

00381 2ej. 6



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Ciencias

**CICLO CELULAR EN PACIENTES CON
ALTERACIONES CROMOSOMICAS**

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGIA)
P R E S E N T A :
SARA FRIAS VAZQUEZ

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D. F.

1988



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.

INDICE

RESUMEN	1
I CICLO CELULAR	
1.- Definición	2
2.- Ciclo celular y estirpes celulares	4
3.- Duración del ciclo celular	6
4.- Fases del ciclo celular	
a) Fase G ₁	6
b) Fase S	11
c) Fase G ₂	13
d) Fase M ó D	14
e) Fase G ₀	15
5.- Métodos para el estudio del ciclo celular	16
a) Índice de mitosis marcadas	17
b) Citofluorometría	18
c) Citofluorometría de flujo	20
d) Marcaje de mitosis con BrdU	22
II CROMOSOMAS	
1.- Cromosomas humanos normales	26
2.- Aberraciones cromosómicas	29
a) Alteraciones numéricas	31
b) Alteraciones estructurales	32
III ALTERACIONES CROMOSOMICAS Y CICLO CELULAR	32
IV OBJETIVO	39
V HIPOTESIS	39
VI METODOS	
1.- Población de estudio	40
2.- Características de los grupos de estudio	
a) Cuadro clínico de síndrome de Down	42
b) Cuadro clínico de síndrome de cri-du-chat	43
c) Cuadro clínico de síndrome de Klinefelter	43
d) Cuadro clínico de síndrome de Turner	44
3.- Método de estudio	
a) Siembra	46

	b) Cosecha	46
	c) Preparación de laminillas	46
	d) Observaciones y mediciones	47
VII	RESULTADOS	48
VIII	DISCUSION	49
IX	BIBLIOGRAFIA	54
	Gráficas	60
	Cuadros	66

RESUMEN.

Se estudió la duración del ciclo celular en linfocitos de individuos normales y de individuos con alteraciones cromosómicas: trisomía 21 (síndrome de Down), monosomía 5p (síndrome de cri-du-chat), trisomía de sexocromosomas (síndrome de Klinefelter) y monosomía X (síndrome de Turner). Se utilizó el método de incorporación de bromodesoxiuridina en cultivo de linfocitos de sangre periférica. Las cosechas celulares se hicieron cada 6 horas durante el intervalo comprendido entre las 36 y las 78 horas de cultivo. Se analizaron 100 metafases por cada tiempo de cosecha, se graficó el porcentaje de células en primero, segundo y tercero o subsiguientes ciclos de replicación y se obtuvo el tiempo de generación para cada individuo.

Los resultados muestran que el promedio de duración del ciclo celular para individuos normales es de 13.6 hs, para síndrome de Down, de 13.6 hs, para síndrome de cri-du-chat, de 14.8 hs, para síndrome de Klinefelter, de 13.4 hs y para síndrome de Turner, de 10.2 hs. Este último grupo de pacientes mostró un tiempo de generación reducido en un 20% con respecto al resto de los individuos.

De acuerdo con estos resultados, es posible que la ausencia del segundo cromosoma sexual, sea X o Y, ambos altamente heterocromáticos, juegue un papel importante en la duración del ciclo celular.

I CICLO CELULAR.

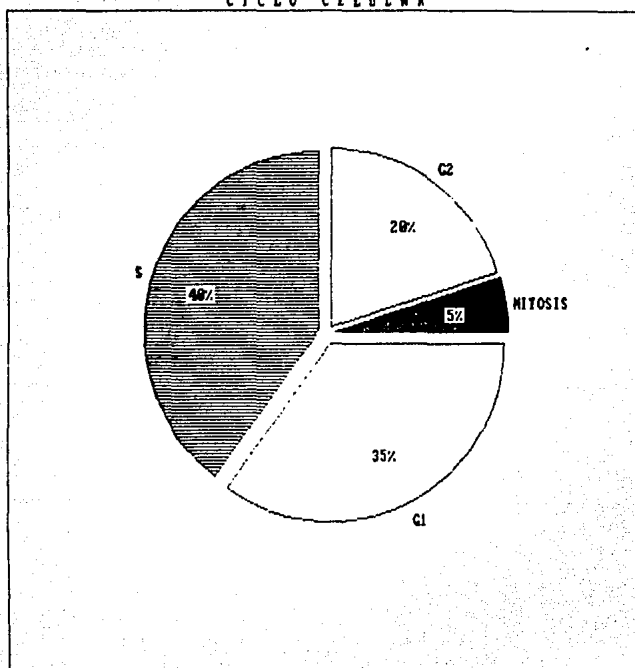
1. Definición.

La continuidad y propagación de todas las especies de organismos, dependen directamente de su reproducción celular. A nivel de organismos unicelulares, cada ciclo de reproducción incrementa la población en un miembro y entre los organismos multicelulares, asegura la continuidad de las células germinales y provee las nuevas células somáticas que se requieren para construir y mantener un individuo. Se calcula que para mantener las poblaciones celulares renovables en un humano adulto, se llevan a cabo alrededor de 20×10^6 divisiones por segundo. La tasa de reproducción celular es diferente y depende del tipo de tejido, pero en cada uno de ellos, la formación de nuevas células tiene un balance exacto en relación a las células perdidas. El desequilibrio entre estos dos parámetros puede traer como consecuencia la formación de neoplasias (1).

Es notable la precisión con la que se regula tanto la cantidad como las características cualitativas de las células de nueva formación, ya que deben estar estructural y bioquímicamente capacitadas para desarrollar las funciones propias de cada población celular.

El proceso de la formación de nuevas células, depende del paso de cada una de ellas a través de tres procesos: Crecimiento, replicación del ADN y división celular, los cuales integran lo que comunmente se define como ciclo celular (CC). Podemos considerar al CC como una secuencia ordenada de procesos, unidos no necesariamente en un sentido estricto de relación causa-efecto, pero con una secuencia mutuamente dependiente, que llevan a una célula a dividirse y dar lugar a dos células hijas. Estos procesos pueden ser distinguibles estructural y/o bioquímicamente en fases de actividad reconocidas como fases del CC (2).

CICLO CELULAR



Debido a que es variable la duración en horas del ciclo celular en los diferentes tipos de células, se representa en porcentajes la duración de las diferentes fases.

Las fases del CC fueron propuestas originalmente por Howard y Pelc en 1953 (1), y tomaron en cuenta dos eventos celulares fácilmente reconocibles en las células cíclicas: la mitosis y la replicación del ADN. Estos autores consideraron que un ciclo comienza cuando una célula sale de mitosis y termina con la siguiente división, así al tiempo entre la división celular y el comienzo de la síntesis de ADN se le llamó G₁ (del inglés Gap). Al período de replicación del ADN se llamó fase S (de Síntesis), al lapso comprendido entre la síntesis de ADN y la mitosis subsecuente se le denominó G₂ y por último al período de división celular fase M ó D (por Mitosis o División)

Los períodos G, S y G₂ son estadios de continuo crecimiento celular y comprenden la llamada interfase. (Figura 1)

2. Ciclo celular y estirpes celulares.

Los diversos tejidos de un organismo animal se clasifican en general en tres categorías, de acuerdo a su capacidad proliferativa:

- a) Tejidos no renovables. Compuestos por células no cíclicas y no reemplazables, como las de la línea germinal femenina, del sistema nervioso central y de músculo estriado.
- b) Tejidos con capacidad de renovación condicional. Compuestos por células no cíclicas, pero con capacidad re^generativa, como hígado, riñón, tejido conectivo y algunos epitelios glandulares.
- c) Tejidos continuamente renovables. Compuestos por una gran cantidad de células cíclicas y que constantemente reemplazan su población, como tejido hematopoyético, epitelios de superficie, línea germinal masculina.

En cuanto a las células que componen los 2 últimos tipos

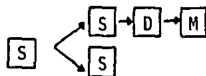
de tejidos, podríamos distinguir dos clases de poblaciones:

- Población de células madre, las cuales son capaces de sostener su propio número (automantenimiento), así como de producir todas las líneas celulares requeridas por el tejido.
- Población de células en tránsito.

Son células que provienen de las células madre y que continuamente se están moviendo hacia un estado de diferenciación y proliferación, por lo cual pierden pluripotencialidad con las divisiones celulares y por lo tanto no poseen capacidad de automantenimiento y eventualmente llegarán a ser células no cíclicas. (3)

De esta clasificación de poblaciones celulares, se desprende una pregunta obligatoria: ¿Cómo puede una célula madre hacer divisiones celulares que por una parte provean nuevas células madre y por otra provean a la población de células en tránsito? Para contestarla, se propone que existen dos tipos de CC; Simétricos y asimétricos.

Los ciclos simétricos se caracterizan por dar como resultado dos células hijas idénticas a la parental y que podrían más tarde diferenciarse hacia células en tránsito o bien quedar como células madre.



Los ciclos asimétricos darían como resultado que las dos células hijas fueran diferentes; una para automantenimiento y otra para células en tránsito.



S=Células Madre

D=Células en tránsito

M=Células en proliferación

No se sabe como se lleva a cabo el proceso, pero un dato al respecto que parece tener importancia es que durante la Síntesis del ADN, las histonas se distribuyen en las cadenas hijas del ADN de forma conservativa, (4) de manera que las histonas parentales se disponen sobre la hebra de síntesis continua, lo cual podría cambiar la disponibilidad de transcripción de los genes entre una y otra de las células hijas. (5)

Se propone también que existen genes que controlan el automantenimiento y podrían al menos en parte corresponder a proto-oncogenes tales como src y myc. (4)

3. Duración del ciclo celular.

La duración promedio del CC varía de un tipo celular a otro y aún dentro de una población homogénea, las células individuales pueden tener tiempos de generación diferentes. Tradicionalmente, se decía que un CC se realizaba en aproximadamente 20 hs (6) y si se generaliza, se observa que la fase de mitosis dura aproximadamente una hora, G_2 varía de 2 a 4 hs, la fase S de 7 a 8 hs y por último, la fase G_1 , que es la más variable, puede ser extremadamente larga ó prácticamente no existir (células embrionarias ó línea V79-8) (7).

4. Fases del Ciclo Celular.

a) Fase G_1 .

Esta es la fase más variable en tiempo del CC, se puede proponer una duración de 1 a 9 hs y en promedio, de 8 hs (1).

Es durante este período, cuando se lleva a cabo una gran parte del crecimiento celular. La actividad de los 3 tipos de ARN polimerasa aumentan, así como la cantidad de ribosomas dando como consecuencia un

incremento en la cantidad de ARN y proteínas.

Es muy difícil detectar las proteínas específicas que se forman en cualquier fase del ciclo celular, sin embargo con el advenimiento de las técnicas de anticuerpos monoclonales, se han podido encontrar proteínas fase-específicas y aún ordenarlas de manera temporal: (7,8,9,10,11,12)

Calmodulina	G ₁ temprana
Proto-oncogen c-myc	G ₁ temprana
Ornitina descarboxilasa	G ₁ media
p 53	G ₁ media
Proto-Oncogene C-Ha-ras	G ₁ media
Actina β	G ₁ tardía
Timidina cinasa	G ₁ tardía
Histona H3	G ₁ tardía

Muy probablemente esta modulación de la expresión génica ciclo-dependiente se correlacione con una serie de eventos que ocurren a través de la fase G₁:

Se sabe que el paso de iones a través de la membrana durante la fase G₁ se torna muy activo, sobre todo en lo que se refiere a cationes del tipo K⁺, Na⁺, Mg⁺⁺ y Ca⁺⁺, probablemente el incremento de la calmodulina esté regulando de manera específica la concentración de Ca⁺⁺ en la célula y esto es un paso esencial para la continuidad del ciclo, puesto que se usa una droga anticalmodulina, la célula retrasa su entrada a la fase S.

Casi invariablemente la entrada a la fase G₁ se acompaña con cambios a nivel de superficie celular muy probablemente involucrados en el transporte de iones y nutrientes. Es difícil cuantificar los cambios a nivel bioquímico, sin embargo se ha detectado un in-

cremento en la cantidad de colesterol, así como la aparición de proteínas de membrana como la proteína p-21, producto del proto-oncogen c-Ha-ras, la cual podría actuar como un transductor de señales que afectan la proliferación celular. (7,9)

En cuanto al crecimiento que en general se observa en las células en G_1 , se ha encontrado que la enzima ornitina descarboxilasa y sus productos, las poliaminas están involucradas en la regulación de la transcripción, vía la fosforilación de una proteína no histona. Esta proteína se fosforila por una proteína-quinasa dependiente de poliaminas, de manera que la inhibición de la ornitina descarboxilasa bloquea la proliferación celular.

La fosforilación de proteínas en general es un evento importante en G_1 , de hecho algunos factores de crecimiento y la insulina son responsables de la fosforilación de tirosina en proteínas cuya función correlaciona con el crecimiento celular.

En G_1 , podemos decir que existen eventos nucleares (G_1n) y citoplasmáticos (G_1c), de manera que el ciclo cromosómico comprende S, G_2, M y G_1n , los cuales proceden en estricto orden de sucesión, su duración es muy constante y es independiente de los reguladores del crecimiento intra y extracelulares.

En cuanto a G_1c , su duración puede también ser constante, pero el punto de iniciación puede variar en cada ciclo, y depende de dos condiciones contradictorias:

- Formación intracelular de un inhibidor del crecimiento (G_1).
- Disponibilidad de los factores de crecimiento

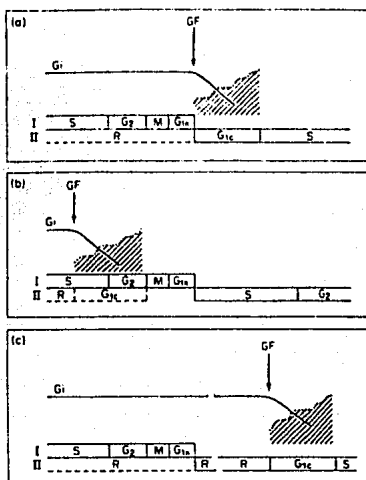
extracelulares (GF).

Este es el punto de restricción en G_{1c}, de manera que si la célula no lo libra, se producirá una detención del ciclo, pero si lo hace, la célula progresará hacia la fase S y el resto del CC.

Se propone que el inhibidor GI impide las reacciones de G_{1c}, su formación no depende de GF, pero su caída y el comienzo de la preparación para la fase S, ocurre sólo en presencia de GF. GF consta de dos partes: GF de competencia y GF de progresión. Los primeros actúan con receptores de superficie, y bajan la concentración del inhibidor GI, prerequisite necesario para el inicio de las reacciones de G₁.

Los segundos se requieren para hacer a la célula competente para atravesar varios pasos del período replicativo. De esta manera, de acuerdo al estado del ciclo en que GF lleguen a la concentración umbral, se iniciará G_{1c} y por lo tanto, se podrán explicar las diferencias en la duración de G₁. (13) (Figura 2).

FIGURA 2
CORRELACION ENTRE FACTORES REGULADORES DE
LA DIVISION, INTRA E INTERCELULARES



Gi: Inhibidor intracelular de la división

GF: Factores de crecimiento extracelulares

G_{1n}: Período de reorganización nuclear post-mitótico.

G_{1c}: Período de reacciones extranucleares necesarias para el inicio de fase S.

R: Período de reposo. (del inglés Resting state).

▨ Preparación para la duplicación del ADN.

a) Células con fase G₁ normal.

b) Células con fase G₁ corta o "inexistente"

c) Células con fase G₁ muy larga.

b) Fase S.

Las células de mamífero contienen un ADN con aproximadamente 10^9 pares de bases, distribuido en diferentes pares cromosómico (23 en la especie humana). Esta gran cantidad de ADN hace muy compleja la fase S en la cual se lleva a cabo la replicación del genoma, que además incluye el ensamblaje de proteínas histonas y no histonas con el ADN.

La replicación en estos organismos se lleva a cabo por medio de un gran número de unidades de replicación o replicones (entre 1000 a 30,000 por genoma haploide humano). Cada replicon tiene un centro de origen desde el cual las horquillas de crecimiento se extienden en ambas direcciones hasta que se unen. La iniciación de la síntesis es secuencia-específica y requiere de un oligoribonucleótido iniciador al cual se le agregan los desoxiribonucleótidos a una velocidad de 0.5 a $2 \mu\text{m}/\text{min}^{-1}$. El tamaño de cada replicón es de 7 a $100 \mu\text{m}$, de manera que en unos cuantos minutos se termina de sintetizar el ADN de cada replicón. Si todos los replicones iniciaran la duplicación al mismo tiempo, la fase S duraría apenas 20 minutos, lo cual no concuerda con la duración promedio de fase S que es de 8 horas.

Se sabe que no todos los replicones inician la síntesis al mismo tiempo, sino que grupos de ellos supuestamente responden a una señal común para iniciarla simultáneamente, pero a diferentes tiempos dentro de la fase S.

Este orden temporal de replicación existe dentro de los diferentes segmentos de un solo cromosoma y se conserva a través de las divisiones sucesivas.

Los patrones de replicación secuencial correlacionan con el contenido de bases, de manera que las regiones eucromáticas ricas en G-C replican durante S temprana y aquellas heterocromáticas ricas en AT lo hacen durante S-tardía.

Debe notarse además, que la heterocromatina facultativa representada por el segundo cromosoma X de las hembras de mamíferos, se replica en la última parte de la fase S y en este caso no existe correlación a nivel de secuencia de bases y no sigue el mismo patrón en células embrionarias que en células adultas.

No se sabe como se regula el patrón de replicación secuencial, pero existen datos que apoyan que la metilación del ADN puede jugar un papel importante.

En lo que se refiere a la síntesis de proteínas específicas de fase S, la mayor parte de ellas están relacionadas con la replicación del ADN y en general todas incrementan su actividad en el límite G1/S y son las siguientes:

Enzimas de Replicación:

Timidina cinasa

Timidilato cinasa

Ribonucleótido reductasa

Dihidrofolato reductasa

Desoxitimidilato sintetasa

ADN polimerasa

Timidilato Sintetasa

Topoisomerasa dependiente de ATP

Otras proteínas:

O⁶ metil transferasa

ADP ribosil transferasa

Variantes H1.3, H1.4 y H1.5
 H₂A, H₂B, H3 y H4
 Receptor para transferrina

De todas las proteínas que se sintetizan en la fase S, la mayor parte corresponden a enzimas de replicación e histonas (7,14,15,16,17). Además de esta síntesis específica, existe también una fosforilación fase S-específica que se realiza primordialmente sobre Histonas.

Es fácil entender entonces, que la inhibición de la síntesis de proteínas inhibe el tránsito de la fase S, ya que no se forma la maquinaria bioquímica necesaria para la replicación y sumado a esto, se sabe que el progreso a través del CC se acompaña siempre de una aparición sucesiva de receptores de superficie para los diferentes factores de crecimiento.

c) Fase G₂.

Esta fase representa el tiempo que la célula requiere para sintetizar los elementos necesarios para la condensación cromosómica y la construcción del aparato mitótico.

De los resultados de experimentos de inhibición de síntesis de proteínas y ARN, se deduce que existe una dependencia de síntesis tanto de proteínas como de ARN para el inicio y el progreso a través de la fase G₂. Si la inhibición de ARN se lleva a cabo aún faltando 10 minutos para iniciar fase M, la célula queda bloqueada en G₂. Esta especificidad de requerimientos no incluye ARN ribosomal. (1,7)

Se sabe poco acerca de las proteínas específicas que se sintetizan en fase G₂, sin embargo existe

evidencia de la síntesis de dos antígenos detectados por anticuerpos monoclonales: HBJ127 y HBJ98, los cuales aparecen en linfocitos activados y son necesarios para el progreso de G_2 a M. (12,18)

Por técnicas electroforéticas también se han encontrado varias proteínas no caracterizadas aún, pero que se sintetizan principalmente durante la fase G_2 y probablemente están involucradas en la condensación cromosómica o con la aparición del huso mitótico (1).

Por último, cabe hacer notar que el progreso de fase S hacia M no es automático. Parece existir un segundo punto de restricción en fase G_2 , lo cual se infiere por el hecho de que existen células que entran a fase M muy poco tiempo después de un estímulo apropiado y también porque existen células no cíclicas que tienen una cantidad de ADN correspondiente a G_2 .

d) Fase M ó D.

En esta fase, la síntesis de proteínas y de ARN está muy disminuida, solo continúan traduciéndose proteínas cromosómicas no histonas y en relación al ARN, la inhibición de la transcripción afecta ARN ribosomal, mensajero y de transferencia, sin embargo la cantidad de las 3 polimerasas es igual a la detectada en interfase, por lo cual el bloqueo de la transcripción parece estar a nivel de cromatina, la cual disminuye considerablemente su actividad como patrón y de hecho solo se sintetizan dos ARN: 4S y 5S.

La síntesis de proteínas no disminuye por falta de ARN, sino aparentemente porque existe una inhibición a nivel de iniciación de la traducción, de tal manera que los ribosomas no pueden unirse al ARN.

Finalmente, durante la mitosis la proteína H3 se fosforila así como la H1 en los residuos serina y treonina en la porción amino terminal, muy probablemente para llevar a cabo la condensación cromosómica (7).

e) Fase G₀.

El problema de si las células no cíclicas están en un estado fisiológico único, cuantitativamente diferente de cualquier fase del ciclo celular permanece aún como sujeto de controversia.

Se propone que una célula no cíclica, puede estar en fase G₁ muy prolongada. Esta controversia debe resolverse con estudios de cinética celular, además del estudio cuidadoso de los eventos bioquímicos que ocurren en el CC y en las células no cíclicas, de manera que pueda obtenerse una respuesta concluyente. (13)

Hay considerable evidencia experimental que indica que el estado G₀ existe como un período no replicacional y fuera del CC.

- 1 - Cuando las células en G₀ se estimulan para llevar a cabo la replicación, la fase pre-replicativa es considerablemente mayor que la duración de G₁ en las mismas células, lo cual indica que las células no cíclicas deben reorganizar su actividad fisiológica para ingresar al ciclo celular.
- 2 - Los patrones electroforéticos de proteínas no histónicas son muy diferentes en células de la misma estirpe en G₀ y G₁, por lo que debemos considerar que existe una expresión génica diferente en ambas fases.
- 3 - Existe una proteína llamada p53, muy parecida

al antígeno T de células transformadas con virus SV40 que se expresa en fase G_1 y que es requisito indispensable para que las células abandonen G_0 , pero no es necesaria para atravesar por G_1 .

- 4.- Ciertas variantes de proteínas histónicas se sintetizan en G_0 pero no en G_1 y otras tienen patrones de expresión inversa. (16)
- 5.- El número de sitios sensibles a nucleasa S1 en el ADN purificado es 0 en Goy²² a $43/10^5$ pares de bases en células en G_1 .
- 6.- Existen células no cíclicas que fueron bloqueadas no en G_1 sino en G_2 antes de ingresar a fase G_0 .

Basados en las evidencias antes mencionadas, se concluye que el período G_0 existe como una parte del ciclo de vida de las células eucariontes y es cualitativa y cuantitativamente diferente de cualquier fase del ciclo celular (1,7,16).

5. Métodos para el estudio del ciclo celular.

El campo de estudio de la cinética celular depende de la disponibilidad de técnicas que revelen las características proliferativas de poblaciones celulares normales y anormales. La primera publicación que contribuyó con un método confiable para estudiar la dinámica del ciclo celular apareció en 1953, en ella Howard y Pelc describieron la técnica del índice de mitosis marcadas, con la cual pudieron obtener la duración total del ciclo celular y se establecieron las fases de éste como las conocemos hasta la actualidad. A partir de este trabajo pionero, los métodos para el estudio en la reproducción celular han evolucionado considerablemente, debido a los avances metodológicos en las áreas de la citología, la bioquímica y la fisicoquímica (19,20).

a) Índice de mitosis marcadas.

En este método, una población que prolifera asincrónicamente se trata de un pulso corto de ^3H timidina o bien con ^{32}P . Las muestras se preparan para examen al microscopio a intervalos regulares después del pulso y se determina por autorradiografía el porcentaje de mitosis radioactivas. De esta manera, se observa el movimiento del bloque de células marcadas en fase S durante el pulso, conforme van pasando a través de un punto fijo del ciclo: la mitosis.

Durante las primeras horas después del pulso, todas las células que entraban en mitosis no estaban marcadas; estas eran las células que se encontraban en fase G_2 cuando se dió el pulso. Conforme va pasando el tiempo, comienzan a emerger mitosis radioactivas y el porcentaje se eleva hasta cerca del 100%; estas células corresponden a aquellas que durante la exposición al isótopo radioactivo se encontraban en fase de síntesis. Eventualmente, las células que se encontraban en G_1 comienzan a llegar a mitosis y el índice de mitosis marcadas comienza a disminuir. Posteriormente, las células que primero aparecieron marcadas llegan a una segunda mitosis y el índice mitótico marcado se eleva de nuevo.

El promedio de la duración de fase S se toma como el intervalo de tiempo entre las pendientes ascendente y descendente en el punto de 50% de células marcadas.

El tiempo total del ciclo celular o tiempo de generación se obtiene al medir el intervalo que

existe entre los puntos de 50% de células marcadas en las dos pendientes ascendentes. La duración de la fase G_2 está representada por el intervalo comprendido de las cero horas al punto en el cual el 50% de las mitosis aparecen marcadas y la fase G_1 es el intervalo entre los puntos de 50% de la curva descendente y de la segunda ascendente. (20). Las desventajas de esta técnica son que puede haber inhibición potencial de la replicación y reutilización de nucleótidos radiactivos.

Las ventajas de este método son, que en primer lugar permite estudiar la cinética celular en poblaciones asincrónicas y en segundo lugar que puede aplicarse al estudio de organismos CC in vivo, ya que una inyección del compuesto radio activo es equivalente a un pulso en los cultivos celulares (Figura 3).

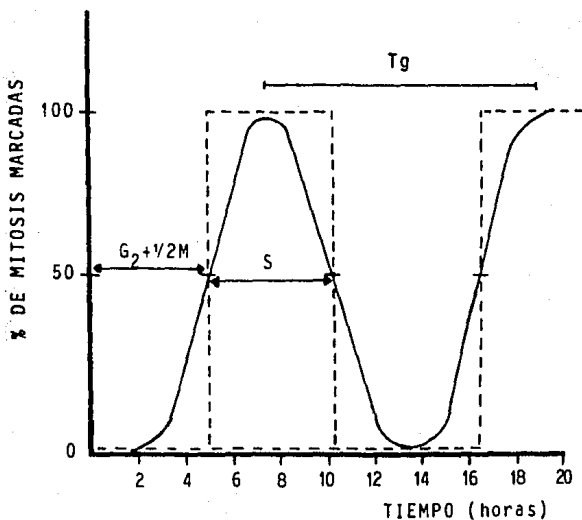
b) Citofluorometría.

Este método está basado en el hecho de que la mayor parte de las células en una población tienen una cantidad diploide ($2n$) de ADN en fase G_1 , $4n$ en fase G_2 y las células en fase S muestran una cantidad intermedia: $>2n <4n$. Si es posible medir la cantidad de ADN, se obtiene una distribución de las células a través del CC.

En los primeros estudios, la medición del ADN se hacía por citofotometría, en células fijadas y teñidas con un colorante específico para el ADN, o bien por microespectrofotometría ultravioleta. Ahora se puede facilitar la obtención de resultados con la ayuda de computadoras.

FIGURA 3

DETERMINACION DEL CICLO CELULAR MEDIANTE LA
TECNICA DE MITOSIS MARCADAS.



En la figura se representa cómo se determina la duración de la fase $G_2 + \frac{1}{2} M$, fase S y tiempo de generación (T_g). La fase G_1 se obtiene restando a T_g : $(G_2 + M) + S$. (20)

c) Citofluorometría de flujo.

Para hacer un análisis de citofluorometría de flujo se requiere la preparación de una suspensión de células teñidas con un fluorocromo ADN-específico. Las células se hacen pasar una por una a través de un citómetro de flujo en donde un rayo laser con la longitud de onda apropiada hace fluorescer al colorante. La fluorescencia se registra para cada célula como una medida de su contenido de ADN. Se pueden medir miles de células por segundo y los resultados se acumulan para formar una curva. Las células en G_1 tienen una cantidad $2n$ de ADN, las que están en G_2 y M tienen $4n$ y las que están en fase S tienen una cantidad intermedia que forman una línea continua entre los dos picos de G_1 y G_2+M .

Debido a que este tipo de estudios es transversal, la distribución de ADN en la población celular se puede hacer rápida y adecuadamente y se puede detectar también la pérdida celular, pero la información citocinética que aporta es considerablemente menor que la del método del índice de mitosis marcadas. De manera que si se pretende llevar a cabo un estudio de cinética celular, la población debe seguirse longitudinalmente.

Una innovación para este método fué la propuesta por Latt en 1977, quien utilizó la incorporación de BrdU que puede detectarse por su capacidad de opalescer con Hoechst 33258 (Ho) (21).

Si las células crecen continuamente en presencia de BrdU, la duración de las fases del ciclo celular se estima midiendo la tasa a la cual las

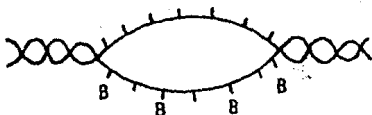
células con contenido de ADN correspondiente a G_1 , S ó $G_2 + M$, se mueven a través de fase S in incorporando BrdU y se registra la fluorescencia Ho-reducida. Desafortunadamente se requiere una gran cantidad de BrdU incorporada y es difícil realizarlo in vivo.

La utilidad de la incorporación de BrdU es mayor con el uso de anticuerpos monoclonales anti-BrdU, los cuales se usan como agentes inmunofluorescentes para teñir las células que contienen BrdU, puesto que dan una fluorescencia proporcional a la cantidad de BrdU incorporada, y si se complementa con la determinación del ADN total, se obtienen mejores resultados.

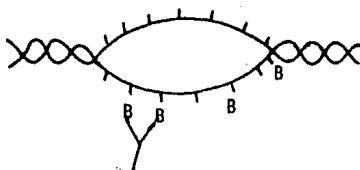
Cuando se puede medir simultáneamente la cantidad de ADN y la proporción de BrdU incorporada, la información que se obtiene es considerablemente más confiable. Esto se ha podido lograr con técnicas inmunocitoquímicas, que se basan en la tinción simultánea con dos colorantes que fluorescen a 2 diferentes λ (verde y rojo) pero que pueden estimularse con un solo rayo laser.

La metodología incluye 3 pasos:

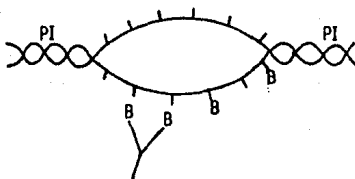
- 1o. Desnaturalización parcial del ADN de células expuestas a BrdU:



20. Detección inmunocitoquímica de la BrdU incorporada con anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína (verde)



30. Tinción del ADN no desnaturalizado con ioduro de Propidio (rojo)



De esta manera, se pueden leer simultáneamente en un citofluorómetro. Para hacer un análisis citocinético, la BrdU se administra como un pulso y se toman muestras periódicamente para análisis BrdU/ADN. La citocinética se puede estimar por la tasa a la cual cambian las distribuciones de BrdU/ADN (22).

- d) Marcaje de mitosis con BrdU.

Este es un método que esencialmente se ba-

sa en los principios de la técnica de índice de mitosis marcadas, la cual sigue siendo un excelente método para el estudio de la cinética de poblaciones celulares.

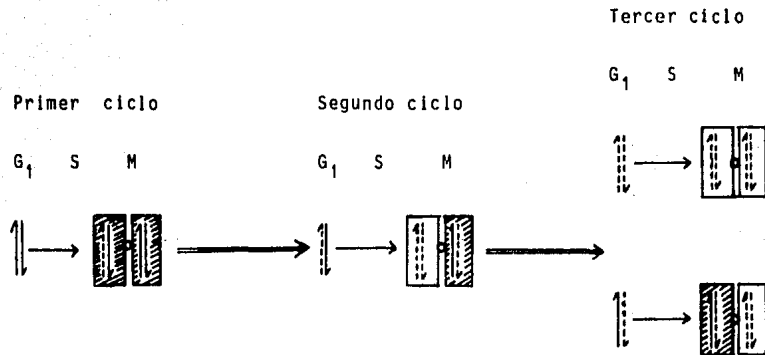
La técnica de marcaje con BrdU se desarrolló en 1974 por Perry y Wolff (23), y se basa en la capacidad del ADN de incorporar BrdU en lugar de timina al momento de la replicación. Cuando una población celular crece en presencia de este análogo del nucleótido, las células que han llevado a cabo un ciclo de replicación tienen cromosomas metafásicos con una substitución de timina igual en ambas cromátidas. Cuando han pasado por dos ciclos de replicación, una cromátida está bifilarmente substituída, mientras que la cromátida hermana lo está sólo unifilarmente y cuando han pasado por tres o más ciclos de replicación, las células presentan cromosomas de dos tipos: aquellos que tienen una cromátida unifilarmente substituída y otra bifilarmente substituída, así como cromosomas con ambas cromátidas bifilarmente substituídas (Figura 4).

Los cromosomas con diferentes grados de substitución pueden identificarse fácilmente si se tiñen con el fluorocromo Hoechst 33258, de manera que cuando ambas cromátidas están unifilarmente substituídas, el cromosoma fluoresce intensamente y cuando existe substitución bifilar la fluorescencia puede clasificarse fácilmente a las células en metafase que han pasado por uno, dos o tres ciclos ó más de replicación del ADN (Figura 5).

Originalmente, esta técnica se utilizó para estu-

FIGURA 4

DIFERENCIACION DE LAS CROMATIDAS HERMANAS
POR SUBSTITUCION DE BrdU





En el esquema, las líneas sólidas representan las cadenas de ADN con timina y las punteadas representan las substituídas con BrdU. Cuando se utiliza la tinción con Hoechst 33258, la intensidad de la fluorescencia refleja el grado de substitución:  fluorescencia intensa,  fluorescencia pálida.

FIGURA 5

FLUORESCENCIA DIFERENCIAL DE LAS METAFASES OBTENIDAS MEDIANTE LA METODOLOGIA BrdU-HOECHST 33258.

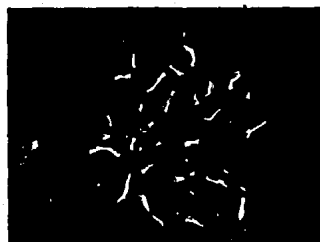
a) Metafase de primer ciclo.



b) Metafase de segundo ciclo.



c) Metafase de tercer ciclo.



diar el fenómeno de intercambios de cromátidas hermanas, sin embargo poco tiempo después, varios autores lo usaron para examinar la cinética proliferativa de diversas poblaciones celulares (24, 25, 26 y 27).

Aprovechando esta capacidad para identificar la historia replicativa de las células en metafase, las poblaciones asincrónicas que crecen en presencia de BrdU se pueden cosechar a diferentes tiempos de incubación, se analiza un número preestablecido de células y se determina en que ciclo está cada una, se grafica el número de células en primera, segunda y tercera o subsecuentes divisiones para cada cosecha y la duración del CC se determina sobre las gráficas y se toman como puntos de referencia el 50% de la primera pendiente descendente es decir de células en primera división y el 50% de la segunda pendiente ascendente que son células en 3a división ó subsecuentes (Figura 6).

Recientemente, Pincu y cols (28), desarrollaron una modificación a este método, con la cual es posible identificar además células en interfase que se encuentran en G_0 o bien en G_1 , lo cual amplía la utilización de esta técnica en lo que se refiere a cinética de proliferación celular.

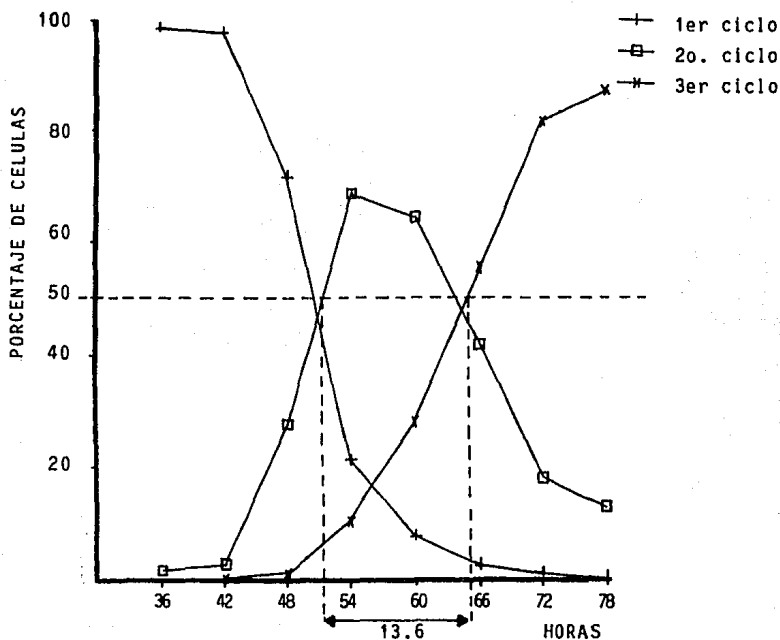
II CROMOSOMAS.

1. Cromosomas Humanos Normales.

Los cromosomas humanos, como los del resto de los mamífe-

FIGURA 6

DETERMINACION DE LA DURACION DEL CICLO CELULAR POR MEDIO DE INCORPORACION DE BRDU EN CROMOSOMAS METAFASICOS.



Los puntos de referencia sobre la gráfica, son el momento en que el 50% de las células están en 2o. ciclo y el momento en que el 50% están en 3er ciclo. El tiempo comprendido entre estos dos puntos, corresponde a la duración del ciclo celular.

ros, están compuestos por una larga hebra de ADN duplex asociados a proteínas histonas (H1, H₂A, H₂B, H3 y H4) y no histonas, así como ARN lo cual forma la cromatina. Todos los cromosomas están compuestos por cromatina, que en el núcleo en interfase se observa como un material granular, que se tiñe fácilmente con colorantes básicos y que corresponde a la mayor parte del contenido del núcleo interfásico.

La cromatina se divide en dos tipos: Eucromatina y Heterocromatina. La eucromatina se puede identificar en el núcleo interfásico como material laxo, poco denso a los electrones y generalmente situado hacia el centro del núcleo. Su composición de bases es generalmente de secuencia única y se replica en fase S temprana. La característica principal que presenta es la de -transcripción activa.

La heterocromatina corresponde a la cromatina compacta densa a los electrones y que se sitúa en la periferia del núcleo en interfase; genéticamente es inerte, o sea que su actividad a nivel de transcripción es nula. Se divide en dos tipos principales:

Heterocromatina constitutiva, la cual se localiza en todos los cromosomas principalmente a nivel pericéntrico y telomérico. En los cromosomas 1, 9, 16, y Y los bloques heterocromáticos son muy grandes. Este material tiene una composición de bases rica en A-T y constituye lo que se conoce como ADN satélite, el cual presenta secuencias altamente repetitivas. Su replicación se lleva a cabo en fase S tardía.

El segundo tipo de heterocromatina es la facultativa, se encuentra en las hembras de mamífero como un corpúsculo muy condensado y pegado a la envoltura nuclear, se le conoce también como corpúsculo de Barr ó sexocromatina. Aparece aproximadamente al decimosexto día de vida intrauterina por la in-

activación de uno de los dos cromosomas X. Esta inactivación se realiza al azar sobre cualquiera de los X, y toda la pro-genie celular inactivará el X condensado originalmente.

Debido a que la heterocromatina facultativa aparece por la inactivación de un X, la composición de bases es de secuen-cia única, como cualquier otro cromosoma, pero se conservan las características de inactividad génica así como de replica-ción tardía.

Cuando la célula entra en división celular, estas lar-gas fibras de cromatina se condensan ordenadamente, y dan lu-gar a los cromosomas mitóticos, que se pueden separar y dife-renciar fácilmente uno de otro, especialmente durante la meta-fase y por medio de sus características estructurales, se pue-den clasificar y hacer cariotipo (Figura 7).

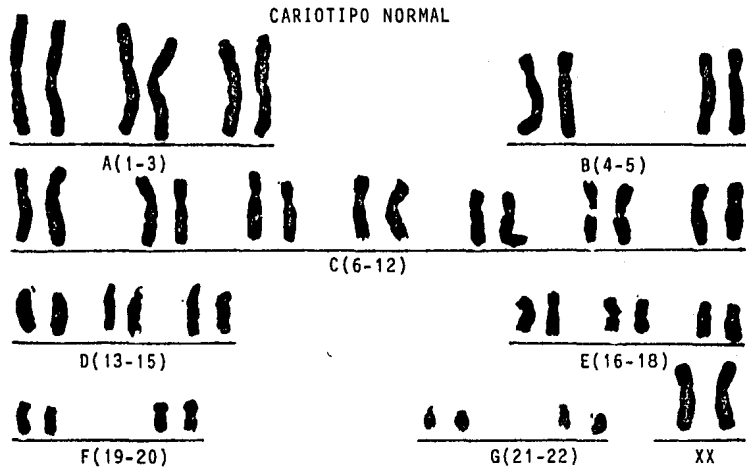
2. Aberraciones Cromosómicas.

Cualquier cambio tanto numérico como estructural de los cromosomas, representa una anomalía en el cariotipo y pue-de traer como consecuencia alteraciones fenotípicas. Las anomalías citogenéticas son una de las causas más importan-tes de pérdida fetal y de defectos congénitos. Se estima que su frecuencia es alrededor de 0.7% en los recién nacidos, 50% de todos los abortos espontáneos y aproximadamente 7.5% del total de concepciones.

Los desbalances cromosómicos generalmente se acompañan de retraso mental y múltiples dismorfias, tanto para deficien-cias como para duplicaciones de material genético. Cuando existe un rearrreglo balanceado, o sea que no hay material de más o de menos, pero su ubicación no es la correcta, los in-dividuos generalmente presentan fenotipo normal, aunque en al-gunas ocasiones, esto no ocurre.

Las aberraciones cromosómicas podemos clasificarlas en

FIGURA 7



dos grandes grupos, los cuales pueden afectar tanto autosomas como sexocromosomas:

- a) Alteraciones Numéricas, dentro de las cuales se agrupan todos aquellos cambios del número euploide, que en la especie humana es 46.
- b) Alteraciones Estructurales, como su nombre lo indica, corresponden a cambios en la estructura normal de cualquier par o pares cromosómicos.

a) Alteraciones Cromosómicas Numéricas:

Como se mencionó anteriormente, el número cromosómico normal en la especie humana es de 46, y corresponde al número diploide ($2n$). Los cambios en el número de ploidías, corresponden en el humano a alteraciones cromosómicas que son múltiplos del número haploide (n). Las únicas poliploidías que se han detectado son triploidías, sólo en productos de aborto. Las triploidías pueden provenir de una falla en la maduración, en la división de una célula germinal ya sea óvulo o espermatozoide y las tetraploidías surgen debido a un error en la citocinesis de la primera división de un cigoto.

Pueden existir cambios numéricos que no sean múltiplos del número haploide, como las trisomías que corresponderían a $2n+1$ y las monosomías, $2n-1$. En el primer caso se encuentran tres miembros de un cromosoma y en el segundo se encuentra sólo uno, en lugar del par normal. A estos cambios se les denomina aneuploidías y son las aberraciones cromosómicas más frecuentes.

La principal causa de las aneuploidías es la no disyunción en una división meiótica, aunque también puede ocurrir en mitosis, por falla en la separación y migración de cromosomas.

somas o cromátidas durante la anafase, lo cual da como resultado una distribución desigual de un par de homólogos, de manera que una célula hija tiene ambos cromosomas y la otra ninguno. Existe otro mecanismo, el rezago anafásico que también da como consecuencia aneuploidías y consiste en que uno de los miembros de un par que no hace sinapsis, no se mueve correctamente sobre las fibras del huso y lo alcanza la citocinesis sin haber arriado a ningún polo, de manera que queda al azar, más que por segregación, en una de las células hijas o bien se pierde, por esto el rezago anafásico puede dar como consecuencia una célula hija normal y una monosómica. (Figura 8).

b) Alteraciones Estructurales:

Las alteraciones que afectan la estructura de los cromosomas son el resultado de uno o varios rompimientos, seguidos de una reconstitución anormal. Los cambios en la estructura pueden ser estables, cuando pueden pasar a través de las divisiones celulares, e inestables, cuando no son capaces de mantenerse en la progenie celular.

Las aberraciones estructurales estables son las deleciones, duplicaciones, inversiones, translocaciones, inserciones e isocromosomas.

Delección: Es una pérdida de una porción de cromosoma, que se origina cuando hay una doble ruptura sobre un cromosoma, de manera que el fragmento intermedio se pierde y los dos extremos se reúnen; el cromosoma delecionado puede quedar tan solo más pequeño, o bien puede inclusive perder su morfo-

logía original; un metacéntrico puede volverse submetacéntrico o viceversa. El fragmento acéntrico resultante, generalmente se pierde.

Duplicación:

Es la presencia de un segmento extra, que corresponde exactamente a otro segmento adyacente de un cromosoma, generalmente se originan por entrecruzamientos desiguales. En este caso, los cromosomas también pueden perder su estructura original, si el segmento duplicado es muy grande.

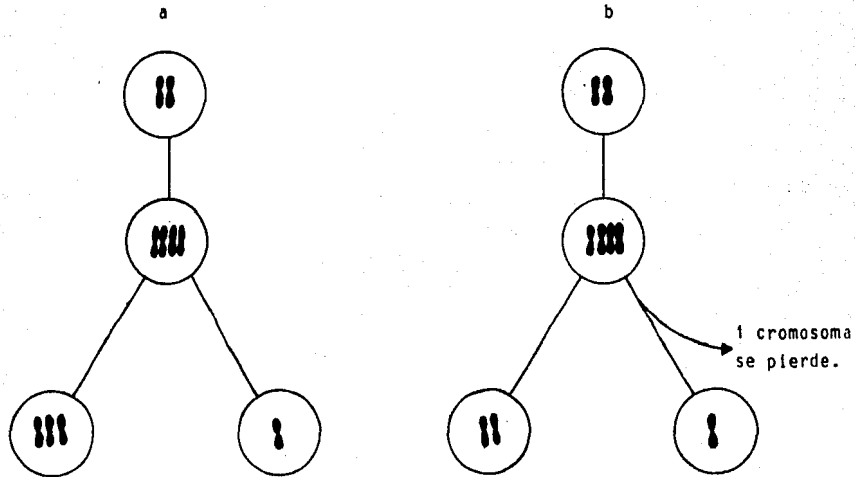
Inversión:

Ocurre cuando un cromosoma se rompe en dos sitios y el segmento intermedio gira 180 grados, de manera que al reunirse queda invertido. Cuando ambas rupturas se localizan sobre el mismo brazo, la morfología cromosómica no cambia y se les llama inversiones paracéntricas. En el caso de que las rupturas se encuentren una en brazo corto y la otra en brazo largo, el fragmento intermedio contiene el centrómero y si las rupturas no son equidistantes a él, en el momento de la inversión y reunión la morfología cromosómica cambia. A este tipo de aberración se le conoce como inversión pericéntrica.

Translocación:

Es cuando ocurren rupturas en dos cromosomas y se transfiere el segmento roto de uno al otro. En la mayor parte de los casos, cambia la morfología cromosómica. Existen dos tipos de translocaciones: Las translocaciones Robertsonianas, en las cuales los cromosomas involucrados son siempre acrocéntricos y las rupturas ocurren en la región pericentromérica, de manera que los brazos completos se intercambian y como resultado, se forma un cromosoma metacéntrico o submetacéntrico por la fusión de los dos brazos largos y un pequeño metacéntrico por la fusión de los dos brazos cortos; este último generalmente se pierde, sin

FIGURA 8
ORIGEN DE LAS ALTERACIONES NUMERICAS



a) No disyunción mitótica, b) rezago anafásico. Una vez duplicados los homólogos, durante la anafase, tres de ellos segregan a una sola célula y uno a la otra en la no disyunción. En el rezago anafásico, una célula puede quedar normal y una monosómica.

que tenga consecuencias fenotípicas ya que en los brazos p de los acrocéntricos humanos solo existen genes que codifican para ARN ribosomal.

El otro tipo de translocaciones se denominan Recíprocas, pueden ocurrir entre dos cromosomas cualquiera: En cada uno se produce una ruptura y simplemente los segmentos acéntricos se intercambian, dando origen a dos nuevos cromosomas.

Isocromosomas:

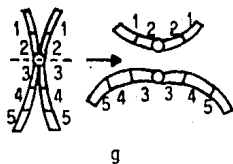
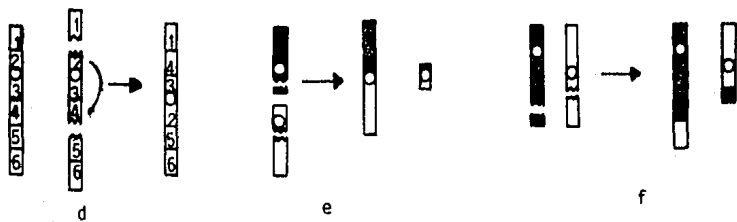
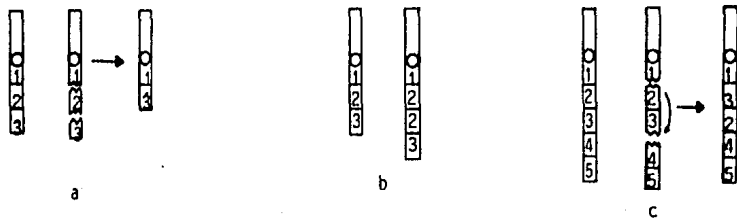
Un isocromosoma es un cromosoma que está formado por uno solo de los brazos del original, pero hacia ambos lados del centrómero (en espejo), de manera que existen isocromosomas de brazos cortos o bien de brazos largos. Se pueden formar por una falla en la división del centrómero, que en lugar de hacer lo longitudinalmente lo hace transversalmente, y se originan dos cromosomas metacéntricos iguales si provienen de un metacéntrico o de diferente tamaño si el original era submetacéntrico ó acrocéntrico. Otro mecanismo de formación de isocromosomas es por translocación entre homólogos, cuando los puntos de ruptura son pericentroméricos, en este último caso, se pueden formar isocromosomas dicéntricos (2n) (Figura 9).

III Alteraciones Cromosómicas y Ciclo Celular.

Aunque son pocas las referencias acerca de la interrelación que puede existir entre alteraciones cromosómicas y ciclo celular, en general podemos decir que se ha puesto mucha atención en tratar de entender el modo de acción en que las anomalías de este tipo, afectan el fenotipo. Parece claro que la falta o exceso de un cromosoma o parte de él puede trastornar el balance génico ya que faltan o sobran cientos de genes que podrían entorpecer la síntesis de proteínas, otros que podrían actuar como reguladores de funciones de genes estructurales o bien que podrían regular bloques de genes sobre los cromosomas,

FIGURA 9

ABERRACIONES ESTRUCTURALES



- a) Delección
- b) Duplicación
- c) Inversión paracéntrica
- d) Inversión pericéntrica
- e) Translocación Robertsoniana
- f) Translocación Recíproca
- g) Isocromosoma

cromosomas completos o funciones celulares como la división y el ciclo mitótico (30).

De los estudios pioneros que han tratado de dilucidar la acción de los desbalances cromosómicos sobre el CC, destaca el realizado por Kaback y Bernstein en 1970 (31), quienes estudiaron la cinética de proliferación en células con trisomía 21, por medio de la técnica de autorradiografía. Ellos encontraron que la fase de síntesis de ADN podría ser más lenta en estas células y por lo tanto el ciclo celular ser más largo. Posteriormente, Dutrillaux y Fose (32), en 1976 utilizaron la técnica de marcaje con bromodesoxiuridina en linfocitos de sangre periférica, y encontraron que el ciclo celular en células de trisómicos 21 era de 17 horas, más corto que el de los sujetos normales en los cuales determinaron que duraba 21 horas. Estos resultados fueron concordantes con los de Crossen y Morgan (33). Ellos utilizaron la misma técnica sin embargo su estudio no fué longitudinal con cosechas de linfocitos seriadas, sino transversal, haciendo una sola cosecha a 72 horas y determinaron el porcentaje de primeras, segundas y terceras divisiones. El análisis de la cinética proliferativa mostró que a las 72 horas de cultivo, el porcentaje de terceras divisiones en los cultivos de Síndrome de Down fué significativamente mayor que en los cultivos de células normales, por lo cual concluyeron que las células trisómicas o por lo menos una población de ellas, tenía un CC más corto que las normales.

Respecto al estudio del ciclo celular en otros padecimientos cromosómicos, Dutrillaux y Fose (32) utilizaron la misma técnica que para trisomía 21 y encontraron una duración normal en un sujeto con delección 5p, Síndrome de cri-du-chat, y aunque no determinaron el tiempo exacto de un mosaico 45,X/47,XY+13, se vió que la línea con trisomía 13 era más rápida que la 45,X.

Con respecto a este último padecimiento denominado Síndrome de Turner, Barlow en 1972 (41) estudió fibroblastos de piel de tres pacientes con mosaicos cromosómicos: $45,X/46,XX$; $45,X/46,Xi(Xq)$ y $45,X/47,XXX$. Se estudió la cinética de proliferación celular mediante marcaje con timidina tritiada en metafases acumuladas con colcemida. Aunque no se estableció la duración del CC, los resultados mostraron que la población $45,X$ en todos los casos, llevó a cabo ciclos celulares más cortos que la segunda línea en los tres mosaicos.

Sin embargo, más tarde Michalová y col. en 1977 (34) al estudiar también mosaicos $45,X/46,X;i(Xq)$ en cultivos cortos de linfocitos, encontraron que a las 72 horas, el porcentaje de metafases de primera, segunda y tercera división era muy similar entre las células $46,XX;45,X$ y $46,X,i(Xq)$, por lo cual concluyeron que no había una alteración significativa en la longitud del ciclo celular.

Finalmente, existe también evidencia de que los fibroblastos de pacientes con $45,X$ y con alteraciones estructurales del cromosoma X como $46,X,del(X)(p11)$; $46,X,del(X)(q13)$ y $46,X,del(X)(q22)$, presentan ciclos celulares prolongados respecto a las células normales (35).

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, aunque la información disponible es conflictiva, se puede inferir que es muy probable que los desbalances genéticos que se producen por anomalías cromosómicas, pueden afectar el tiempo del ciclo mitótico y las tasas de proliferación celular.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

IV OBJETIVO.

Determinar si el exceso ó la pérdida de material genético produce alteraciones en el tiempo total del CC.

V HIPOTESIS.

Si las anomalías cromosómicas causan alteración en la duración del CC, entonces los tiempos promedio para las células de los individuos normales será diferente que para aquellos citogenéticamente anormales.

Por otra parte, si la alteración cromosómica tiene un efecto específico, los tiempos promedio serán diferentes de acuerdo al tipo de alteración.

VI. METODOS.

1.- POBLACION DE ESTUDIO.

Se estudió un grupo de 7 niños sanos, con cariotipo 46,XX ó 46,XY, normal, que accedieron voluntariamente a cooperar con el estudio.

Dentro de los individuos cromosómicamente anormales, se estudiaron los siguientes grupos:

Pacientes con material cromosómico eucromático extra: Síndrome de Down; En este grupo se incluyeron 7 pacientes con cariotipo 47,XX+21 ó 47,XY+21.

Pacientes con falta de material eucromático: Síndrome de Cri-du-Chat; Se incluyeron en este grupo 7 pacientes cuyo cariotipo 46,XX ó 46,XY, mostraba una delección de brazos cortos del cromosoma 5.

Pacientes con exceso de material heterocromático: Síndrome de Klinefelter; Se estudiaron 7 pacientes del sexo masculino con un cromosoma X extra.

Pacientes con falta de material heterocromático: Síndrome de Turner; Se estudiaron 7 pacientes del sexo femenino, con mosomía X completa.

El número de individuos incluidos en cada grupo de estudio, se determinó de acuerdo al número máximo de pacientes que se pudieron recopilar en el grupo de Síndrome de Cri-du-Chat, que tiene la más baja frecuencia de aparición en la población mundial.

A todos los individuos estudiados se les determinó previamente su cariotipo (Tabla I) y el intervalo de edades para los

TABLA 1

GRUPOS DE ESTUDIO

GRUPOS	FORMULA CROMOSOMICA
NORMALES	46,XX y 46,XY
SINDROME DE DOWN	47,XX+21 y 47,XY+21
SINDROME DE CRI-DU-CHAT	46,XX,del(5p) y 46,XY,del(5p)
SINDROME DE KLINEFELTER	47,XXY
SINDROME DE TURNER	45,X

normales fué de 8 a 14 años y para los anormales de 1 a 15 años.

2.- CARACTERISTICAS DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO.

a) Cuadro Clínico del Síndrome de Down. (36, 40)

El Síndrome de Down o trisomía 21 fué descrito desde 1866 por J. Langdon Down, sin embargo la alteración cromosómica característica se descubrió hasta 1959 por Lejeune y cols. Es la alteración citogenética más frecuente, se observa en 1 de cada 700 nacidos vivos en el mundo.

El fenotipo incluye: braquicefalia, con un occipucio aplastado, ojos con pliegues epicánticos, fisuras palpebrales oblicuas hacia arriba, alrededor del iris se pueden observar puntos de hiperpigmentación sobre todo si los ojos son claros; puente nasal aplanado, lengua gruesa y protruyente, las orejas son pequeñas, con un desarrollo anormal de la hélice. Generalmente el abdomen está distendido y presentan una pelvis estrecha, las manos son cortas y anchas, generalmente con pliegue simiano y clinodactilia del 5º dedo, los pies son anchos, pueden presentar malformaciones cardíacas, digestivas y óseas.

Cursan con retraso mental, con IQ variable, 50 en promedio con un intervalo muy amplio: desde aquellos que presentan IQ de 70, 80 hasta los que tienen prácticamente una vida vegetativa.

La citogenética de estos pacientes revela que el 92.5% de los casos son trisomía 21 regular, tienen 47 cromosomas, con un 21 extra. El 4.8% son trisomías 21 por translocación, presentan 46 cromosomas, con un cromosoma 21 casi completo - translocado a otro cromosoma generalmente acrocéntrico. Por último, el 2.7% de todos los casos son trisomía 21 en mosaico, con una línea celular con 47 cromosomas y otra generalmente normal.

b) Cuadro Clínico del Síndrome de Cri-du-chat.(36-40)

Este síndrome consiste en la delección del brazo corto del cromosoma 5. Se describió originalmente por Lejeune en 1963 y a la fecha hay más de 330 casos reportados. La frecuencia de la enfermedad no está bien establecida, pero se calcula ser del orden de 1 en 50,000 nacidos vivos en el mundo.

El fenotipo incluye: microcefalia, hipertelorismo, fisuras palpebrales antimongoloides, epicanto, pabellones auriculares - de implantación baja y micrognatia. Presentan una faringe hipoplásica o "indiferenciada", por lo cual el llanto de estos - pacientes es monótono y agudo, y semeja el maullido de un gato. Esta característica es distintiva y en muchas ocasiones es lo que permite establecer el diagnóstico. Pueden tener malformaciones a nivel de cerebro, ojos, corazón y riñón, así como diversas malformaciones esqueléticas. Cursan con severo retraso mental, generalmente con un IQ menor de 20, hipotonía y retraso en el crecimiento.

Aunque estos pacientes pueden alcanzar la edad adulta, su desarrollo es completamente anormal y debido al profundo retraso mental en algunas ocasiones ni siquiera llegan a caminar, sino que permanecen postrados en posición fetal.

c) Cuadro Clínico del Síndrome de Klinefelter. (36,40)

Este Síndrome fué descrito en 1942 por Klinefelter y col. y la alteración cromosómica se descubrió en 1959 por Jacobs y Strong; es una alteración numérica de los sexocromosomas. El cariotipo más frecuente es 47,XXY. La frecuencia de este padecimiento es de 1 en 800 nacidos vivos en el mundo.

El fenotipo incluye después de la pubertad: testículos pequeños, blandos y generalmente insensibles a la presión. El pene y el escroto son normales. El 20% de los casos puede presentar ginecomastia, tienen características sexuales secundarias desarrolladas muy pobremente. En muchas ocasiones los pa

cientes presentan talla alta y fenotipo eunucoide. Una gran parte de pacientes con este Síndrome tienen un fenotipo completamente normal y aún pueden ser bajos de estatura, por lo cual el diagnóstico se hace en general por esterilidad.

Por las características antes mencionadas es evidente que es muy raro que se haga el diagnóstico antes de la pubertad, a menos que presenten algunas malformaciones como hipospadias ó hipoplasia de pene, lo cual casi no se presenta en el síndrome.

Generalmente son hombres de inteligencia normal, aunque se pueden encontrar cierto número con debilidad mental o desórdenes psiquiátricos.

Todos los casos con Síndrome de Klinefelter presentan sexocromatina positiva. Los estudios citogenéticos han demostrado en 80% de los casos un cariotipo 47,XXY pero en 20% de ellos existen variantes, ya sean mosaicismos con otra línea XY, XX, XO o bien con más de un cromosoma X supernumerario (XXXY ó XXXXY). Cuando existen más X, es más severo el hipogonadismo y hay retraso mental.

d) Cuadro Clínico del Síndrome de Turner. (36-40)

Se describió por primera vez en 1938 por Turner. Ford en 1959, demostró que existía una monosomía X, esta fué la primera observación de alteración de los sexocromosomas. La frecuencia de esta enfermedad es de 1 en 2500 mujeres nacidas vivas.

El fenotipo de este padecimiento incluye: implantación - baja del pelo, cara triangular, fisuras palpebrales antimongoloides y pueden tener epicanto y ptosis. La boca puede estar en forma de carpa y el paladar en algunos casos es alto. Existe hipoplasia de la mandíbula y retrognatia. Los pabellones auriculares son de implantación baja. El cuello es corto y presenta piel redundante, torax ancho con hipertelorismo de

tetillas. En extremidades se observa cubitus valgus y acortamiento del 4º y 5º metacarpiano. En miembros inferiores se observa tibia vara y cuando son muy pequeñas se encuentra linfedema a nivel de manos y pies.

La presencia de nevos en diversas partes del cuerpo es muy común y frecuentemente se encuentran uñas hipoplásicas. Haciendo un estudio de dermatoglifos, se encuentra una cuenta total de crestas aumentada. Pueden cursar con malformaciones cardiovasculares y renales.

En la pubertad, los pacientes cursan con dos alteraciones muy importantes, una es la talla baja que generalmente se encuentra 3 a 4 desviaciones estandar por abajo de lo normal, y la otra es el infantilismo sexual, el cual se acompaña de órganos sexuales internos anormales; Las gónadas son estrías de tejido conectivo que recuerdan el estroma ovárico. En la vida fetal pueden existir folículos, pero no posnatalmente. Se presenta pelo púbico y axilar muy escaso y usualmente amenorrea primaria. Por todas estas alteraciones, las pacientes no son fértiles.

Estos casos tienen generalmente una inteligencia normal. Es sorprendente el hecho de que a pesar de que este es un Síndrome relativamente benigno, prenatalmente sea tan severo que se calcula que de cada 40 cigotos con cariotipo 45,X , 39 se abortan durante el pimer trimestre de gestación.

Cuando se hace estudio de sexocromatina, la mayoría de estas pacientes no presentan corpúsculo de Barr. El estudio citogenético revela en un 55% un cariotipo con sólo 45 cromosomas, con un solo cromosoma X. El 45% restante pueden presentar sexocromatina positiva y el fenotipo de Síndrome de Turner, aunque su cariotipo no es 45X: Existe aproximadamente un 15% de mosaicos con una línea normal 6 anormal, 20% presen-

tan isocromosoma de brazos largos del cromosoma X y 10% son deleciones del brazo corto de uno de los dos X. (35,39)

3.- Método de estudio:

De cada uno de los individuos se obtuvo muestra de sangre periférica heparinizada.

a) Siembra.

Se prepararon cultivos de linfocitos, compuestos de - 4.5 ml. de medio MCOY 5a (modificado), 0.25 ml de fitohema glutinina, 0.02 ml de antibiótico (penicilina-estreptomicina) y 0.4 ml de sangre heparinizada. Se incubaron en una estufa a 37°C. La cosecha se realizó cada 6 horas durante el intervalo de tiempo comprendiendo entre las 36 y las 78 horas de incubación.

b) Cosecha.

Se agregó colchicina a una concentración final de 0.50 µg/ml a cada cultivo una hora antes de procesarlo. Una vez transcurrido este tiempo, se centrifugó en tubos de ensaye durante 10 min a 56.5g. Se desechó el sobrenadante y a cada botón celular se le agregaron 5 ml de solución hipotónica KCL 0.75M, la cual se dejó actuar durante 15 minutos a 37°C.

Posteriormente se centrifugaron y nuevamente se desechó el sobrenadante. Las células se fijaron con metanol: ácido acético 3:1 durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Para quitar todos los restos celulares y dejar limpio el botón, se hicieron varios cambios de fijador, hasta que quedó un sobrenadante transparente y un paquete celular blanco.

c) Preparación de Laminillas.

El paquete celular se resuspendió en 0.5 ml de fijador y se goteó sobre portaobjetos fríos; inmediatamente después se secaron a la flama.

Las laminillas se tiñeron con Hoechst 33258 a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ de agua, durante 40 minutos. Se montaron en buffer de Sørensen pH 6.8 y se mantuvieron en la oscuridad hasta que se examinaron.

d) Observaciones y mediciones.

Para cada tiempo de cosecha, en un fotomicroscopio - Zeiss Fomi III, con epifluorescencia, lámpara HB-200, se analizaron 100 metafases consecutivas y se clasificaron como células de primer ciclo de replicación aquellas en que ambas cromátides fluorescían intensamente; como de segundo ciclo, las que presentaron cromosomas con una cromátida brillante y otra opaca y como de tercer o subsecuente ciclo aquellas con una cuarta parte o menos de todas sus cromátidas con fluorescencia intensa y el resto con fluorescencia pálida.

De acuerdo con estos patrones de fluorescencia, se calculó la proporción de células en primera, segunda y tercera ó subsecuentes divisiones, para cada tiempo de cosecha.

Para calcular el tiempo de duración del ciclo mitótico, se tomaron en cuenta las mitosis de segunda y tercera división. Para cada individuo se graficó el porcentaje de células en cada división vs el tiempo de cosecha.

Sobre las gráficas, se midió el intervalo de tiempo comprendido entre el momento en que el 50% de las células están en 2ª división y el momento en que el 50% están en 3ª división. Este valor se considera el tiempo total de duración del CC (Figura 6) (32). Los resultados se analizaron por medio de la prueba del análisis de varianza y la prueba de Tukey (37).

VII RESULTADOS.

Como se puede observar en el cuadro No 1 y en las gráficas 1a5, la cinética celular es muy similar en los cinco grupos de estudio: Entre las 36 y 42 horas, la mayoría de las células se encontraron en primer ciclo, entre las 54 y las 60 horas la mayor parte había llevado a cabo dos divisiones y a las 72 horas, tres o más. Estos resultados concuerdan con los de otros autores que han utilizado un método similar (32, 38, 39).

Siguiendo el procedimiento descrito por Dutrillaux y Fose (32) para determinar la duración del CC, se encontraron los valores que se presentan en el cuadro No. 2, para cada individuo. Los tiempos de generación promedio fueron de 13,6 h para individuos normales, 13.6 h para Síndrome de Down, 14.8 h para Síndrome de Cri-du-chat, 13.4 h para Síndrome de Klinefelter y 10.2 h para Síndrome de Turner. El análisis de varianza mostró que uno de los grupos era diferente y con la prueba de Tukey se encontró que las pacientes 45,X son las que presentan un tiempo de generación significativamente menor, con una $p < 0.01$.

En la gráfica No 6, se muestra la comparación entre la cinética de replicación del grupo de individuos normales con la de Síndrome de Turner y se observa que las gráficas son muy parecidas, pero existe un desplazamiento en tiempo, de manera que las curvas de primero, segundo y tercer ciclo aparecen primero en Síndrome de Turner, lo cual indica que desde la primera división se encuentra el acortamiento del CC.

VIII DISCUSION.

Como ya se ha mencionado, los resultados de los estudios de duración del CC, son variables. Las razones para explicar esta amplia variación, podrían ser diferencias en las condiciones de laboratorio, en el método para calcular el tiempo del CC o bien diferencias en medios y nutrientes. De hecho, cuando se utiliza el mismo método los resultados son similares.

En nuestro estudio, encontramos un tiempo de generación aproximado de 13 horas para linfocitos normales, lo cual es comparable con los tiempos descritos por otros autores que utilizan un método similar (38, 39), y con los que se han calculado a partir de cinematografía espaciada (41).

En relación con nuestros hallazgos en pacientes con trisomía 21, estos difieren de los Kaback y Bernstein (31), quienes encontraron un CC más largo en fibroblastos con trisomía 21, comparado con normales. De la misma manera, difieren de los resultados de Dutrillaux y Fose CC (32) y de los de Crossen y Morgan (33), quienes obtienen un CC más corto que en linfocitos normales.

Para explicar esto debe hacerse notar que los estudios realizados por Kaback y Bernstein (31), fueron transversales, así como los de Crossen y Morgan (33), quienes midieron la proporción de primeras, segundas y terceras divisiones en metafases de 72 horas.

Consideramos que este método en el cual solo se toma en cuenta un tiempo de cosecha, no es apreciable a cultivos de linfocitos estimulados con fitohemaglutinina, puesto que no toma en cuenta la gran variabilidad que puede ocasionar el período "Lag" y por lo tanto sus resultados no son comparables con los nuestros.

Es más difícil, sin embargo, explicar la diferencia con los hallazgos de Dutrillaux y Fose (32) ya que el método es muy similar en ambos casos.

En cuanto al CC en linfocitos de individuos con Síndrome de Cri-du-chat, nuestros resultados muestran un ciclo mitótico ligeramente más largo que los normales, sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa, lo cual está de acuerdo con el único caso descrito en la Literatura por Dutrillaux y Fose (32), quienes tampoco encuentran diferencia.

Respecto a las células de pacientes con Síndrome de Klinefelter y con Síndrome de Turner, en donde existe una carga heterocromática extra en los primeros e incompleta en los segundos, se encontró que no hubo diferencia entre Klinefelter y normales, mientras que en Síndrome de Turner, la duración del CC está disminuida en un 25% con respecto a la de los normales.

Estos resultados están de acuerdo con los encontrados por Balow (42), quien estudió fibroblastos de pacientes con mosaicos de cromosomas sexuales y encontró que las células 45,X tenían un ciclo más rápido que la segunda población celular con 2 o 3 cromosomas X. En contraste con esto, Michalová y col (34), no encontraron una alteración significativa en la longitud del CC en células 45,X comparado con 45X,i(Xq); Esta autora sin embargo, estudia la proporción de metafases en primera, segunda y tercera división a las 72 horas de cultivo y como se mencionó anteriormente, no pensamos que con este método se obtengan resultados concluyentes. Por otra parte, Simpson y col (35), quienes estudiaron por medio del método de mitosis marcadas células 45,X, 46,X del (Xp) y 46,XX, encontraron un tiempo de CC más largo para las células anormales de ambos tipos, lo cual no concuerda con nuestros resultados, aunque también refieren un CC alterado en Síndrome de Turner.

En nuestro estudio, las células de cada grupo de individuos tienen una constitución cromosómica diferente: En células trisómicas 21 y en monosómicas 5p, el material extra o deficiente es eucromatina principalmente y la duración de su CC no difiere del de células normales. Por otra parte, tenemos los grupos de Síndrome de Klinefelter y Turner, en los que el material involucrado es la heterocromatina y encontramos que las células 45,X muestran un ciclo significativamente más corto que los otros grupos, de manera que es posible que la falta de la heterocromatina del segundo X de las mujeres o del Y de los hombres, pueda estar relacionada con el comportamiento mitótico de estas células. Al respecto, existe evidencia en plantas, de que la heterocromatina extra causa un retraso en la tasa de división celular: Cuando existen cromosomas B heterocromáticos supernumerarios, existe un retraso en el CC probablemente debido a una prolongación de G_1 (43).

En humano, existe evidencia indirecta de que la heterocromatina juega un papel importante en la duración del CC: En los dermatoglifos, la cuenta total de crestas dérmicas disminuye conforme aumenta el número de cromosomas X. Esto podría implicar la disminución en la proliferación y movimiento celular en el área de las yemas de los dedos, lo cual daría como resultado un menor número de papilas dérmicas y por lo tanto de crestas (44).

Al respecto es interesante hacer notar, que las pacientes con Síndrome de Turner tienen una cuenta total de crestas dérmicas incrementada (45).

A pesar de estos antecedentes, en nuestro estudio no se observó un alargamiento del CC en los pacientes con Síndrome de Klinefelter. A este respecto, aunque la presencia del cromosoma Y es suficiente para tener un CC normal y no hay diferencia entre hombres y mujeres, existe la posibilidad de que la carga heterocromática extra en 47,XXY pueda no ser suficiente para darnos una diferencia observable con nuestro método, de

manera que para apoyar el papel de la heterocromatina sobre el CC, es necesario estudiar pacientes con polisomías del X.

Por otra parte, es posible que la ausencia del segundo cromosoma X o del Y, ambos altamente heterocromáticos, juegue un papel importante en la duración del CC, tanto cuantitativa, como cualitativamente. Cuantitativamente, porque como se mencionó anteriormente, si la carga heterocromática extra puede alargar el CC, es probable que su ausencia lo acorte. Cualitativamente, porque a pesar de ser cromosomas heterocromáticos, el Y tiene genes muy importantes para el desarrollo normal y el X no se inactiva totalmente, además de que durante la embriogénesis muy temprana ambos X están activos.

Es difícil relacionar los datos que se encontraron a nivel celular, con la fisiología y la clínica de los pacientes con Síndrome de Turner, sin embargo, llaman la atención varias observaciones: 1º alta mortalidad prenatal de los embriones 45,X, que es de 39 de cada 40 concepciones (40). Es particularmente interesante que a pesar de que es clínicamente indistinguible el Síndrome de Turner 46,Xi(Xq) y 45,X; los cariotipos más frecuentes en abortos espontáneos, son indudablemente los 45,X: Hook et al (46), encontraron una relación 45,X: 46,Xi(Xq) de 112:0, lo cual hace una absoluta diferencia entre ambos genotipos de Síndrome de Turner correlacionada con su viabilidad intrauterina. Esto sugiere fuertemente, que existe un defecto feto-protector, con más de una dosis en algún locus o loci de los brazos largos del cromosoma X, o una sola dosis en presencia de un Y. 2º La mortalidad prenatal es relativamente temprana entre las 10 a 15 semanas de gestación, con un pico a las 13 semanas, y una observación interesante es que en una serie de 54 abortos 45,X, sólo 4 de ellos presentaban un feto con características típicas de Síndrome de Turner, como linfedema e higroma quístico; los 50 restantes, o no tenían un embrión propiamente dicho, o contenían un embrión con un patrón

de desarrollo desorganizado (46). 3º Es evidente que cuando las concepciones 45,X llegan a nacer, a pesar de que son monosómicas para todo un cromosoma, como se puede observar en la descripción clínica del Síndrome de Turner, las alteraciones a nivel fenotípico son tan leves, que pueden llevar una vida casi normal y su morbilidad y mortalidad es muy baja, comparada con su alta letalidad in utero (30).

Como se mencionó antes, no se pueden correlacionar directamente los hallazgos del presente trabajo con la interferencia en el desarrollo de los embriones 45,X, ni con las alteraciones fenotípicas de los nacidos vivos, sin embargo, la incapacidad para dividirse a una tasa normal parece una teoría atractiva para explicar los efectos adversos del complemento 45,X, aunque por supuesto podrían existir diversos mecanismos patogénicos que asociados a la alteración del CC den como consecuencia las anormalidades que se encuentran en esta entidad. De mayor interés biológico, sin embargo, serían las implicaciones colaterales no estrictamente relacionadas con el Síndrome de Turner, sino con la relevancia que muy probablemente tenga el cromosoma X sobre el control de la proliferación celular.

Finalmente, se debe hacer notar, que para obtener mayor información sobre el tema, es necesario hacer estudios de CC en individuos con polisomías X, así como en isocromosomas de brazos largos del X y por supuesto en productos de aborto 45,X.

IX. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Prescott, D.M. Reproduction of the eukaryotic cells. New York, Academic Press, 1976.
- 2.- Whitson, G.L. Nuclear-Cytoplasmic Interactions in the cell cycle. New York, Academic Press, 1980.
- 3.- Potten, C.S. Cell cycles in cell hierarchies. Int. J. radiat. Biol., 49:257-78. 1986.
- 4.- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J.D. Molecular Biology of the cell. New York, Garland Publishing Inc., 1983.
- 5.- Darnell, J., Lodish, H. y Baltimore, D. Molecular Cell Biology. New York, Scientific American books Inc., 1986.
- 6.- Mazia, D. The Cell Cycle. Sci. Am., 229:55, 1974.
- 7.- Baserga, R. The Biology of the Cell Reproduction Massachusetts, Harvard University Press, 1985.
- 8.- Rittling, s.r., Brooks, K.M., Cristofalo, V.J. y Baserga, R. Expression of cell cycle-dependent genes in young and senescent WI-38 fibroblasts. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 83:3316-20, 1986.
- 9.- Czerniak, B., Herz, F., Wersto, R.P. y Koss, L.G. Expression of Ha-ras Oncogene p21 protein in relation to the cell cycle of cultured human tumor cells. Am.J.Pathol., 126:411-16, 1987.

- 10.- Lacy, J., Sarkay, Sauweyen, N. y Summers, William C.
Induction of C-myc expression in Human B Lymphocytes
by B-cell growth factor and anti-inmunoglobulin.
Proc. Nat. Acad. Sci, USA 83:1458-62, 1986.
- 11.- Black, A., Freeman, J.W., Zhou, G., y Busch, H.
Novel Cell Cycle related nuclear proteins founded in
rat and Human cells with monoclonal antibodies.
Cancer Res. 47:3266-72, 1987.
- 12.- Yagita, H., Masuko, T., Takahashi, N. y Hashimoto
Yoshiyuki. Monoclonal antibodies that inhibit
activation and proliferation of lymphocytes.
J. Immunol. 136:2055-61, 1986.
- 13.- Epifanova, O.I. y Polunovsky J.A. Cell cycle controls
in Higher Eukaryotic cells: Resting state or a
prolonged G. Period? J. Theor. Biol., 120:467-477, 1986.
- 14.- Fainsod, A., Diamond, G., Marcus, M. y Ruddle, F.
Cloning of a Human S-phase cell cycle gene: Use of
transient expression for screening. Mol. Cell. Biol.
7:775-79, 1987.
- 15.- Dai, Y., Yu, Y. y Chen, X. The cell cycle dependent
and the DNA-damaging agent-induced changes of cellular
NAD content and their significance. Mutat. Res.
191:29-35, 1987.
- 16.- D'incalci, M., Alavena, P., Wu R.S. y Bonner, W.
H1 variant synthesis in proliferating and quiescent
human cells. Eur. J. Biochem. 154:273-79, 1986.

- 17.- Sterner, R., Boffa, L.C., Chen, T.A. y Allfrey, V.G. Cell cycle dependent changes in conformation and composition of nucleosomes containing human histone gene sequences. Nucl. Acid. Res. 15:4375-91, 1987.
- 18.- Yagita, H., Masuko, T. y Hashimoto, Y. Inhibition of tumor cell growth in vitro by Murine Monoclonal Antibodies that Recognize a proliferation-associated cell surface antigen system in rats and humans. Cancer Res. 46:1478-84, 1986.
- 19.- Steel, C.G. Autoradiographic analysis of the cell cycle: Howard and Pelc to the present day. Int. J. Radiat. Biol., 49:227-35, 1986.
- 20.- Howard, A. y Pelc, S.R: Synthesis of desoxiribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. Heredity, London (suppl.), 6:261-273, 1953.
- 21.- Latt, S.A., George, Y y Gray, J.W. Flow cytometric analysis of bromodeoxyuridine substituted cells stained with 33258 Hoechst. J. Histochem. Cytochem., 25:927,1977.
- 22.- Gray, J.W., Dolbeare, F., Pallavicini, M.G., Beisker, W. y Waldman, F. Cell cycle analysis using flow cytometry. Int. J. Radiat. Biol. 49:237-55, 1986.
- 23.- Perry, P. y Wolff, S. New Giemsa method for differential staining of sister chromatids. Nature 251:156-58, 1974.
- 24.- Crossen, P.E. y Morgan, W.F. Analysis of human lymphocyte cell cycle time in culture measured by sister chromatid differential staining. Exp. Cell. Res. 104:453-57, 1977.

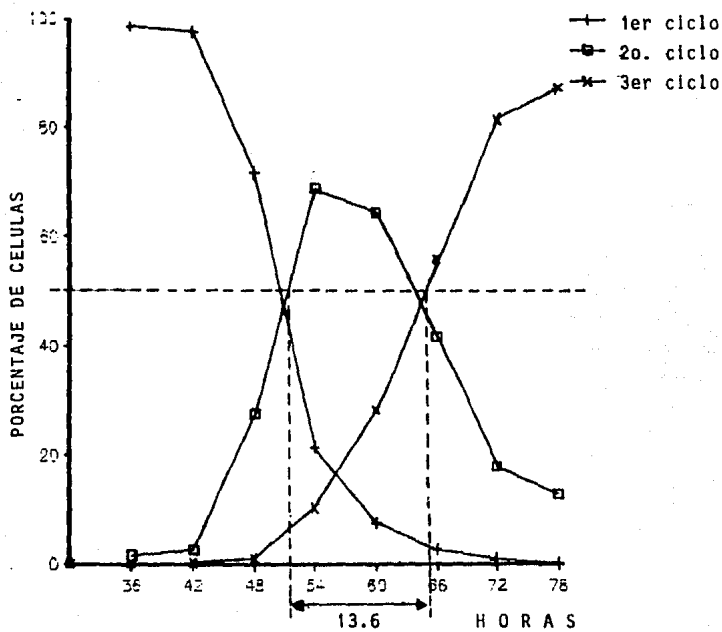
- 25.- Egolina, N.A. y Zakharov, A.F., Replication time of human chromosomes studied with the aid of 5-Bromodeoxyuridine. Exp. Genet. s/n: 95-97, 1976.
- 26.- Craig-Holmes, A.P. y Shaw, M.W. Cell cycle analysis in asynchronous cultures using the BUdR-Hoechst technique. Exp. Cell Res. 99:79-87, 1976
- 27.- Tice, R.R. Rary, J. y Schneider, F.I.
The utilization of Bromodeoxy uridine incorporation into DNA for the analysis of cellular kinetics.
Exp. Cell. Res. 102:232-36, 1976.
- 28.- Pincu, M., Kimme-Smith y Norman, A.
A modified harlequin stain for cell kinetics.
Cell tissue Kinet., 19:275-87, 1986.
- 29.- Thompson, J.S. y Thompson, M.W. Genetics in Medicine. Philadelphia, W.B. Saunders Co., 1980.
- 30.- Nora, J.J. y Fraser, F.C. Genética Médica. México, La Prensa Médica Mexicana, 1980.
- 31.- Kaback M. M., y Bernstein, L.H. Biologic studies of trisomic cells growing in vitro. Ann. N. Y. Acad. Sci. 171:526-536, 1970.
- 32.- Dutrillaux, B. y Fosse, A.M. Utilization de BrdU dans L'etude du cycle cellulaire de sujets normaux et anormaux. Ann. Genet., 19:95-102, 1976.
- 33.- Crossen, P.E. y Morgan, W.F. Lymphocyte Proliferation in Down's syndrome measured by sister chromatid differential staining. Hum. Genet., 53:311-313, 1980.

- 34.- Michalová, K., Malková, J. y Urban, J. Cell Division and sister chromatid exchanges in 45,X/46,X,i(Xq) mosaicism. Hum. Genet. 39:87-90, 1977.
- 35.- Simpson J.L., Lebeav, M.M. Gonadal and statural determinants on the X chromosome and their relationship to in vitro studies showing prolonged cell cycles in 45,X;46,X del(X)(p11), 46,X, del(X)(q13) and 46,X,del(X)(q22) fibroblasts. Am.J. Obstet. Gynec. 141:930-38, 1981.
- 36.- De Grouchy, J. y Turleau, C. Clinical atlas of Human Chromosomes. New York, John Wiley & Sons., 1984.
- 37.- Cañedo L., García -Romero, H., Mendez I. Principios de Investigación Médica. México, Editorial DIF, 1977.
- 38.- Tice, R.R., Schneider, E.L., Kramm, D. y Therne, P. Cytokinetic analysis of the impaired proliferative response of peripheral lymphocytes from aged humans to phytohemagglutinin. J. Exp. Med., 149:1029-41, 1979.
- 39.- Mutchinick, O., Ruz, L. y Casas, L. The effect of various culture media and of fetal calf serum in human lymphocyte cultures. Mutat. Res. 72:127-34, 1980.
- 40.- Goodman, R.M. y Gorlin, R.J. The malformed infant and child. New York, Oxford University Press, 1983.
- 41.- Collyn-d'Hooghe, M., Valleron, A.J. y Malaise, E.P. Time-Lapse cinematography studies of cell cycle and mitosis duration. Exp. Cell. Res. 106:405-07, 1977.
- 42.- Barlow, P.W. Differential cell division in human X chromosome mosaics. Humangenetik, 14:122-27, 1972.

- 43.- Ayonoadu, U.W. y Rees, H. The regulation of mitosis by B-chromosomes in rye. *Exp. Cell Res.*, 52:284-90, 1968.
- 44.- Mittwoch, U. Mongolism and Sex: A common problem of cell proliferation? *J. Med. Genet.* 9:92-95, 1971.
- 45.- Polani, P.e. Growing Points in cell Pathology. *Proc. Roy. Soc. Med.* 63:25-28, 1970.
- 46.- Hook, E.B. y Warburton, D. The distribution of chromosomal genotypes associated with turner's syndrome: Livebirth prevalence rated and evidence for diminished fetal mortality and severity in genotypes associated with structural X abnormalities or mosaicism. *Hum. Genet.* 64:24-27, 1983.

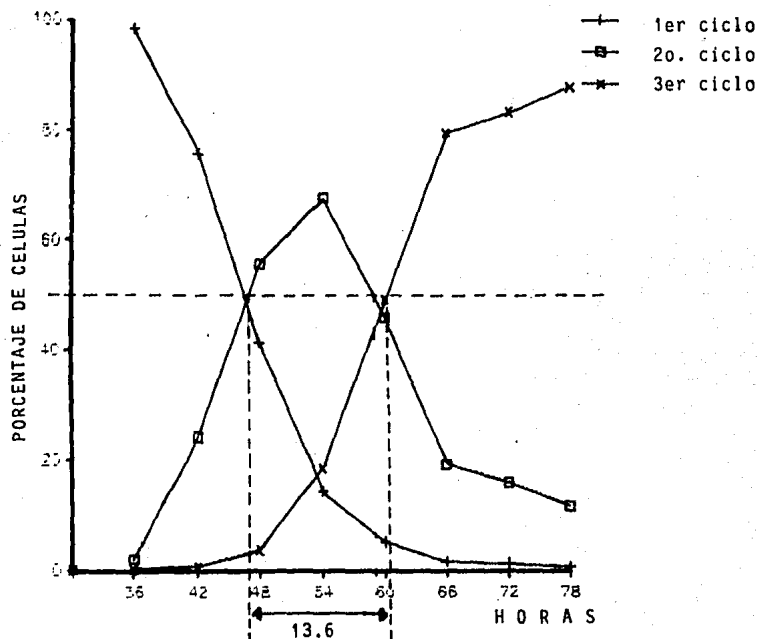
GRAFICA 1

VALORES PROMEDIO PARA INDIVIDUOS NORMALES



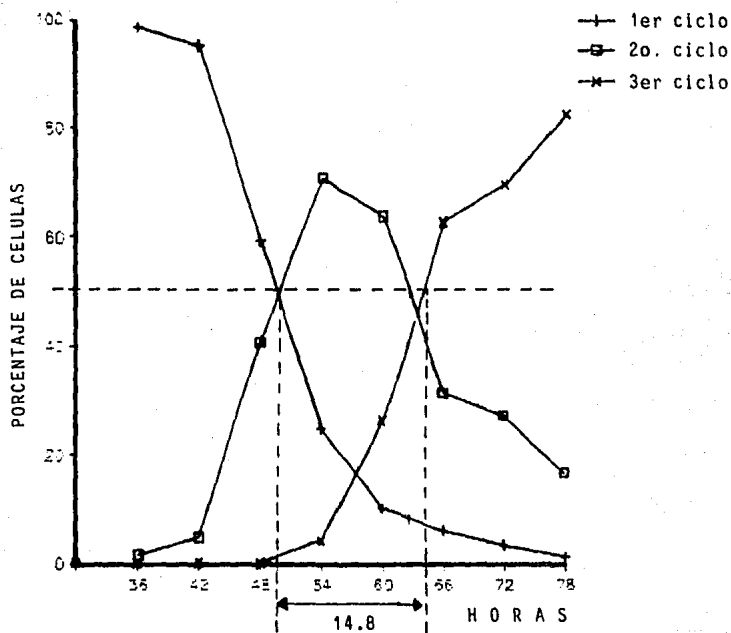
GRAFICA 2

VALORES PROMEDIO PARA SINDROME DE DOWN



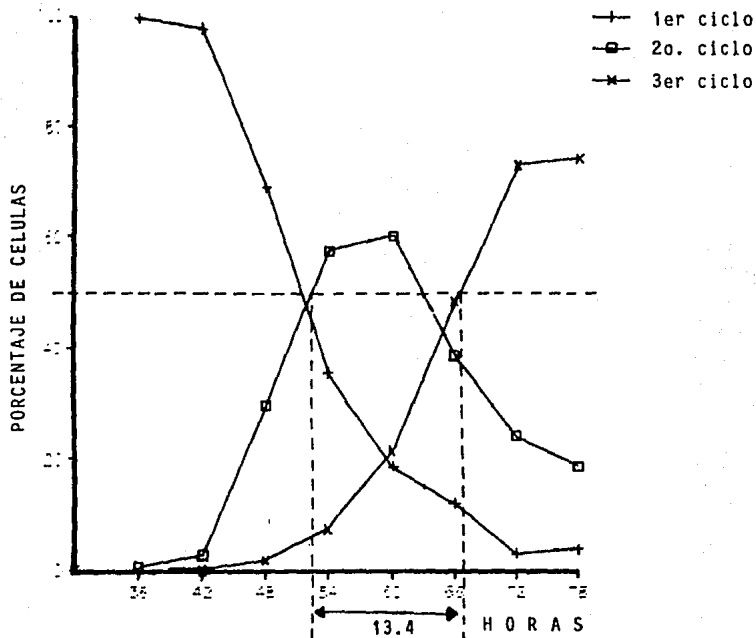
GRAFICA. 3

VALORES PROMEDIO PARA SINDROME DE CRI DU CHAT



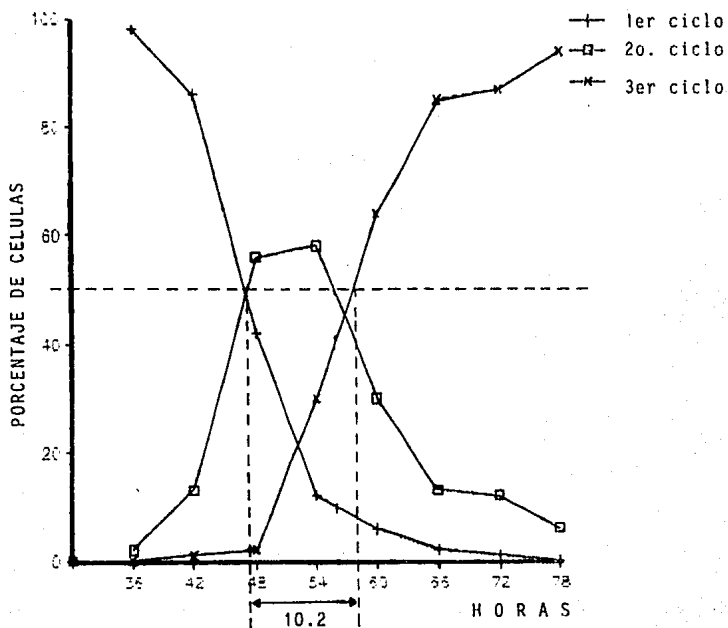
GRAFICA 4

VALORES PROMEDIO PARA SINDROME DE KLINEFELTER

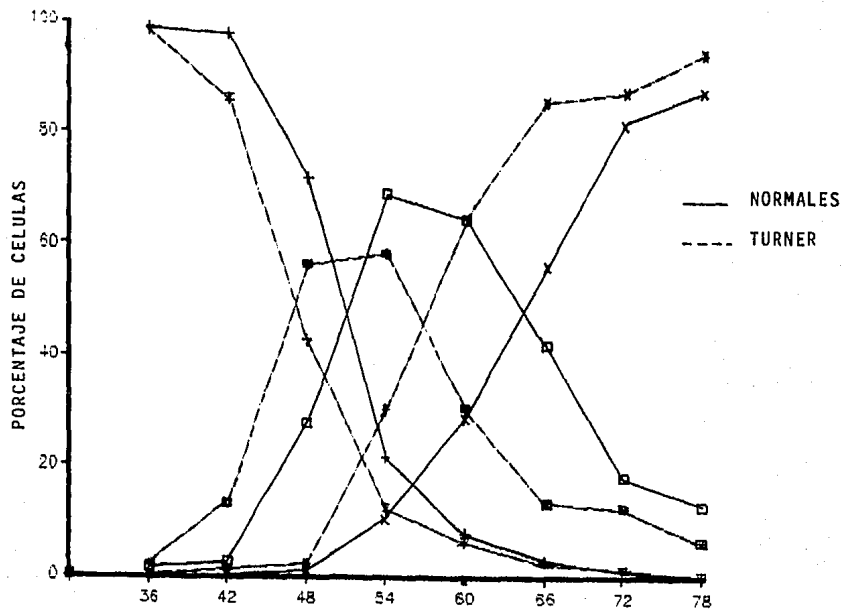


GRAFICA 5

VALORES PROMEDIO PARA SINDROME DE TURNER



GRAFICA 6
 COMPARACION DE LA CINETICA CELULAR ENTRE INDIVIDUOS NORMALES Y S. DE TURNER.



CUADRO No. 1

CINETICA DE PROLIFERACION CELULAR EN INDIVIDUOS CON ALTERACIONES CROMOSOMICAS.

TIEMPO (hs)	INDIVIDUOS NORMALES			SINDROME DE DOWN			SINDROME DE CRI DU CHAT			SINDROME DE TURNER			SINDROME DE KLINEFELTER		
	CICLO DE REPLICACION			CICLO DE REPLICACION			CICLO DE REPLICACION			CICLO DE REPLICACION			CICLO DE REPLICACION		
	1o.	2o.	3o.	1o.	2o.	3o.	1o.	2o.	3o.	1o.	2o.	3o.	1o.	2o.	3o.
36	98.5	1.4	0	98.1	1.8	0	98.5	1.4	0	97.6	2.3	0.1	99.5	0.5	0
42	97.5	2.4	0	75.5	24.0	0.4	95.2	4.7	0	86.0	13.2	0.7	97.5	2.6	0.1
48	71.7	27.4	0.8	41.0	55.5	3.4	59.1	40.7	0	41.7	56.4	1.8	68.8	29.5	1.7
54	21.2	68.7	10.0	14.1	67.5	18.2	25.0	70.8	4.1	12.1	58.0	29.8	36.4	57.3	7.3
60	7.4	64.2	28.2	5.0	45.8	49.1	10.0	63.7	26.2	6.0	29.8	64.1	18.6	60.0	21.4
66	2.5	41.7	55.7	1.4	19.1	79.4	5.8	31.4	62.7	2.3	12.4	85.1	11.9	38.4	48.3
72	0.8	17.7	81.4	1.1	15.7	83.1	3.2	27.2	69.4	0.7	11.6	87.7	3.0	24.1	73.0
78	0	12.7	87.2	0.5	11.5	87.8	1.0	16.5	82.4	0	5.8	94.1	3.7	18.8	74.2

En este cuadro se presentan los porcentajes de células en metafase, clasificadas de acuerdo a su tinción diferencial como de primero, segundo y tercero o subsiguientes ciclos de replicación. Cada valor representa el promedio de los porcentajes obtenidos en 7 pacientes, por cada grupo de estudio.

CUADRO No. 2

DURACION EN HORAS DEL CICLO CELULAR PARA CADA INDIVIDUO

	NORMALES	DOWN	CRI-DU-CHAT	KLINEFELTER	TURNER
	14.1	15.6	12.6	12.0	11.7
	12.9	12.0	18.9	10.8	9.0
	15.0	12.0	12.3	15.6	11.1
	11.4	18.9	15.0	12.9	7.8
	16.2	13.5	17.5	12.6	10.5
	12.6	12.2	12.9	15.9	10.8
	13.5	11.1	14.7	14.1	10.5
PROMEDIO	13.6	13.6	14.8	13.4	10.2 *
DESVIA- CION					
ESTAN- DAR	1.59	2.75	2.54	1.87	2.75

* El análisis de varianza y la prueba de Tukey mostraron una diferencia estadísticamente significativa. $F=4.8$, $p<0.01$