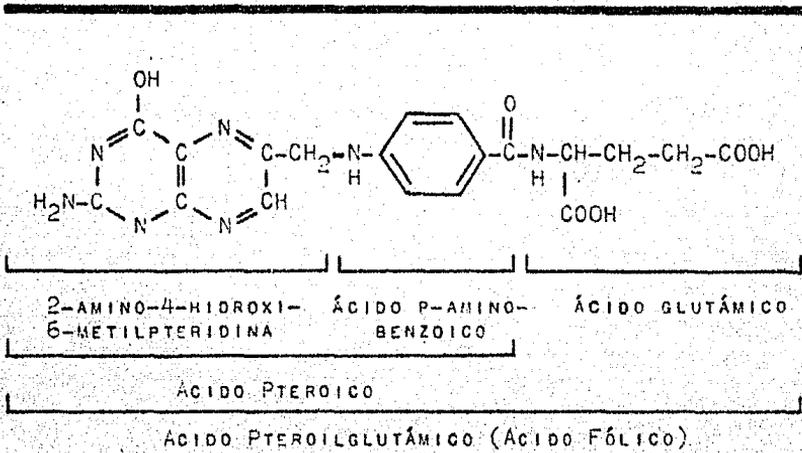
PARA QUE EL ÁCIDO FÓLICO PUEDA FUNCIONAR EN ESTAS REACCIONES DE METILACIÓN DEBE SER REDUCIDO PRIMERO A ÁCIDO DIHIDROFÓLICO (FH_2) Y DESPUÉS AL COMPUESTO TETRAHIDROFÓLICO (FH_4) SIENDO ESTAS REACCIONES CATALIZADAS POR UNA REDUCTASA DEL ÁCIDO FÓLICO EMPLEANDO NADPH COMO DONADOR DE HIDRÓGENO. LA FORMA ACTIVA O COENZIMA DEL ÁCIDO FÓLICO ES EL ÁCIDO TETRAHIDROFÓLICO CUYA FUNCIÓN PRINCIPAL ES LA TRANSFERENCIA DE UN GRUPO MONOCARBONADO, LA FORMACIÓN DEL TIMIDILATO ES ESPECIALMENTE SENSIBLE A LOS NIVELES DISMINUIDOS DE TETRAHIDROFÓLICO (16,23).

LOS ANTAGONISTAS DEL ÁCIDO FÓLICO COMO EL MTX O ANETOPTERINA (FIG. 4), SON INHIBIDORES DE LA CONVERSIÓN

DEL DIHIDROFÓLATO EN TETRAHIDROFÓLATO POR LA DIHIDROFOLATO-
REDUCTASA. LA FORMACIÓN DEL dTMP Y, POR TANTO, LA DEL ADN,
RESULTA FUERTEMENTE RETRASADA POR ESTOS INHIBIDORES DENOMI-
NADOS ANTIFÓLICOS (16,23).

LA ESTRUCTURA QUÍMICA DE UN INHIBIDOR (I), CO-
MO LO ES EL MTX, ANÁLOGO AL SUBSTRATO (S) COMO EL ÁCIDO FÓ-
LICO, SEMEJA MUCHO LA ESTRUCTURA DEL MISMO Y PUEDE COMBINAR
SE REVERSIBLEMENTE CON LA ENZIMA FORMANDO UN COMPLEJO ENZI-
MA-INHIBIDOR (EI) EN LUGAR DE UN COMPLEJO ENZIMA-SUBSTRATO
(ES). CUANDO TANTO EL SUBSTRATO COMO EL INHIBIDOR SE EN-
CUENTRAN JUNTOS ELLOS COMPITEN POR LOS MISMOS SITIOS DE U-
NIÓN SOBRE LA SUPERFICIE DE LA ENZIMA (16,23).

EL MTX EN CONCENTRACIONES ELEVADAS CUSA EN CUL-
TIVOS DE LINFOCITOS UNA DISMINUCIÓN EN EL ÍNDICE MITÓTICO,
PERO EL CRECIMIENTO PUEDE SER SUFICIENTE PARA OBTENER LA IN-
DUCCIÓN DE LOS SF Y SU EFECTO ES MAYOR CUANDO SE AÑADE 24
HORAS ANTES DE LA COSECHA (34). ESTUDIOS RECIENTES EN CUL-
TIVOS DE FIBROBLASTOS EN MEDIO 199 HAN DEMOSTRADO QUE ESTA
INDUCCIÓN CON MTX PUEDE SER SUPRIMIDA CON ADICIÓN DE PEQUE-
ÑAS CONCENTRACIONES DE 5-AZACITIDINA, YA QUE INTERVIENE EN
LAS REACCIONES DE METILACIÓN DEL ADN Y NO FACILITA LA EXPRE-
SIÓN DE LOS SF (8).



METOTREXATE (AMETOPTERINA)

FIG. 4: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA ESTRUCTURA MOLECULAR DEL ÁCIDO FÓLICO Y UNO DE SUS ANTAGONISTAS, EL METOTREXATE. EL PRIMERO INHIBE LA FORMACIÓN DE SF Y EL SEGUNDO LA INDUCE.

LOCALIZACIÓN DE SITIOS FRÁGILES.

LOS SITIOS FRÁGILES MAS FRECUENTES PUEDEN SER LOCALIZADOS EN LOS CROMOSOMAS: 1p31, 2q11, 2q13, 3p14, 6p23, 7p11, 8q22, 9p21, 9q32, 10q23, 10q25, 11q13, 12q13, 16p12, 16q22, 17p12, 20p11, y Xq27 ó 28 (Fig. 5) (9,11,20,26,31, 35,36,38,42,44).

LOS SITIOS FRÁGILES MENOS FRECUENTES SON LOS SIGUIENTES: 1p36, 1p32, 1p22, 1q25, 1q32, 2p24, 2p13, 2p11, 2q13, 2q31, 2q33, 3p24, 3q27, 5q31, 5q35, 6q21, 7p13, 7q22, 7q32, 11p13, 11q23, 14q24, 22q12, Xp22 y Xq22 (20).

UNA VARIEDAD DE ANORMALIDADES FENOTÍPICAS SON ASOCIADAS CON LOS SF DE LOS AUTOSOMAS Y SUGIEREN QUE ANOLOGAMENTE VAN ACOMPAÑADAS CON MUTACIONES O TRANSLOCACIONES RECÍPROCAS QUE PUEDEN ESTAR RELACIONADAS CON ANORMALIDADES FENOTÍPICAS O CON EL RETRASO MENTAL. CUANDO UN SF SE ORIGINA PUEDE PRODUCIR UN EFECTO ANORMAL, PERO ESTA NO ES UNA EVIDENCIA RELATIVA PARA CONSIDERAR QUE LOS SF SEAN NUEVAS MUTACIONES (19,21,46).

EL SF EN EL CROMOSOMA "X" ES ASOCIADO CON ALGUNAS FORMAS DE RETRASO MENTAL, MACRO-ORQUIDIA, Y OTRAS ANORMALIDADES GENITALES QUE SON DETECTADAS DESPUÉS DE LA PUBERTAD, ADEMÁS, LOS INDIVIDUOS PRESENTAN ANOMALIAS MENORES COMO: NARIZ CORTA Y ANCHA, PABELLONES AURICULARES GRANDES, DE

PECTO DEL LENGUAJE, Y ESCOLIOSIS. PERO TAMBIEN HAY INDIVIDUOS CON MENTALIDAD Y FENOTIPO NORMAL QUE TIENEN EL SF Y AGTÚAN COMO PORTADORES OBLIGADOS QUE PUEDEN DAR ORIGEN A INDIVIDUOS CON RETRASO MENTAL CON UN RIESGO DE UN 20 A 30 % (14, 21, 26, 46).

LA FRECUENCIA DE SF EN AUTOSOMAS ES APROXIMADAMENTE DE 1 EN 444 CASI UN 0.22 % (19), Y EN EL CROMOSOMA "X" EN UNA POBLACIÓN GENERAL ES DE 0.92 EN 1000 (29). SUTHERLAND EN 1978, (33) CONSIDERA QUE LA FRECUENCIA DE 10 CASOS CON SF EN EL CROMOSOMA "X" DE 1680 INDIVIDUOS SANOS, NO TIENE SIGNIFICADO REAL.

EL SF EN EL CROMOSOMA "X" SE CONSIDERA COMO SÍNDROME DEL "X" O COMO RETRASO MENTAL LIGADO AL CROMOSOMA "X" Y ESTABLECE UNA ENTIDAD CLINICOGENÉTICA PARA AQUELLOS INDIVIDUOS QUE TIENEN DICHA ESTRUCTURA Y SE REPORTA COMO FPA(X)(q27). EN ALGUNOS ESTUDIOS REALIZADOS EN VARIAS GENERACIONES SE HA OBSERVADO UN PATRÓN EN EL SF DEL CROMOSOMA "X" LIGADO AL RETRASO MENTAL Y ASOCIADO A UNA PROBABLE CONTINUACIÓN SECUNDARIA DE LOS BRAZOS LARGOS, QUE APARECE EN ALGUNOS CASOS COMO UN ROZAMIENTO ISOCROMATÍDICO, PRODUCIENDO FRAGMENTOS ACÉNTRICOS EN POSICIONES VARIABLES EN RELACIÓN AL CROMOSOMA QUE DAN LA APARIENCIA DE SATÉLITES, PERO QUE NO TIENEN ASOCIACIÓN CON LOS SATÉLITES DE LOS ACROCÉNTRICOS, Y EN OTROS CASOS SE OBSERVA EN UNA FORMA QUE PARECE QUE EL CROMOSOMA ESTÁ CERRADO O UNIDO POR LAS DOS CROMÁTIDAS EN

DONDE SE PRODUCE EL ROMPIMIENTO (17,29,36,37,46).

POR TAL MOTIVO EN ESTE TRABAJO SE PRETENDE ESTABLECER UNA TÉCNICA PARA LA EXPRESIÓN DE SITIOS FRÁGILES EMPLEANDO METOTREXATE COMO COMPETIDOR DEL ÁCIDO FÓLICO EN CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS, CON EL OBJETO DE APLICARLA CLINICAMENTE PARA DETECCIÓN DE PORTADORES DE SF ASÍ COMO PARA PODER ESTABLECER UNA RELACIÓN ENTRE LA APARICIÓN DE ÉSTOS Y EL RETRASO MENTAL.

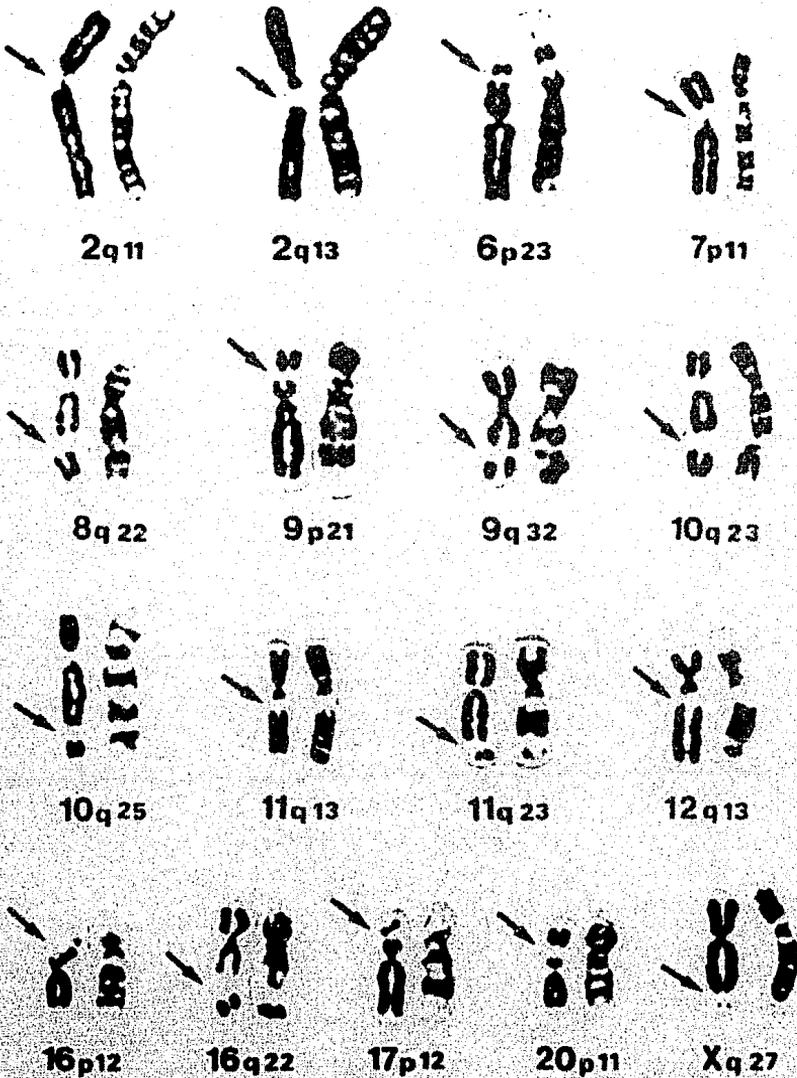


FIG. 5: LOCALIZACIÓN DE SITIOS FRÁGILES, REPORTADOS POR VARIOS AUTORES. A LA IZQUIERDA, CROMOSOMAS TENIDOS CON GIEMSA Y A LA DERECHA CON BANDAS G (26).

OBJETIVOS.

OBJETIVOS.

- ESTABLECER SI LA COMPETENCIA DEL METOTREXATE CON EL ÁCIDO FÓLICO INDUCE LA EXPRESIÓN DE SITIOS FRÁGILES.

- DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN MÁS ADECUADA DE METOTREXATE PARA LA EXPRESIÓN DE SITIOS FRÁGILES.

- ESTABLECER LA METODOLOGÍA QUE PERMITA LA EXPRESIÓN DE SITIOS FRÁGILES EN CROMOSOMAS HUMANOS Y SU APLICACIÓN POSTERIOR EN PADECIMIENTOS CARACTERIZADOS POR INESTABILIDAD CROMOSÓMICA DONDE LA FRECUENCIA DE SITIOS FRÁGILES ES MÁS EVIDENTE.

MATERIAL
Y
METODO

MATERIAL Y METODO.

SE TRABAJARON 32 MUESTRAS DE SANGRE DE PACIENTES QUE ACUDIERON AL LABORATORIO DE GENETICA DEL H.G.C.M. "LA RAZA", LOS CUALES FUERON AGRUPADOS DE LA SIGUIENTE MANERA: GRUPO I : 19 CON DIAGNOSTICO DE RETRASO MENTAL (RM). GRUPO II : 4 MADRES DE ALGUNOS DE ESTOS INDIVIDUOS CON RM. GRUPO III : 9 NORMALES (GRUPO CONTROL).

EL ANÁLISIS DE LOS CROMOSOMAS SE REALIZÓ EN CULTIVO DE LINFOCITOS DE MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA (5 ML) HEPARINIZADAS (0.1 ML DE SOL. 1000 U.), OBTENIDAS DEL PLIEGUE ANTICUBITAL.

EN UN MATRÁZ SE COLOCARON 4.5 ML DE MEDIO DE CULTIVO Y SE LES AGREGÓ 0.12 ML DE FITOHEMAGLUTININA (MICROLAB), 5 % DE SUERO FETAL DE TERNERA (MICROLAB) Y 1 ML DE SANGRE HEPARINIZADA. LOS CULTIVOS SE INCUBARON DURANTE 65 HORAS A UNA TEMPERATURA DE 37° C. SE SEMBRARON 5 CULTIVOS EN TOTAL POR CADA MUESTRA, CADA UNO TRABAJADO DE LA SIGUIENTE MANERA:

	MEDIO (GIBCO)	CONCENTRACION DE ACIDO FÓLICO (EN EL MEDIO)	METOTREXATE (10 ⁻⁴ MG/ML)
1)	M 199 4.5 ML	0.01 µG/ML	0
2)	RPMI 1640 4.5 ML	1.0 µG/ML	0
3)	RPMI 1640 4.5 ML	1.0 µG/ML	3.913
4)	RPMI 1640 4.5 ML	1.0 µG/ML	7.773
5)	RPMI 1640 4.5 ML	1.0 µG/ML	15.54

LAS CANTIDADES DE MTX (LADERLE 50 MG) DE UNA SOLUCIÓN PATRÓN DE 10^{-4} MG/ML, FUERON AGREGADAS 24 HORAS ANTES DE LA COSECHA (34).

UNA VEZ CONCLUIDO EL TIEMPO DE INCUBACIÓN SE LES AGREGÓ UNA SOLUCIÓN DE COLCHICINA (MICROLAB) A UNA CONCENTRACIÓN FINAL DE $0.017 \mu\text{G/ML}$ (0.1 ML DE UNA SOLUCIÓN PATRÓN DE $10 \mu\text{G/ML}$) INCUBANDOLOS NUEVAMENTE A 37° C DURANTE 25 MINUTOS.

PARA OBTENER LAS CÉLULAS DEL CULTIVO, LA SOLUCIÓN CELULAR FUE CENTRIFUGADA DURANTE 10 MINUTOS A 1700 RPM, SE ELIMINO EL SOBRENADANTE Y SE SOMETIÓ EL PAQUETE CELULAR A UN CHOQUE HIPOTÓNICO CON 10 ML DE UNA SOLUCIÓN DE CLORURO DE POTASIO 0.075 M DURANTE 30 MINUTOS A 37° C . AL TÉRMINO DE ESTE TIEMPO SE CENTRIFUGÓ DURANTE 10 MINUTOS A 1700 RPM Y SE ELIMINO EL SOBRENADANTE.

DESPUÉS DEL TRATAMIENTO ANTERIOR SE PROCEDIÓ A EFECTUAR LA FIJACIÓN DE LAS CÉLULAS CON UNA SOLUCIÓN DE CARNOY FRESCA Y FRIA, QUE ES UNA MEZCLA DE ÁCIDO ACÉTICO GLACIAL-ALCOHOL METILICO EN PROPORCIÓN 1:3. SE AGREGARON 10 ML DE FIJADOR AL PAQUETE CELULAR AGITANDO VIGOROSAMENTE Y SE CENTRIFUGÓ DURANTE 10 MINUTOS A 1700 RPM, ELIMINANDO EL SOBRENADANTE. ESTE TRATAMIENTO SE REPITIÓ 4 VECES MÁS PARA COMPLETAR UN TOTAL DE 5 LAVADOS Y QUEDAR COMPLETAMENTE LIMPIO EL PAQUETE CELULAR, QUE AL FINAL ES RESUSPENDIDO EN 1 ML DE FIJADOR (FIG. 6).

UNA VEZ FIJADAS LAS CÉLULAS EN METAFASE, SE PROCEDIÓ A PREPARAR LAS LAMINILLAS POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE GOTEO UTILIZANDO PORTAOBJETOS LIMPIOS, DESENGRASADOS EN ALCOHOL Y FRÍOS. CON UNA PIPETA PASTEUR SE DEJÓ CAER GOTA A GOTA LA SUSPENSIÓN CELULAR DISTRIBUIDA A LO LARGO DEL PORTAOBJETOS DESDE UNA ALTURA DE 50 CM O MÁS, Y SE DEJÓ SECAR AL AIRE.

LAS LAMINILLAS SE TIÑERON DURANTE 6 MINUTOS CON COLORANTE DE GIEMSA AL 6% EN UNA SOLUCIÓN DE BUFFER FOSFATOS CON PH 6.8, SE LAVARON CON AGUA DE LA LLAVE PARA ELIMINAR EL EXCESO DE COLORANTE DEJÁNDOSE SECAR AL AIRE.

SE OBSERVARON LAS LAMINILLAS AL MICROSCOPIO ÓPTICO ANALIZANDO UN PROMEDIO DE 250 CÉLULAS AL AZAR POR NUESTRA EN BUSCA DE LA PRESENCIA DE SITIOS FRÁGILES.

TÉCNICA DE BANDEO (BANDAS G).

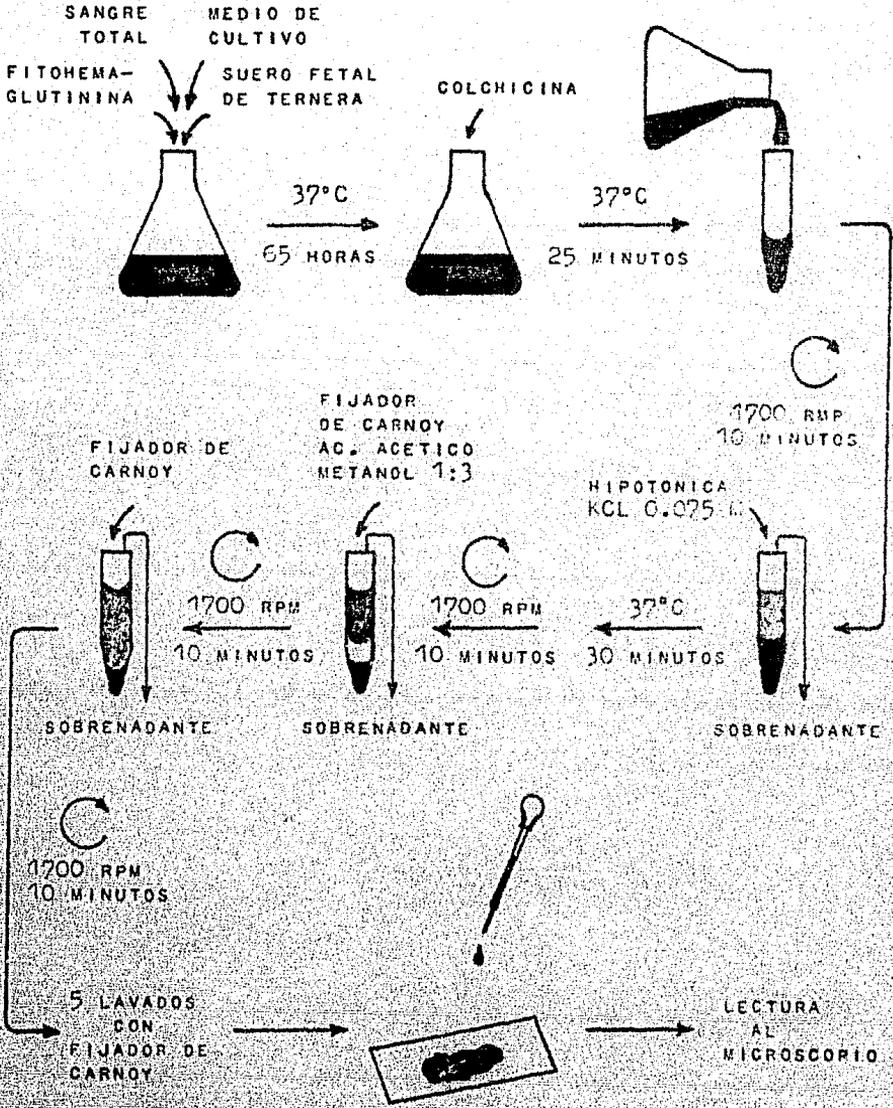
LAS LAMINILLAS SE METIERON DURANTE 12 SEGUNDOS EN UNA SOLUCIÓN DE BUFFER DE FOSFATOS CON PH 6.8 SUPLEMENTADA CON 0.5 MG/ML DE TRIPSINA.

AL TÉRMINO DE ESTE TIEMPO SE PASARON A UNA SOLUCIÓN SOBRESATURADA DE EDTA EN AGUA DESTILADA, PARA DESPUÉS SER COLOCADAS EN OTRA SOLUCIÓN DE BUFFER DE FOSFATOS SIN TRIPSINA.

FINALMENTE LAS LAMINILLAS SE TIÑERON DURANTE 4 MINUTOS CON COLORANTE DE GIEMSA AL 6 % EN UNA SOLUCION DE BUFFER DE FOSFATOS, SE LAVARON CON AGUA DESTILADA PARA ELIMINAR EL EXCESO DE COLORANTE, DEJANDOSE SECAR AL AIRE.

METODO

FIGURA 6



R E S U L T A D O S .

R E S U L T A D O S .

RESULTADOS.

EN LA TABLA 1 SE MUESTRAN LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN ESTE TRABAJO, OBSERVÁNDOSE QUE EN EL MEDIO RPMI 1640 SIN MTX NO HUBO EXPRESIÓN DE SF MIENTRAS QUE EN EL MEDIO RPMI CON MTX HUBO UN MAYOR NÚMERO DE MUESTRAS CON EXPRESIÓN DE SF (9 MUESTRAS), Y EN EL MEDIO 199 (DEFICIENTE DE ÁCIDO FÓLICO) HUBO EXPRESIÓN DE SF SOLO EN 2 MUESTRAS.

LAS 2 MUESTRAS CON EXPRESIÓN DE SF EN EL MEDIO 199 PERTENECEN, UNA AL GRUPO I (5.26 %) Y LA OTRA AL GRUPO II (25 %). LA RESPUESTA DE LAS 9 MUESTRAS A LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MTX FUE DIFERENTE, TENIÉNDOSE QUE; LAS 9 PRESENTARON EXPRESIÓN DE SF CON UNA CONCENTRACIÓN DE 3.913×10^{-4} MG/ML, DE LAS CUALES 7 PERTENECEN AL GRUPO I (36.84 %) Y 2 AL GRUPO II (50 %); EN LA CONCENTRACIÓN DE 7.773×10^{-4} MG/ML 3 MUESTRAS MANIFESTARON EXPRESIÓN DE SF, 2 PERTENECIENTES AL GRUPO I (10.52 %) Y UNA AL GRUPO II (25 %); Y NINGUNA TUVO EXPRESIÓN DE SF CON LA CONCENTRACIÓN DE 15.54×10^{-4} MG/ML (TABLA 1).

EN LA TABLA 2 SE PUEDE OBSERVAR LA VARIACIÓN DE LA FRECUENCIA (%) DE EXPRESIÓN DE SF EN CADA UNO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS. EN EL MEDIO RPMI 1640 CON MTX LA FRECUENCIA DE EXPRESIÓN DE SF PARA LAS MUESTRAS DEL

GRUPO I ES MAYOR CON UNA CONCENTRACIÓN DE 3.913 QUE CON LA ADICIÓN DE 7.773×10^{-4} MG/ML Y TAMBIEN ES MAYOR QUE LA FRECUENCIA EXPRESADA EN EL MEDIO 199; PARA LAS MUESTRAS DEL GRUPO II, LA FRECUENCIA DE EXPRESIÓN DE SF PARA UNA DE LAS MUESTRAS (MUESTRA 8) RESULTO SER IGUAL, TANTO EN EL MEDIO RPMI 1640 CON MTX A UNA CONCENTRACIÓN DE 3.913×10^{-4} MG/ML COMO EN EL MEDIO 199, Y PARA LA OTRA (MUESTRA 9) LA FRECUENCIA DE EXPRESIÓN EN EL MEDIO RPMI CON MTX FUE MENOR EN LA CONCENTRACIÓN DE 3.913 QUE EN LA DE 7.773×10^{-4} MG/ML.

LOS SF QUE SE IDENTIFICARON CON ESTA METODOLOGIA EN EL MEDIO RPMI 1640 CON MTX (3.913×10^{-4} MG/ML) SON LOS SIGUIENTES: 3p14, 10q25, 11q13, 16q22 y Xq27 ó 28. (FIGS. 7,8,9,10,11 Y 12), CUYAS FRECUENCIAS PROMEDIO POR INDIVIDUO ASÍ COMO LA FRECUENCIA DE EXPRESIÓN POR POBLACIÓN (9 INDIVIDUOS) SE MUESTRAN EN LA TABLA 3, DONDE SE PUEDE OBSERVAR QUE EL SF EN LOS CROMOSOMAS 10q25 Y Xq27 ó 28 PRESENTARON UNA MAYOR FRECUENCIA DE EXPRESIÓN POR INDIVIDUO COMPARADA CON LA DE LOS OTROS TRES CROMOSOMAS; Y LA MAYOR FRECUENCIA DE EXPRESIÓN POR POBLACIÓN LA PRESENTO EL SF EN EL CROMOSOMA 16q22.

TABLA 1

EXPRESION DE SF EN CADA UNO DE LOS MEDIOS DE
CULTIVO UTILIZADOS.

GRUPO	INDIVIDUOS	RPMI	RPMI CON MTX (10^{-4} MG/ML)			M 199
			3.913	7.773	15.54	
I	19	0	7	2	0	1
II	4	0	2	1	0	1
III	9	0	0	0	0	0

TABLA 2

FRECUENCIA DE EXPRESION DE SF EN LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS, Y EFECTO DE LA ADICION DE METOTREXATE EN LA EXPRESION DE SF (10^{-4} MG/ML).

MUESTRA	GRUPO	DIAGNOSTICO CLINICO	FRECUENCIA (%)				SITIO FRAGIL	
			RPMI	RPMI con MTX (10^{-4} MG/ML)				M 199
				3.913	7.773	15.54		
1	I	RM	0	18.0	14.0	0	0	Xq27 6 28
2	I	RM	0	8.0	0	0	0	16q22 , 11q13
3	I	RM	0	8.0	0	0	0	16q22 , 3p14
4	I	RM	0	26.0	20.0	0	0	16q22 , 10q25
5	I	RM	0	12.0	0	0	8.0	16q22
6	I	RM	0	4.0	0	0	0	Xq27 6 28
7	I	RM	0	4.0	0	0	0	16q22
8	II	M RM	0	4.0	0	0	4.0	16q22
9	II	M RM	0	22.0	34.0	0	0	16q22 , 10q25
10	III	CONTROL	0	0	0	0	0	_____

TABLA 3

SITIOS FRAGILES IDENTIFICADOS, Y SU FRECUENCIA DE EXPRESION (%) POR INDIVIDUO Y POR POBLACION (9 INDIVIDUOS) EN EL MEDIO RPMI 1640 con MTx (3.913×10^{-4} MG/ML)

SITIO FRAGIL	No. CASOS	FRECUENCIA (%) POR INDIVIDUO (50 METAFASES)	FRECUENCIA (%) POR POBLACION (450 METAFASES)
3p14	1	6.0	0.66
10q25	2	15.0	3.33
11q13	1	2.0	0.22
16q22	7	6.57	5.10
Xq27 ó 28	2	11.0	2.44

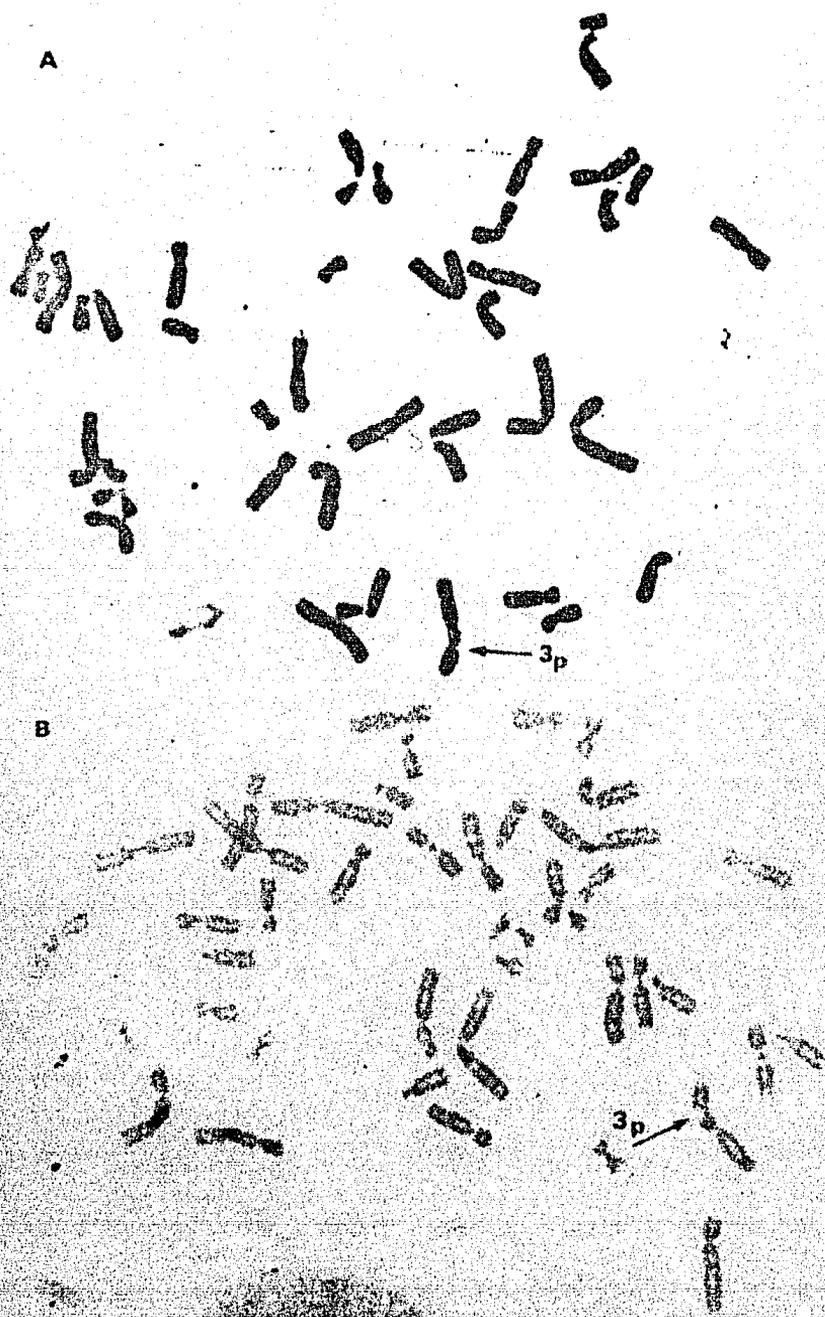


FIG. 7: EXPRESIÓN DE SITIO FRÁGIL EN EL CROMOSOMA 3P14.
A) CROMOSOMAS TENIDOS CON GIEMSA Y B) CON BANDAS G.

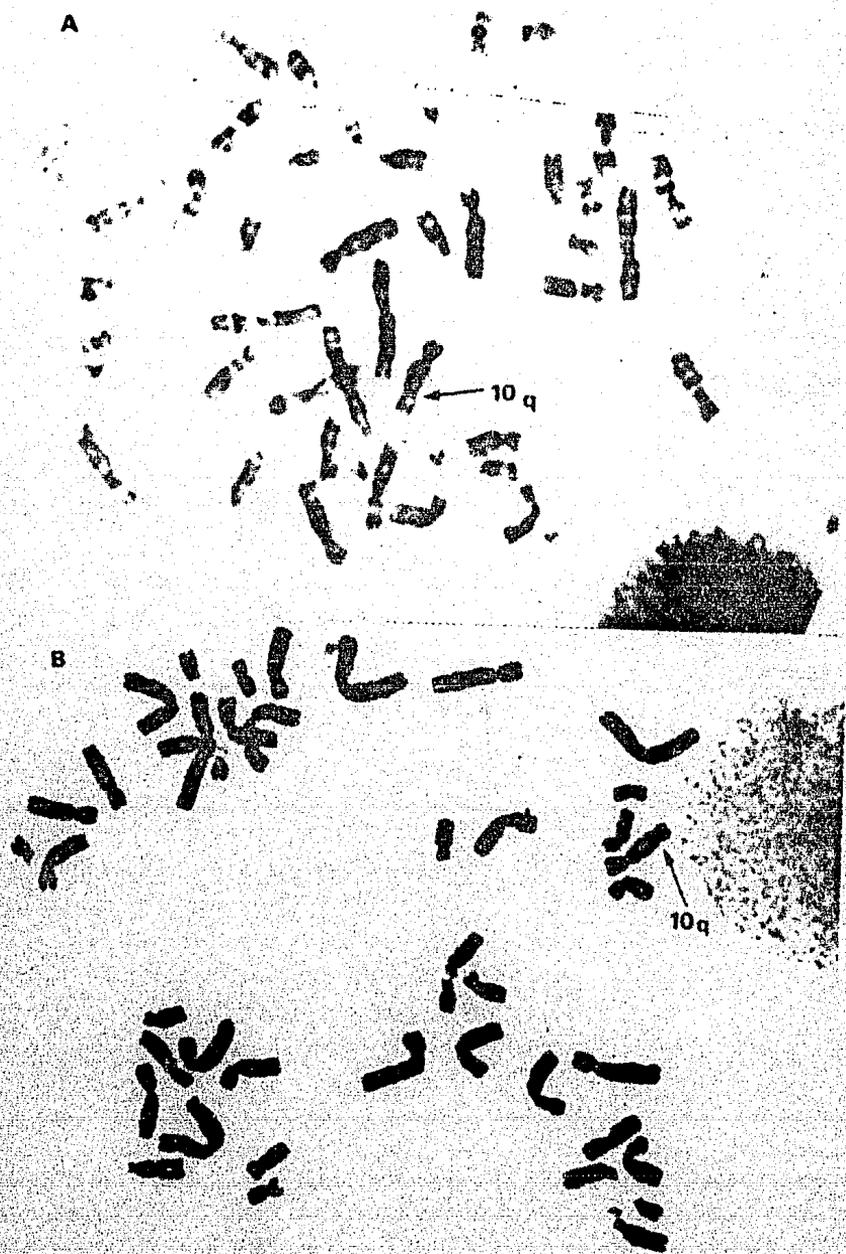


FIG. 8: EXPRESIÓN DE SITIO FRÁGIL EN EL CROMOSOMA 10q25.
A) CROMOSOMAS TENIDOS CON BANDAS G Y B) CON GIEMSA.

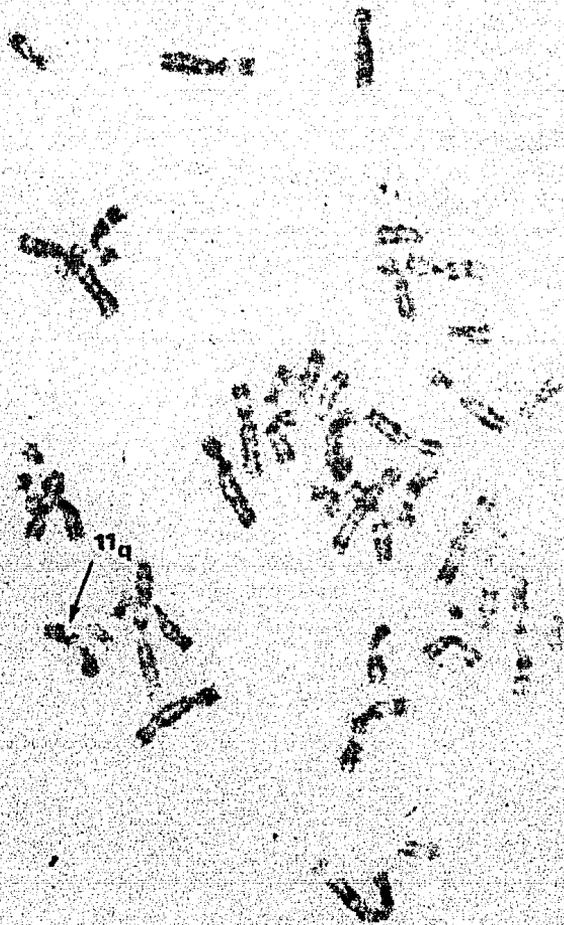


FIG. 9: EXPRESIÓN DE SITIO FRÁGIL EN EL CROMOSOMA 11q13.
CROMOSOMAS TEÑIDOS CON BANDAS G.

A



B

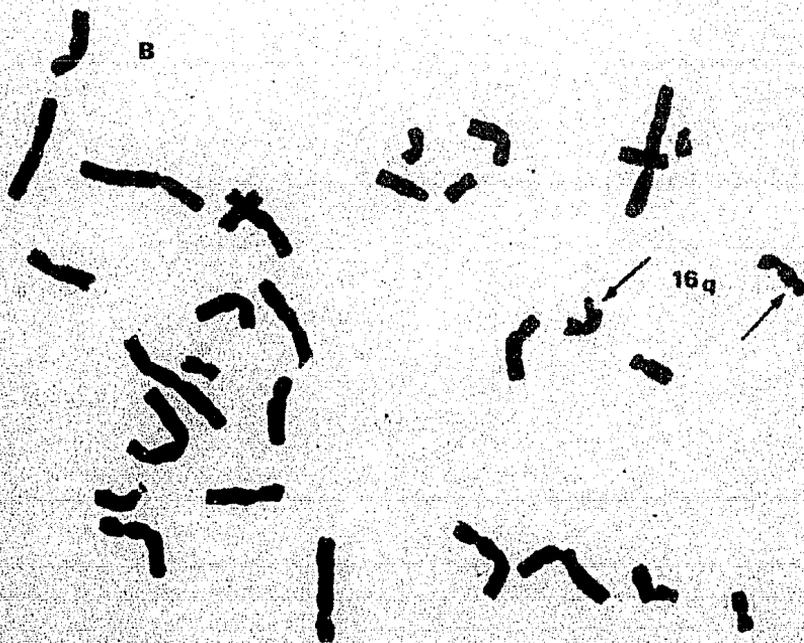


FIG. 10: EXPRESIÓN DE SITIO FRÁGIL EN EL CROMOSOMA 16q22.
A) CROMOSOMAS TEÑIDOS CON BANDAS G Y B) CON GIEMSA,
OBSERVÁNDOSE EN LOS DOS HOMÓLOGOS.

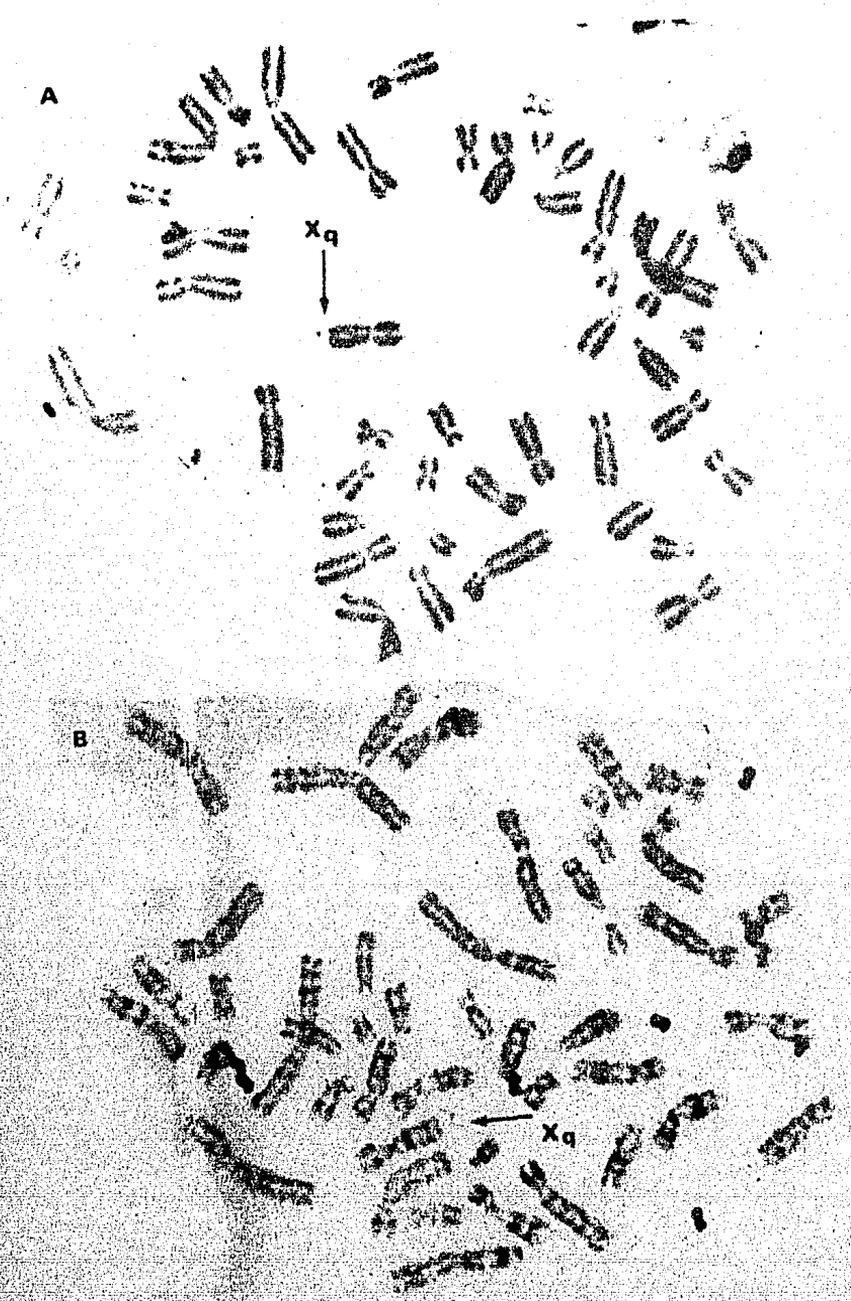


FIG. 11: EXPRESIÓN DE SITIO FRÁGIL EN EL CROMOSOMA Xq27 ó 28.
A) CROMOSOMAS TEÑIDOS CON GIEMSA Y B) CON BANDAS G.

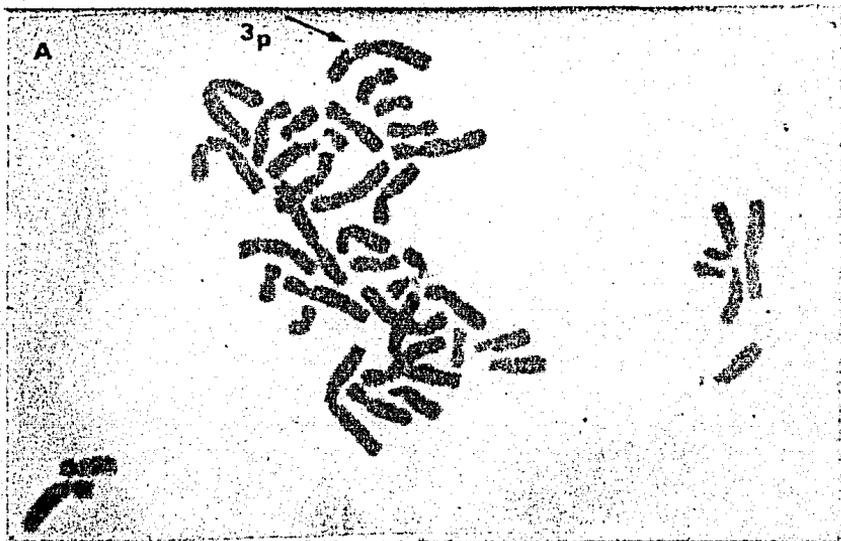


FIG. 12: A) EXPRESIÓN DE SITIO FRÁGIL EN EL CROMOSOMA 3p14, Y EN B) EN EL CROMOSOMA 16q22. EN AMBOS CASOS ESTAN TENIDOS CON GIEMSA.

D I S C U S I O N
Y
C O N C L U S I O N E S .

DISCUSION Y CONCLUSIONES.

LA EXPRESIÓN DE LOS SF EN CULTIVO DE LINFOCITOS ES DEPENDIENTE DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO UTILIZADO, SIENDO LA DEFICIENCIA DE ÁCIDO FÓLICO Y TIMIDINA UN FACTOR NECESARIO PARA SU EXPRESIÓN, YA QUE ESTOS COMPUESTOS LA INHIBEN, POR LO QUE CON EL MEDIO 199, AL ESTAR DEFICIENTE EN ÁCIDO FÓLICO ($0.01 \mu\text{G}/\text{ML}$), SE OBTIENE UNA ELEVADA EXPRESIÓN DE SF (32,34).

POR ESTA RAZON SE UTILIZÓ ÉSTE MEDIO COMO UN CONTROL (POSITIVO) PARA LA EXPRESIÓN DE SF. EL MEDIO RPMI 1640 SE EMPLEÓ COMO MEDIO DE CONTROL (NEGATIVO) CON PRESENCIA DE ÁCIDO FÓLICO ($1.0 \mu\text{G}/\text{ML}$) YA QUE A ESTA CONCENTRACIÓN SE OBTIENE UNA MÍNIMA EXPRESIÓN DE SF (32). AL MISMO TIEMPO SE TRABAJÓ CON EL MEDIO RPMI 1640 ADICIONÁNDOLE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE MTX (10^{-4} MG/ML), OBSERVANDO LA COMPETENCIA CON EL ÁCIDO FÓLICO QUE ESTA PRESENTE EN EL MEDIO, PARA DAR UNA MAYOR EXPRESIÓN DE SF POR INHIBICIÓN DEL SISTEMA ENZIMÁTICO REDUCTASA DE DIHIDROFOLATO, DEPENDIENTE DE NADPH, QUE REDUCE EL FOLATO Y EL DIHIDROFOLATO EN TETRAHIDROFOLATO, FORMA QUE TRANSFIERE LOS FRAGMENTOS DE UN CARBONO AL ANILO PÚRICO Y AL PIRIMIDÍNICO, ORIGINÁNDOSE DE ESTA MANERA LA FORMACIÓN DE SF, PUESTO QUE EL MTX TIENE HASTA 10 000 VECES MAYOR AFINIDAD POR LA REDUCTASA DE DIHIDROFOLATO QUE EL PROPIO ÁCIDO FÓLICO (16,23,47).

EN ESTE TRABAJO SE EMPLEO LA TÉCNICA DE SUTHERLAND (32) PARA EL CULTIVO DE LINFOCITOS, MODIFICADA PARA LA EXPRESIÓN DE SF EN CROMOSOMAS HUMANOS (IN VITRO). SE OBSERVÓ EN ESTE ESTUDIO QUE EN EL MEDIO RPMI 1640 SIN MTX (TABLA 1 Y 2) NO HUBO RESPUESTA PARA LA EXPRESIÓN DE SF EN NINGUNO DE LOS INDIVIDUOS DE LOS TRES GRUPOS, ESTO PUDO SER DEBIDO A QUE EL ÁCIDO FÓLICO QUE CONTIENE EL MEDIO EVITÓ LA FORMACIÓN DE ÉSTOS, LO CUAL ES APOYADO POR LA DEFICIENCIA DE ÁCIDO FÓLICO QUE TIENE EL MEDIO 199 EN DONDE SI HUBO EXPRESIÓN DE SF POR PARTE DE DOS INDIVIDUOS, AUNQUE ESTOS RESULTADOS NO COINCIDEN EN FRECUENCIA CON LO REPORTADO POR SUTHERLAND (32,34). SIN EMBARGO, EN EL MEDIO RPMI 1640 CON MTX, HUBO UNA MEJOR RESPUESTA PARA LA EXPRESIÓN DE SF (EN COMPARACIÓN CON EL MEDIO 199) EN DOS DE LAS TRES CONCENTRACIONES DE MTX EMPLEADAS, PERO LA RESPUESTA FUE INVERSAMENTE PROPORCIONAL EN CADA UNA DE ELLAS.

SE HA PODIDO ESTABLECER QUE EL MTX BLOQUEA LA SÍNTESIS DE LAS NUEVAS CADENAS DE NUCLEOTIDOS COMPUESTOS POR PURINAS Y PIRIMIDINAS, YA QUE LIMITA SU PRODUCCIÓN, IMPIDIENDO ASÍ LA FORMACIÓN DE UNA NUEVA CADENA DE ADN, DE ESTA MANERA LAS CELULAS NO SE DIVIDEN Y FINALMENTE MUEPEN. EL MTX DETIENE LA DIVISIÓN CELULAR EN UN ESTADO GENERATIVO DEL CICLO CELULAR; SOLO CUANDO ESTA SINTETIZANDO ADN (47). EN EL CULTIVO PROBABLEMENTE LAS CONCENTRACIONES DE 7.773 Y 15.54×10^{-4} MG/ML DE MTX FUERON ALTAMENTE TÓXICAS IMPIDIENDO UN BUEN DESARROLLO CELULAR, CON LO CUAL NO HUBO UNA DE-

TERMINACIÓN REAL DE LA PRESENCIA DE SF.

DE ESTA MANERA SE OBSERVÓ EN ESTE ESTUDIO QUE EL MEDIO RPM1 1640 CON MTX A UNA CONCENTRACIÓN DE 3.913×10^{-4} MG/ML FUE EL MÁS APROPIADO PARA LA EXPRESIÓN DE SF DE TODOS LOS EXPUESTOS O CONCENTRACIONES PRBADAS, INCLUYENDO AL MEDIO 199.

UNA VARIEDAD DE ANORMALIDADES FENOTÍPICAS, ADE MÁS DE MACRO-ORQUIDIA Y OTRAS ALTERACIONES GENITALES QUE SON TECTADAS DESPUÉS DE LA PUBERTAD ESTAN ASOCIADAS CON LOS SF Y SUGIEREN QUE ANALOGAMENTE VAN ACOMPAÑADAS DE MUTACIONES O TRANSLOCACIONES RECÍPROCAS Y LAS CUALES PUEDEN ESTAR RELACIONADAS CON ALGUNAS FORMAS DE RETRASO MENTAL (21, 26,46).

LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL MEDIO RPM1 1640 CON MTX (3.913×10^{-4} MG/ML) NOS DAN UN APOYO PARA ESTA TEORÍA, YA QUE EL MAYOR NÚMERO DE MUESTRAS QUE MANIFESTARÓN EXPRESIÓN DE SF PERTENECEN AL GRUPO DE INDIVIDUOS QUE PRESENTAN RETRASO MENTAL (RM), MOSTRANDO QUE POSIBLEMENTE SI HAY UNA ASOCIACIÓN ENTRE SF Y RM, SIN QUE SE ANALIZARA SI LA PRESENCIA DE SF TIENE UNA FRECUENCIA PROPORCIONAL AL GRADO DE RM. ADEMÁS, TAMBIEN SE PUEDE APOYAR ÉSTA TEORÍA CON LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS INDIVIDUOS NORMALES (GRUPO III) EN DONDE SE OBSERVÓ QUE NO HUBO EXPRESIÓN DE SF EN LOS MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS (TABLA 2).

EN ALGUNOS ESTUDIOS REALIZADOS DURANTE VARIAS GENERACIONES, SE HA OBSERVADO QUE EXISTEN INDIVIDUOS CON INTELIGENCIA Y FENOTIPO NORMAL QUE PRESENTAN EL SF Y ACTÚAN COMO PORTADORES DE ÉSTOS, HEREDANDOLOS A SUS HIJOS CON UN RIESGO DEL 20 AL 30 % DANDO ORIGEN A INDIVIDUOS CON RETRASO MENTAL, MOSTRANDOSE EL MISMO PATRON DEL SITIO FRÁGIL HEREDADO (14,28,31,36,44,46).

EN BASE A LO ANTERIORMENTE ESCRITO PODEMOS DECIR, QUE LAS MADRES DE INDIVIDUOS CON RM (GRUPO II) QUE MOSTRARÓN EXPRESIÓN DE SF ACTUAN COMO PORTADORAS DE ÉSTOS, LO CUAL SE COMPROBÓ EN ESTE TRABAJO YA QUE UNA DE ELLAS (MUESTRA 8) Y DOS DE SUS HIJOS CON RM, UN VARÓN (MUESTRA 3) Y UNA MUJER (MUESTRA 5) PRESENTARÓN EL MISMO SITIO FRÁGIL EN EL CROMOSOMA 16q22; OTRA DE LAS MADRES (MUESTRA 9) Y UN HIJO VARÓN CON RM (MUESTRA 4) MOSTRARÓN EL SF EN LOS CROMOSOMAS 16q22 Y 10q25. EN AMBOS CASOS SE OBSERVÓ QUE LA FRECUENCIA DE EXPRESIÓN DE SF ES MAYOR EN LOS HIJOS QUE EN LAS MADRES (TABLA 2), AL IGUAL QUE LOS RESULTADOS REPORTADOS POR TAYLOR Y BUNDEY (44).

LA MAYOR FRECUENCIA DE EXPRESIÓN POR INDIVIDUO LA PRESENTARÓN LOS SF EN LOS CROMOSOMAS 10q25 Y Xq27 (TABLA 3) A DIFERENCIA DE LOS OTROS TRES SF, LO QUE NOS PUEDE INDICAR QUE CUANDO SE MANIFIESTA UN SF EN ÉSTOS CROMOSOMAS, SE PRESENTA EN UN MAYOR NÚMERO DE CÉLULAS ANALIZADAS; PERO DEN

TRO DE UNA POBLACIÓN (9 INDIVIDUOS), LA FRECUENCIA DE ESTOS SF FUERÓN MÁS BAJAS COMPARANDOLAS CON LA FRECUENCIA DEL SF EN EL CROMOSOMA 16q22, LO QUE NOS PUEDE INDICAR QUE ÉSTE VA A APARECER EN UN MAYOR NÚMERO DE INDIVIDUOS DENTRO DE ESA POBLACIÓN.

ALGUNOS SF COMO EL DEL CROMOSOMA 16 EN LOS BRAZOS q REQUIEREN ALTAS CONCENTRACIONES DE ÁCIDO FÓLICO PARA INHIBIR SU EXPRESIÓN, SIENDO SENSIBLE HASTA 80 MG/L, A DIFERENCIA DE OTROS QUE SON COMPLETAMENTE INHIBIDOS CON CONCENTRACIONES DE 0.2 A 1.0 MG/L (34). POR ESTA RAZON SE CREE QUE EL SF EN 16q22 APARECIO EN UN MAYOR NÚMERO DE INDIVIDUOS DENTRO DE LOS 9 QUE MANIFESTARÓN LA EXPRESIÓN DE SF EN ESTE ESTUDIO.

SE HA REPORTADO QUE LA INDUCCIÓN DE SF DEPENDE DEL COMPUESTO QUE SE ADICIONA, COMO EN EL CASO DEL SF 10q25 QUE SOLO SE MANIFIESTA AL EXPONER LAS CÉLULAS DEL CULTIVO A BROU, LA NECESIDAD DE ESTE COMPUESTO EN EL SF 10q25 HA SIDO ESTUDIADA POR SUTHERLAND (38,39), MOSTRANDO QUE SU EXPRESIÓN NO ES INFLUENCIADA POR LA PRESENCIA O AUSENCIA DE ÁCIDO FÓLICO.

SIN EMBARGO, TAYLOR Y BUNDEY (45), REPORTAN LA EXPRESIÓN ESPONTÁNEA DEL SF EN EL CROMOSOMA 10q25 EN UNA JOVEN DE 16 AÑOS DE EDAD CON PROGRESIVA ATAXIA CEREBRAL, ENCONTRÁNDOLO TAMBIEN EN SU HERMANO Y EN SU PADRE QUE SON FE-

NOTIPICAMENTE NORMALES, LA EXPRESIÓN DE ESTE SF FUE MANIFESTADA EN EL MEDIO 199, OBSERVANDOSE QUE LA JOVEN PRESENTÓ UNA FRECUENCIA MAYOR DE CÉLULAS CON LA OCURRENCIA ESPONTÁNEA DEL FRA(10)(q25) EN COMPARACIÓN CON SU HERMANO Y SU PADRE. UN SEGUNDO CULTIVO (DEL PADRE Y DE LOS DOS HIJOS) EN EL MEDIO HAMS F10 SUPLEMENTADO CON 20 μ G/ML DE BRDU MOSTRÓ UN INCREMENTO EN LA FRECUENCIA DE EXPRESIÓN DE ESTE SF, A DIFERENCIA DE LA OBSERVADA EN EL MEDIO 199. LA MANIFESTACIÓN ESPONTÁNEA DEL SF EN 10q25 INDICA QUE SU EXPRESIÓN NO ES DEPENDIENTE DE LA BRDU, PERO SI SU FRECUENCIA.

TAMBIEN PETIT Y FRYNS (28), AL REALIZAR UN ESTUDIO PARA UN ANÁLISIS CROMOSÓMICO EN UNA PAREJA EN DONDE LA MUJER TUVO ABORTO EN EL PRIMER TRIMESTRE DE EMBARAZO, ENCONTRARON LA EXPRESIÓN ESPONTÁNEA DEL SF EN 10q25 EN EL MEDIO HAMS F10, LA MUJER PRESENTÓ CARIOTIPO NORMAL, MIENTRAS QUE EL VARÓN TENIA EL SF EN EL CROMOSOMA 10q25 EN UN 15 % DE METAFASES ANALIZADAS CON BANDAS G, ENCONTRANDOSE ADemás EN UN SEGUNDO CULTIVO CON ADICIÓN DE 10 MG/L DE BRDU UN LIGERO AUMENTO DE ESTA FRECUENCIA.

EN LOS RESULTADOS QUE SE OBTUVIERÓN EN ESTE TRABAJO EL SF EN 10q25 NO SE MANIFESTÓ ESPONTANEAMENTE, PERO SI SE INDUJO CON LA ADICIÓN DE MTX A UNA CONCENTRACIÓN DE 3.913×10^{-4} MG/ML EN EL CULTIVO, LO CUAL INDICA QUE ÉSTE SF TAMBIEN ES SUSCEPTIBLE AL MTX Y NO SOLAMENTE A LA BRDU COMO LO REPORTA SUTHERLAND (38,39).

LOS DATOS OBTENIDOS EN ESTE TRABAJO MOSTRARON QUE SI HAY UNA COMPETENCIA ENTRE EL MTX Y EL ÁCIDO FÓLICO QUE CONTIENE EL MEDIO DE CULTIVO, INDUCIENDO DE ESTA MANERA LA EXPRESIÓN DE LOS SF EN LOS CROMOSOMAS HUMANOS COMO RESULTADO PROBABLE DEL BLOQUEO DE LA SÍNTESIS DE ÁCIDO TIMIDÍLICO.

POR OTRO LADO SE ENCONTRÓ QUE EL MEDIO RPMI 1640 SUPLEMENTADO CON 3.913×10^{-4} MG/ML DE MTX FUE LA CONCENTRACIÓN MAS APROPIADA PARA LA EXPRESIÓN DE LOS SITIOS FRÁGILES.

SIN EMBARGO LAS CLASES DE SF INDUCIDOS CON ESTA TÉCNICA FUERON POCAS, QUIZAS DEBIDO A QUE LA MUESTRA UTILIZADA EN ESTE TRABAJO FUE MUY PEQUEÑA, POR LO QUE SE RECOMIENDA REALIZAR UN MUESTREO MAS GRANDE PARA PODER OBSERVAR SI EXISTE LA MANIFESTACIÓN DE OTROS TIPOS DE SF.

LA TÉCNICA AQUÍ DESARROLLADA ES MUY REPRODUCIBLE, CONTANDO ADEHÁS CON QUE LOS REACTIVOS EMPLEADOS SON FÁCILES DE CONSEGUIR Y DE BAJO COSTO, A DIFERENCIA DE OTROS REACTIVOS EMPLEADOS EN LAS TÉCNICAS REPORTADAS EN LA LITERATURA. POR TAL MOTIVO SE PUEDE DECIR QUE ESTA METODOLOGIA PUEDE SER UTILIZADA PARA ESTUDIOS A NIVEL CLINICO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE SITIOS FRÁGILES.

REFERENCIAS.

REFERENCIAS.

- 1.- BARTALOS, M. Y BARAMKI, T.A. (1967). MEDICAL CYTOGENETICS. WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE.
- 2.- BROGGER, A. (1968). VIRUS SON ARSAK TIL KROMOSOMABERRASJONER HOS MENNESKE. TIDSSKR NOR LARGEJOREN. 88, 1741-1747. TOMADO DE: (35).
- 3.- BRONDUM, N.K., NIELS, T., FRIIS, B., HJELT, K., Y HIPPE, C. (1983). FOLIC ACID METABOLISM IN A PATIENT WITH FRAGILE X. CLIN. GENET. 24, 153-155.
- 4.- BROWN, W.T., JENKINS, E.C., FRIEDMAN, E., BROOKS, J., COHEN, I.L., WISNIEWSKI, K., Y FRENCH, J.H. (1984). FOLIC ACID THERAPY IN THE FRAGILE SYNDROME. AM. J. MED. GENET. 17, 289-297.
- 5.- CERVANTES, P.A.B. (1983). ESTRUCTURA MOLECULAR DE LOS CROMOSOMAS HUMANOS; SU CORRELACIÓN CON LAS TÉCNICAS DE BANDEO Y SU APLICACIÓN A LA CLÍNICA. TESIS, FQ. UNAM. MÉX.
- 6.- CHAUDHURI, J.P. (1972). ON THE ORIGIN AND NATURE OF ACHROMATIC LESIONS. CHROMOSOMES TODAY. 3, 147-151. TOMADO DE: (34).
- 7.- CONEN, P.E. Y ERKMAN, B. (1966). COMBINED MONGOLISM AND LEUKAEMIA. AM. J. DIS. CHILD. 112, 429-443. TOMADO DE: (35).
- 8.- DANIEL, A., EKBLUM, L. Y PHILLIPS, S. (1984). FRAGILE X EXPRESSION IN EITHER FUDR OR METHOTREXATE TREATED F1 BROEAST BY PRETREATMENT WITH 5-AZACYTIDINE. AM. J. MED. GENET. 17, 255-257.
- 9.- DANIEL, A., EKBLUM, L. Y PHILLIPS, S. (1984). CONSTITUTIVE FRAGILE SITES 1p31, 3p14, 6q26 AND 16q23, AND THEIR USE AS CONTROLS FOR FALSE NEGATIVE RESULTS WITH THE FRAGILE (X). AM. J. MED. GENET. 18, 483-491.

- 10.- DEKABAN, A. (1965). PERSISTING CLONE OF CELLS WITH AN ABNORMAL CHROMOSOME IN A PREVIOUSLY IRRADIATED. J. NUCL. MED. 6, 740-746. TOMADO DE: (19).
- 11.- FERGUSON-SMITH, M.A. (1973). INHERITED CONSTRICTION FRAGILITY OF CHROMOSOME 2. ANN. GENET. 16, 29-34.
- 12.- FORD, C.E. Y HAMERTON, J.L. (1956). A COLCHICINE, HIPOTONIC CITRATE SQUASH SEQUENCE FOR MAMMALIAN CHROMOSOMES. STAIN. TECH. 131, 247.
- 13.- FORD, E.H.R. (1973). HUMAN CHROMOSOMES. ACADEMIC PRESS. NEW YORK.
- 14.- GARDNER, R.J.M. (1984). FRAGILE X MALES WITH NORMAL INTELLIGENCE? AND IF SO, WHY?. AM. J. MED. GENET. 17, 853-855.
- 15.- GIRAUD, F., AYMES, S., MATTEI, J.F. Y MATTEI, M.G. (1976). CONSTITUTIONAL CHROMOSOMAL BREAKAGE. HUM. GENET. 34, 125-136. TOMADO DE: (35).
- 16.- HARPER, H.A. (1971). MANUAL DE QUÍMICA FISIOLÓGICA. ED., EL MANUAL MODERNO. MÉXICO, PP. 621.
- 17.- HARVEY, J., JUDGE, C. Y WIENER, S. (1977). FAMILIAL X-LINKED MENTAL RETARDATION WITH AN X CHROMOSOME ABNORMALITY. J. MED. GENET. 14, 46-50.
- 18.- HECHT, F., MAGENIS, R.E., LOVRIEN, E.W. (1970). HERITABLE FRAGILE SITE ON CHROMOSOME 16: PROBABLE LOCALIZATION OF HAPTOGLOBIN LOCUS IN MAN. SCIENCE, 170, 85-87. TOMADO DE: (19).
- 19.- HECHT, F. Y KAISER-MCCAW, B. (1979). THE IMPORTANCE OF BEING A FRAGILE SITE (LETTER TO THE EDITOR). AM. J. HUM. GENET. 31, 223-225.

- 20.- HECHT, F. Y HECHT, B. (1984). FRAGILE SITES AND CHROMOSOME BREAKPOINTS IN CONSTITUTIONAL REARRANGEMENTS II. SPONTANEOUS ABORTIONS, ATILLBIRTHS AND NEWBORNS. CLIN. GENET. 26, 174-177.
- 21.- HERBST, D.S. (1980). NONSPECIFIC X-LINKED MENTAL RETARDATION I. A REVIEW WITH INFORMATION FROM 24 NEW FAMILIES. AM. J. MED. GENET. 7, 443-460.
- 22.- LEJEUNE, J., DUTILLAUX, B., LAFOURCADE, J., BERGER, R., ABONYI, D. Y RETHORÉ, M.O. (1968). ENDOREDUPPLICATION SELECTIVE DU BRAS LONG DU CHROMOSOME 2 CHEZ UNE FEMME ET SA FILLE. CR. ANID SCI. (PARIS), 266, 24-26. TOMADO DE: (35).
- 23.- LEHNINGER, A.L. (1981). BIOQUÍMICA. Ed., OMEGA. BARCELONA, PP. 1117.
- 24.- LEVINE, H. (1971). CLINICAL CYTOGENETICS. LITTLE BROWN AND CO. BOSTON.
- 25.- LUBS, H.A. (1969). A MARKER X CHROMOSOME. AM. J. HUM. GENET. 21, 231-244. TOMADO DE: (35).
- 26.- OPITZ, J.M. Y SUTHERLAND, G.R. (1984). CONFERENCE REPORT: INTERNATIONAL WORKSHOP ON THE FRAGILE X AND X-LINKED MENTAL RETARDATION. AM. J. MED. GENET. 17, 5-94.
- 27.- PASSARGE, E. (1974). THE HUMAN KARYOTYPE. ANALYSIS OF CHROMOSOME IN HUMAN CYTOGENETICS. SCHWARZACHER H.G., WOLF, V., SPRINGER VERLAG. 135-205.
- 28.- PETIT, P., FRYNS, J.P. (1973). EXPRESION OF FRAGILE SITE AT 10q²⁵ IN NORMAL CULTURE CONDITIONS (LETTER TO THE EDITOR). AM. J. HUM. GENET. 35, 126-127.
- 29.- PHILIP, L., TOWNES, M.D., PHD. (1982). FRAGIL-X SYNDROME. AM. J. DIS. CHIL. 136, 389-391.

- 30.- RICHARD, W., ERBE, Y M.D. (1984). FOLIC ACID THERAPY IN THE FRAGILE X SYNDROME. *Am. J. Med. Genet.* 12, 299-301.
- 31.- ROMAIN, D.R., FRAZER, A.G., COLUMBANO-GREEN, L.M., PARFITT, R.G., SMYTHE, R.H. Y CHAPMAN, C.J. (1984). DIRECT INTRACHROMOSOMAL DUPLICATION OF 16q AND HERITABLE FRAGILE SITE FRA(10)(q25) IN THE SAME PATIENT. *Am. J. Hum. Genet.* 19, 507-513.
- 32.- SUTHERLAND, G.R. (1977). FRAGILE SITES ON HUMAN CHROMOSOMES: DEMONSTRATION OF THEIR DEPENDENCE ON THE TYPE OF TISSUE CULTURE MEDIUM. *SCIENCE.* 197, 265-266.
- 33.- SUTHERLAND, G.R. (1978). COMUNICACIÓN PERSONAL, TOMADO DE: (19).
- 34.- SUTHERLAND, G.R. (1979). HERITABLE FRAGILE SITES ON HUMAN CHROMOSOMES I. FACTORS AFFECTING EXPRESSION IN LYMPHOCYTE CULTURE. *Am. J. Hum. Genet.* 31, 125-135.
- 35.- SUTHERLAND, G.R. (1979). HERITABLE FRAGILE SITES ON HUMAN CHROMOSOMES II. DISTRIBUTION, PHENOTYPIC EFFECTS AND CYTOGENETICS. *Am. J. Hum. Genet.* 31, 136-148.
- 36.- SUTHERLAND, G.R. (1979). HERITABLE FRAGILE SITES ON HUMAN CHROMOSOMES III. DETECTION OF FRA(X)(q27) IN MALES WITH X-LINKED MENTAL RETARDATION AND IN THEIR FEMALE RELATIVES. *HUM. GENET.* 53, 23-27.
- 37.- SUTHERLAND, G.R. Y LEONARD, P. (1979). HERITABLE FRAGILE SITES ON HUMAN CHROMOSOMES IV. SILVER STAINING. *HUM. GENET.* 53, 29-30.
- 38.- SUTHERLAND, G.R., BAKER, E., Y SESHADRI, R.S. (1980). HERITABLE FRAGILE SITES ON HUMAN CHROMOSOMES V. A NEW CLASS OF FRAGILE SITE REQUIRING BrdU FOR EXPRESSION. *Am. J. Hum. Genet.* 32, 542-548.

- 39.- SUTHERLAND, G.R. (1981). HERITABLE FRAGILE SITES ON HUMAN CHROMOSOMES VII. CHILDREN HOMOZYGOUS FOR THE BROU REQUIRING FRA(10)(q25) ARE PHENOTYPICALLY NORMAL. AM. J. HUM. GENET. 33, 946-949.
- 40.- SUTHERLAND, G.R. (1982). HERITABLE FRAGILE SITES ON HUMAN CHROMOSOMES VIII. PRELIMINARY POPULATION CYTOGENETIC DATA ON THE FOLIC-ACID-SENSITIVE FRAGILE SITES. AM. J. HUM. GENET. 34, 453-458.
- 41.- SUTHERLAND, G.R. (1982). HERITABLE FRAGILE SITES ON HUMAN CHROMOSOMES IX. POPULATION CYTOGENETICS AND SEGREGATION ANALYSIS OF THE BROU-REQUIRING FRAGILE SITE AT 10q25. AM. J. HUM. GENET. 34, 753-756.
- 42.- SUTHERLAND, G.R., JACKY, P.B., BAKER, E. Y MANUEL, A. (1983). HERITABLE FRAGILE SITES ON HUMAN CHROMOSOMES X. NEW FOLATE-SENSITIVE FRAGILE SITES, 6p23, 9p21, 9q32, AND 11q23. AM. J. HUM. GENET. 35, 432-437.
- 43.- TARTAGLIA, A.P., PROPP, S., AMAROSE, A.P., PROPP, R. D. Y HALL, C.A. (1966). CHROMOSOME ABNORMALITY AND HYPOCALCAEMIA IN CONGENITAL ERYTHROID HYPOPLASIA (BLACKFAN-DIAMOND SYNDROME). AM. J. MED. 41, 990-999. TOMADO DE: (35).
- 44.- TAYLOR, A.M.R., BUNDEY, S. (1983). SPONTANEOUS EXPRESSION OF THE CHROMOSOME FRAGILE SITE FRA(10)(q25). AM. J. HUM. GENET. 35, 123-125.
- 45.- THOMPSON, J.S. Y THOMPSON, M.W. (1975). GENETICA MEDICA. Ed., SALVAT, BARCELONA, PP. 401.
- 46.- TURNER, G., BROOKWELL, R., DANIEL, A., Y SELIKOWITZ, M. (1980). HETEROZYGOUS EXPRESSION OF X-LINKED MENTAL RETARDATION AND X-CHROMOSOME MARKER FRA(X)(q27). THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE. 303, 662-664.
- 47.- BOWMAN, W.C. Y RAND, N.J. (1984). FARMACOLOGIA; BASES BIOQUIMICAS Y PATOLOGICAS, APLICACIONES CLINICAS. Ed., INTERAMERICANA, MEXICO.