



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"ZARAGOZA"**

**DIAGNOSTICO DE SINDROMES SECUNDARIOS A  
ANOMALIAS CROMOSOMICAS MEDIANTE  
TECNICAS DE BANDEO.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A  
ANA YOLOTL APARICIO ONOFRE**

**DIRECTOR DE TESIS: Q.F.B. ALICIA CERVANTES PEREDO**

**MEXICO, D. F.**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**2002**



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

# PAGINACION DISCONTINUA

## DEDICATORIA

A DIOS POR SER MI ETERNO COMPAÑERO EN CADA ETAPA DE MI VIDA

A MIS PADRES: HECTOR APARICIO ESCANDON Y ALICIA ONOFRE SALAS  
Y MIS HERMANAS: ALDA ALICIA APARICIO ONOFRE Y LAURA M. APARICIO  
ONOFRE  
POR SU CARIÑO, PACIENCIA Y TOTAL APOYO PARA LA REALIZACIÓN DE  
ESTE TRABAJO

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## AGRADECIMIENTOS

### A LOS PROFESORES:

BIOL. CARLOS BAUTISTA REYES  
QFB ALICIA CERVANTES PEREDO  
M. C. RAUL ZAVALA CHAVERO  
QFB ADRIAN PEREZ CABRERA  
QFB ANGEL BARAJAS CHAVARRIA  
POR SU INTERES MOSTRADO EN LA REVISIÓN DEL TRABAJO ESCRITO

### A MI ASESORA:

ALICIA CERVANTES PEREDO  
POR COMPARTIR SUS CONOCIMIENTOS Y APOYARME DURANTE LA  
REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO

AL SERVICIO DE GENETICA DEL HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO Ssa  
POR PERMITIRME SUS INSTALACIONES PARA LA REALIZACIÓN DEL  
PRESENTE TRABAJO

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO  
A LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA  
A MIS PROFESORES Y COMPAÑEROS  
POR LOS CONOCIMIENTOS RECIBIDOS Y AMISTAD

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## MI ETERNA GRATITUD

A QUIEN ME QUIERE POR QUE HACE MI VIDA HERMOSA.

ADRIAN PEREZ CABRERA  
POR SU AMISTAD Y SU COLABORACION INCONDICIONAL EN MI  
FORMACIÓN PROFESIONAL

A TODOS MIS AMIGOS  
POR HABERME BRINDADO SU SINCERA Y VALIOSA AMISTAD

A TODOS A QUELLOS SERES QUE EN ALGUN MOMENTO ME PRESTARON SU  
APOYO

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## INDICE.

CONTENIDO	PAGINAS
INTRODUCCIÓN	
1. MARCO TEÓRICO .....	005
1.1. COMPONENTES DE LA CROMATINA .....	005
1.1.1. DNA Y RNA .....	005
1.1.2. HISTONAS .....	006
1.1.3. PROTEÍNAS NO HISTONAS .....	010
1.1.3.1. TOPOISOMERASA II .....	011
1.1.3.2. LA FAMILIA SMC .....	012
1.1.3.3. DNA CHAPERONINAS .....	015
1.2. EMPAQUETAMIENTO DE LA CROMATINA .....	017
1.2.1. NUCLEOSOMAS .....	017
1.2.2. FIBRA DE 30 nm .....	022
1.2.3. ESTRUCTURA DE ORDEN SUPERIOR .....	026
1.2.3.1. LOS Sars .....	026
1.2.3.2. LAZOS O ASAS DE CROMATINA .....	029
1.2.3.3. ARMAZÓN PROTEÍCO.....	029
1.2.3.4. MODELOS PROPUESTOS PARA LA ESTRUCTRA DE ORDEN SUPERIOR.....	032
1.3. REGIONES ESPECIALIZADAS DE LA CROMATINA .....	034
1.3.1. TELÓMEROS.....	034
1.3.2. CENTROMEROS .....	037
1.4. TÉCNICAS DE BANDEO .....	040

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1.4.1. BANDAS Q .....	041
1.4.2. BANDAS G .....	042
1.4.3. BANDAS R .....	043
1.4.4. BANDAS C .....	044
1.4.5. BANDAS T .....	046
1.4.6. CARACTERISTICAS DE LAS BANDAS .....	046
1.5. APLICACIONES CLÍNICAS .....	050
2. MATERIAL Y MÉTODOS .....	059
3. RESULTADOS .....	064
4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	076
5. CONCLUSIONES .....	086
6. BIBLIOGRAFIA .....	088
7. ANEXO .....	097

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## OBJETIVO GENERAL

Aplicar las técnicas de bandeo cromosómico en el estudio citogenético, como una herramienta adecuada para el diagnóstico de anomalías cromosómicas causantes de síndromes y/o padecimientos.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar una revisión bibliográfica sobre la estructura cromosómica y su relación con el fenómeno de bandeo.

Aplicar las técnicas de bandeo en el estudio de los pacientes con un diagnóstico clínico de un probable padecimiento o síndrome cromosómico.

Realizar un estudio estadístico con los resultados obtenidos de los análisis citogenéticos, elaborados en el servicio de genética del Hospital General de México.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## INTRODUCCIÓN.

La presencia de una gran diversidad de padecimientos o síndromes originados por aberraciones cromosómicas ha hecho importante la participación de la citogenética humana en diversas áreas de la medicina. La citogenética entre otras funciones, realiza análisis cromosómicos que apoyan el estudio clínico permitiendo un adecuado diagnóstico, tratamiento y asesoramiento para el paciente y sus familiares.

En los estudios cromosómicos principalmente se aplican técnicas de bandeo, ya que éstas permiten la identificación precisa de los cromosomas. De aquí la importancia de estas técnicas como parte del estudio citogenético que se realiza a los pacientes con probables padecimientos o síndromes cromosómicos. En el presente trabajo se analizaron los resultados de los estudios citogenéticos realizados en el Servicio de Genética del Hospital General de México, en el periodo comprendido de enero de 1995 a diciembre de 1996. El estudio cromosómico se efectuó a partir de linfocitos obtenidos de sangre periférica heparinizada y su posterior análisis mediante la técnica de bandeo GTG. En algunos casos para llegar a un diagnóstico fue necesario aplicar otras técnicas citogenéticas tales como: bandas CBG, alta resolución e inducción de X-frágil, entre otras.

La revisión bibliográfica del presente trabajo muestra que la cromatina esta organizada en regiones con características específicas y que las técnicas de bandeo al

poner de manifiesto cada una de estas regiones han favorecido su estudio. Por otra parte se ha observado la importancia del estudio cromosómico para el diagnóstico adecuado de pacientes con padecimientos o síndromes en ocasiones originados por aberraciones cromosómicas y para la detección de portadores con rearrreglos cromosómicos balanceados. El estudio estadístico permitió establecer en este grupo seleccionado de pacientes la causa más frecuente por la que se realizó un estudio citogenético, las aberraciones cromosómicas que se presentaron con mayor frecuencia y la proporción de una aberración cromosómica específica como causa de un padecimiento o síndrome cromosómico, entre otros datos. También podemos mencionar que aún cuando se trata de una población seleccionada de pacientes el cariotipo normal fue el resultado de mayor porcentaje y las proporciones observadas de las anomalías cromosómicas que originan un síndrome son similares a las reportadas por estudios previos realizados en otras poblaciones. Por último podemos señalar la necesidad de que el médico esté familiarizado con las características fenotípicas producidas por una aberración cromosómica, de tal manera que los pacientes con este tipo de padecimientos sean adecuadamente canalizados.

## 1. MARCO TEÓRICO

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 1.1. COMPONENTES DE LA CROMATINA.

La cromatina es un complejo formado por: Ácido desoxirribonucleico (DNA) de doble cadena, una gran cantidad de proteínas y una pequeña proporción de ácido ribonucleico (RNA). La cromatina se halla confinada dentro del núcleo de la célula en interfase(1).

#### 1.1.1. DNA Y RNA

El principal componente de la cromatina es el DNA, éste posee flexibilidad y capacidad para cambiar su organización, la mayor parte se encuentra estructurado en forma B de Watson y Crick. El DNA contiene la información genética que se expresa en cadenas polipeptídicas y/o moléculas de RNA (1).

Otro componente de la cromatina es el RNA, el cual se encuentra en una proporción de 10% del contenido de DNA, la mayor parte de éste son cadenas recién formadas que aún se encuentran asociadas al molde de DNA. Se ha considerado que el RNA también tenga algunas funciones estructurales (1,2).

### 1.1.2. HISTONAS

Las histonas son un grupo de proteínas básicas que integran a la cromatina, su peso dentro de ésta equivale al del DNA, poseen secuencias ricas en aminoácidos con cargas positivas. Se clasifican en cinco categorías fundamentales que son: H1, H2A, H2B, H3 y H4. La histona H1 es rica en residuos de lisina, las H2A y H2B son moderadamente ricas en lisina y las H3 y H4 son ricas en arginina (1).

Las histonas interactúan con el DNA para formar la unidad estructural básica de la cromatina, el nucleosoma. Un nucleosoma consiste de 200 pares de bases (pb) de DNA que giran en aproximadamente dos vueltas alrededor de un de octámero de histonas (formado por dos copias de las histonas H2A, H2B, H3 y H4. Por último la histona H1 se une completando el nucleosoma (3).

Las histonas H2A, H2B, H3 y H4 o histonas del octámero poseen una conformación compuesta de dos regiones: una zona de estructura globular en el extremo carboxilo y un área flexible en el extremo amino. El brazo aminoterminal se encuentra desordenado en ausencia de DNA y puede tomar una conformación definida en presencia de éste. El extremo amino está altamente cargado de aminoácidos básicos y comprende aproximadamente de 25% a 33% de la proteína. Esta zona se ha

asociado con las funciones bioquímicas y biofísicas que realizan las histonas. La secuencia de aminoácidos de estas histonas se han conservado ampliamente durante la evolución, observándose una semejanza de 95% en las secuencias de todas las H4 estudiadas (3,4,5).

Se ha identificado dentro de la región globular de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 una estructura común llamada dominio de plegamiento de histonas, esta estructura está formada por tres alfa-hélices conectadas por dos lazos L1 y L2, denotados  $\alpha 1-L1-\alpha 2-L2-\alpha 3$  (figura 1). EL dominio de plegamiento interviene en las uniones histona-histona e histona-DNA. Esta estructura se ha encontrado también en proteínas no histonas implicadas en interacciones proteína-proteína y proteína-DNA. Aparte del dominio de plegamiento, las histonas H2A y H3 contienen hélices adicionales en el extremo amino y la histona H2B contiene una en el extremo carboxilo (3,5,6).

Por otra parte la Histona H1 y su homóloga H5 (presente en los eritrocitos de las aves) poseen una estructura distinta de las histonas antes mencionadas. Estas proteínas están formadas por una región globular central, con brazos en sus extremos amino y carboxilo. Los brazos son altamente básicos, más de la mitad del brazo carboxilo consiste de lisinas y argininas. Los brazos no poseen una estructura definida cuando las histonas están libres en solución, pero en interacción con el DNA adoptan una estructura definida, lo cual está de acuerdo con la observación de que la interacción

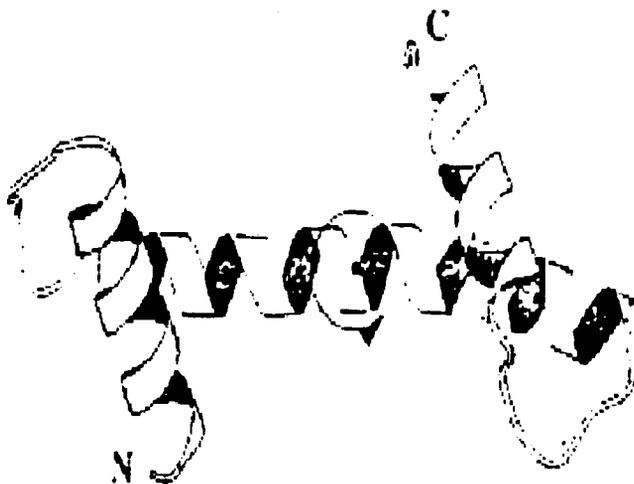


FIGURA 1. ESTRUCTURA DEL DOMINIO DE PLEGAMIENTO DE HISTONAS (3)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

con el DNA induce la formación de estructuras  $\alpha$ -hélice en el extremo amino (7,8). Las histonas H1 y H5 se han propuesto como represoras de la transcripción, lo cual está apoyado por la observación de que la reconstitución de la cromatina con estas histonas, restringe la movilidad fijando al nucleosoma en una sola posición, lo cual determina el contacto DNA-histona ocasionando un estado de represión(9).

Recientemente se ha identificado un grupo muy grande de proteínas variantes para las cinco clases principales de histonas. Estas se han asociado con distintas funciones, por ejemplo Cse4 y CENP-A (variantes de H3 en levaduras y humanos respectivamente), son componentes estructurales esenciales de los nucleosomas centroméricos y se ha sugerido que el brazo amino de éstas ayuda a mediar interacciones entre las proteínas centroméricas. Las variantes de H2A como la proteína hul en *Tetrahymena t*; el producto del gen *pht1* en *Schizosaccharomyces pombe*; H2AF en pollo y H2AZ en mamíferos, se han asociado con cromatina en transcripción o potencialmente activa. Actualmente se ha observado que la histona H2A.Z forma nucleosomas específicos con una superficie que probablemente favorezca la interacción con otros nucleosomas específicos o con proteínas que se asocian a la cromatina.(9,10,11).

En los últimos años se ha estudiado la relación que existe entre las modificaciones pos-transduccionales que experimentan las histonas (ubiquitinación, metilación, fosforilación y acetilación), con cambios importantes que se

presentan en las células eucariontes como: el ensamble de la cromatina después de la replicación, la reparación del DNA y la división celular. Dependiendo de las modificaciones postraduccionales y el sitio en donde se producen, las funciones que realiza cada grupo de histonas pueden ser muy variadas y específicas, incluso una misma histona puede tener varias funciones (12,13).

Se han propuesto dos rutas por las cuales las modificaciones de la región amino-terminal de las histonas, pueden mediar cambios en la función de la cromatina: la primera es que sirvan como una señal para otros factores reguladores en trans o como un sitio de unión para complejos proteínicos específicos. Un segundo mecanismo podría ser modificando la estructura de orden superior de la cromatina y por lo tanto su compactación (13). La primera de estas rutas se ve apoyada por la observación de que la acetilación de la histona H4 en células humanas, sirve como un marcador que distingue regiones transcripcionalmente activas, mientras que la heterocromatina aparece hipoacetilada (13).

La región amino terminal de H4 se ha asociado con múltiples funciones. Menee y colaboradores (14), utilizando cepas de *Saccharomyces cerevisiae* con mutaciones en los residuos de lisinas de H4, establecieron una división de la región aminoterminal en dos subregiones: A y R, cada una con distintas funciones. La región R consta de 15-19 residuos de aminoácidos, los cuales parecen necesarios para la represión de genes próximos a telómeros y la progresión de la fase G1 del ciclo celular. La región A comprende los residuos 11 a 16, los cuales al sufrir mutaciones en algún residuo de lisina, pueden ocasionar alteraciones en los procesos de

división nuclear, actividad génica y daños en la integridad del DNA. Estos resultados indican que la función de los residuos de lisina de H4, es necesaria para mantener integro el genoma en *Saccharomyces*.

Otra función atribuida a las histonas es su participación en la mitosis. Se ha observado, en *Saccharomyces cerevisiae*, que una disminución considerable de histonas H2B y H4 causa la muerte celular, iniciando con alteraciones en la fase S y ocasionando que las células queden detenidas en la transición de G2 a M. Esto sugiere un papel esencial de estas histonas en la replicación del DNA y probablemente en la mitosis (15).

### 1.1.3. PROTEÍNAS NO HISTONAS

El segundo grupo de proteínas que constituyen la cromatina, es un conjunto de proteínas heterogéneas, las cuales se encuentran en una proporción relativamente menor en masa, que las histonas dentro de la cromatina, muchas de ellas están asociadas con funciones cromosómicas tales como, la replicación, la expresión de genes y la organización del cromosoma. Dentro de este grupo de proteínas heterogéneas, mencionaremos únicamente las que se considera que participan en el empaquetamiento de la cromatina, y entre ellas se encuentran: la Topoisomerasa II, la familia SMC y las DNA chaperoninas (16).

### 1.1.3.1. TOPOISOMERASA II

Una de las proteínas no histonas que forman parte de la cromatina es la topoisomerasa II. Actualmente a esta enzima se le ha asociado con procesos como replicación, recombinación, condensación y desenlazamiento de las cromátides hermanas. La función catalítica de la topoisomerasa II consiste en relajar el super enrollamiento negativo y positivo del DNA. La reacción probablemente representa un reconocimiento no específico por parte de la enzima al DNA dúplex, la enzima se une y produce una ruptura en la cadena doble, que permite el paso de otra región dúplex a través de la ruptura. La reacción es dependiente de ATP, probablemente en cada paso es hidrolizado un ATP que puede utilizarse para provocar cambios conformacionales en la enzima (17).

Estudios de inmunolocalización demostraron la presencia de esta enzima en los cromosomas mitóticos, lo que hizo suponer que realiza una función estructural aparte de su función catalítica. Se ha encontrado que la topoisomerasa II se une a un gran número de sitios del DNA llamados SAR (*Scaffold-Associated Regions*), los cuales se han localizado en la región axial del cromosoma. Esta interacción probablemente favorece la formación de lazos para la compactación del DNA en las estructuras de orden superior. Esto se discutirá en el capítulo siguiente (18).

Se ha postulado que uno de los propósitos de la condensación cromosómica, sea el desenredar las cromátides hermanas replicadas, basados en la actividad catalítica y estructural de la topoisomerasa II es probable que cumpla esta función junto con otros factores. Resultados de estudios de microscopía electrónica en linfocitos humanos en mitosis, muestran que los cromosomas se condensan primero como un simple cilindro, que subsecuentemente se resuelve en dos cilindros paralelos y delgados (19).

#### 1.1.3.2. LA FAMILIA SMC

Dentro del grupo heterogéneo de proteínas no histonas ligadas a la cromatina, existe una familia de proteínas llamada SMC (*Structural Maintenance of Chromosomes*). Este grupo de proteínas fue originalmente definido por Strunnikov y colaboradores (20). Se considera que participan en la recombinación y reparación del DNA y en la condensación y cohesión de las cromátides hermanas. Una prueba de su función en la condensación fue establecida por Hirano y Mitchison (21) al realizar análisis bioquímicos de dos miembros de esta familia XCAP-C y XCAP-E, los cuales resultaron necesarios para la condensación *in vitro* de los cromosomas en extracto de huevo de *Xenopus*.

Todos los miembros de esta familia son ATPasas con una configuración similar, poseen una estructura de cabeza-tallo-cola (figura 2), la cabeza en el extremo amino contiene un

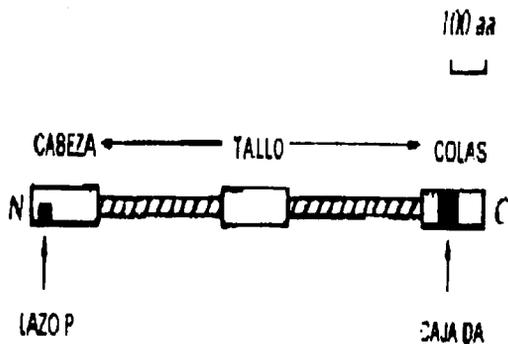


FIGURA 2. ESTRUCTURA DE LAS PROTEINAS SMC (23)

sitio de unión NTP, el tallo está constituido por dos tramos largos de  $\alpha$ -hélice separados por un espacio corto del cual no se conoce su función y por último la cola carboxilo terminal contiene una secuencia única conservada llamada caja DA que es una región de unión a DNA. Esta conformación semejante a la de las proteínas motoras ha sugerido que realicen una función motora para el DNA (22,23).

Las SMC son proteínas altamente conservadas evolutivamente; estudios de electromicroscopia de las SMC de *Bacillus subtilis* revelaron la formación de homodímeros de estas proteínas que presentan una marcada flexibilidad. Dos moléculas de SMC probablemente formen un homodímero antiparalelo con co-localización de los extremos carboxilo y amino en cada extremo. La formación de los homodímeros *in vitro* requiere de la presencia de ATP y DNA. La forma más frecuente de los homodímeros es el de una barra completamente doblada (23).

Las proteínas SMC realizan diversas funciones biológicas, su versatilidad podría explicarse por su habilidad para formar complejos de proteínas con multisubunidades. En eucariontes hay por lo menos dos importantes complejos de cohesinas y condensinas formados por los heterodímeros SMC1/SMC3 y SMC2/SMC4, respectivamente y por un conjunto de factores accesorios que interactúan con ellos. Ambos complejos actúan en forma independiente pero probablemente coordinada (23,24).

Estudios realizados en *Xenopus laevis* muestran que las subfamilias SMC 2 y 4 (XCAP-E y XCAP-C) forman un complejo llamado condensina con coeficientes de sedimentación de 13S, complejos similares se han encontrado en *Saccharomyces c.* y *Schizosaccharomyces p.* La Condensina 13S está compuesta de dos subunidades, la fracción 8S contiene las SMC 2 y 4, mientras que la 11S contiene tres subunidades adicionales llamadas complejo regulatorio (XCAP-D2,-G y -H). Un modelo de la estructura del complejo de condensina propone que las proteínas SMC originen un dímero con forma de V con dos largos brazos de hélices anti-paralelas conectadas por una columna flexible, en ambos extremos las regiones amino y carboxilo terminal se unen para formar un dominio, XCAP-H parece ser el sitio de unión entre las SMC y el complejo regulador. Cada subunidad es esencial para la viabilidad celular y su mutación conduce a defectos en la condensación de los cromosomas y la segregación en mitosis. Las Condensinas poseen una capacidad para cambiar la estructura del DNA en forma dependiente de ATP (17,23,24).

El papel específico de las subfamilias SMC 1 y 3 en la dinámica del cromosoma es menos conocido, estudios en *S. cerevisiae* propusieron que Smc1p y Smc3p junto con un producto de un tercer gen *Scclp/Mcd1p* están directamente involucrados en la cohesión de las cromátidas. Esta idea se ve apoyada por estudios en extracto de células de *Xenopus* en los cuales se observó que las proteínas SMC 1 y 3 forman un complejo con coeficientes de sedimentación de 9S y 14S. La fracción 14S contiene tres subunidades adicionales, una de las cuales es un homólogo de *Scclp/Mcd1p* y estas proteínas

están implicadas en la cohesión de las cromátidas hermanas (23,24).

Los resultados obtenidos hasta ahora muestran que las dos clases de complejos de SMC regulan la cohesión y condensación de las cromátidas hermanas, contribuyendo a la segregación de los cromosomas en las células eucariontes (23,24).

#### 1.1.3.3. DNA CHAPERONAS

Las chaperonas de DNA son un grupo de proteínas que se unen a secuencias pequeñas de DNA y que participan en la estructura del cromosoma. A estas proteínas se les ha asociado con una serie de funciones, tales como: colaborar en la replicación, activar la transcripción y ensamblar los nucleosomas (25). Tanto los procariontes como los eucariontes contienen proteínas pertenecientes a este grupo. En las bacterias se encuentra la HU, en los vertebrados HMG 1 y 2, en los invertebrados HMG-D y en las levaduras la NHP-6 (25).

Se ha comprobado que la unión de estas proteínas al DNA le confiere un estado de predoblamiento o torsión, el cual facilita los cambios conformacionales del DNA para remodelar la cromatina y permitir la unión de otras proteínas (figura 3) (25).

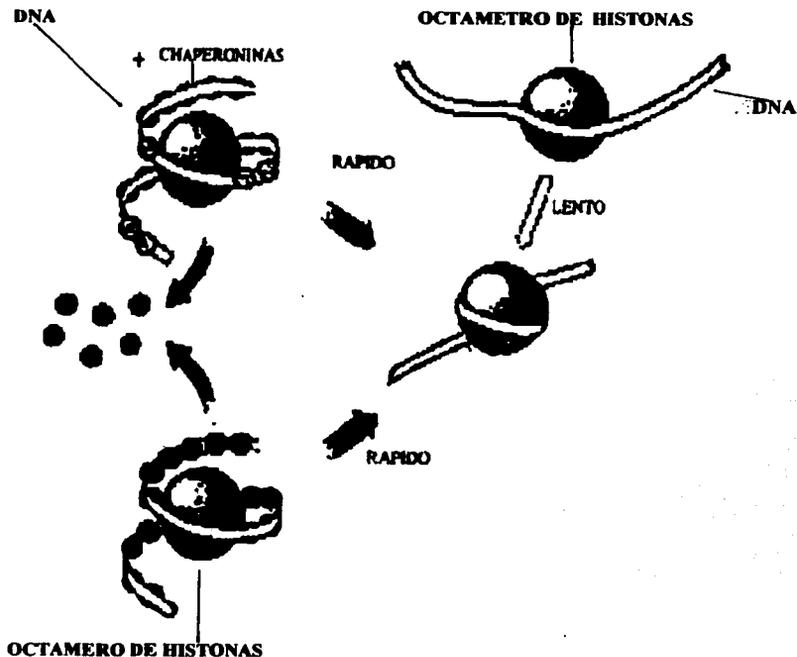


FIGURA 3. FUNCION DE LAS PROTEINAS CHAPERONINAS (25)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

15-A

De este grupo de proteínas se han estudiado con gran interés las HMG 1 y 2 debido a su relación con la histona H1. Las HMG de mamíferos poseen dos sitios de unión a DNA llamados cajas HMG. La estructura terciaria de la segunda caja HMG tiene una conformación en V con una superficie cóncava que reconoce secuencias específicas del DNA. Las HMG 1 y 2 interaccionan con el DNA entre nucleosomas de manera similar a la histona H1 (26).

Nightingate y Dimitrov (26) investigaron el posible papel de las HMG1 en la cromatina del embrión de *Xenopus* y comprobaron que HMG1 interactúan con el DNA nucleosomal con consecuencias similares a las observadas después del ensamble de H1 en los nucleosomas, sugiriendo que HMG1 tiene un papel estructural en la organización del DNA entre nucleosomas, tanto en los pronúcleos paternos de *Xenopus* como en los núcleos en embriogénesis temprana deficientes de H1. El reemplazo de H1 por HMG1 Y 2 puede reflejar una adaptación a una estructura de la cromatina menos estable que facilite una rápida replicación y división nuclear, requerida en este tipo de núcleos.

Otras chaperonas involucradas en el empaquetamiento de la cromatina son las chaperonas de histonas, estas proteínas se unen transitoriamente a las histonas, con lo cual reducen su carga positiva e inhiben la tendencia de éstas a agregarse inespecíficamente con el DNA. Un ejemplo de las chaperonas de histonas es el Factor de Ensamble de la Cromatina 1 (CAF-1). CAF-1 in vitro se asocia a las histonas H3 y H4 recién sintetizadas y tiene la habilidad de promover

el ensamblado de los nucleosomas preferentemente dentro del DNA recién sintetizado en los procesos de reparación y replicación. Esto lo hace un fuerte candidato a coordinar el ensamblado de los nucleosomas durante la síntesis de DNA in vivo (27,28).

## 1.2. EMPAQUETAMIENTO DE LA CROMATINA

El gran tamaño del genoma eucarionte representa un problema de espacio para la célula, principalmente por este motivo el DNA se empaqueta en un complejo altamente condensado con proteínas histonas y no histonas. La cromatina presenta tres niveles principales de organización que proporcionan la estructura final del cromosoma: el nucleosoma, la fibra de 30 nm y las estructuras de orden superior (1).

### 1.2.1. NUCLEOSOMAS

Los nucleosomas fueron descubiertos a principios de los años 70's, estas estructuras representan el primer nivel de compactación del DNA. Los nucleosomas están constituidos por un núcleo de ocho histonas (un tetrámero con dos moléculas de H3 y H4 y dos dímeros de H2A-H2B) y 200 pb de DNA, los cuales giran alrededor del octámero y son fijados en éste por la posterior adición de la histona H1. (1,4).

La secuencia de ensamblaje de un nucleosoma se inicia con la formación de un heterodímero de H3-H4 y la posterior interacción entre dos parejas de H3-H4 para definir un tetrámero, esta interacción se realiza a través de la unión de 4  $\alpha$ -hélices de los dominios de plegamiento de las histonas H3 y H3'. Por otra parte dímeros de H2A-H2B interactúan a cada lado del tetrámero por una unión similar de cuatro hélices entre H2B y H4. Estas uniones junto con otras regiones  $\alpha$  hélice y elementos espirales crean un núcleo proteico ensamblado en forma de una hélice que gira hacia la izquierda y que presenta una pequeña cavidad central (3,5,29).

El cilindro formado por las histonas se encuentra rodeado por el DNA. La trayectoria del DNA para dar casi dos vueltas alrededor del octámero de histonas, requiere que éste se distorsione. El DNA realiza tres curvaturas centrales en el nucleosoma (figura 4A-B). La necesidad de flexibilidad en las secuencias de DNA concuerda con la observación de que los pares de bases G-C están en la cara interna del surco mayor facilitando que se doble en esta región (1,5).

Por otra parte las interacciones entre el DNA y el octámero de histonas se realizan en la columna fosfodiéster de la cara interna de la hélice del DNA. Un contacto se establece cada 10 bp cuando el surco menor de la hélice se encuentra en la cara interior. Se han observado interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno con los fosfatos del DNA, así como contactos no polares con los grupos desoxirribosa (4,5,29).

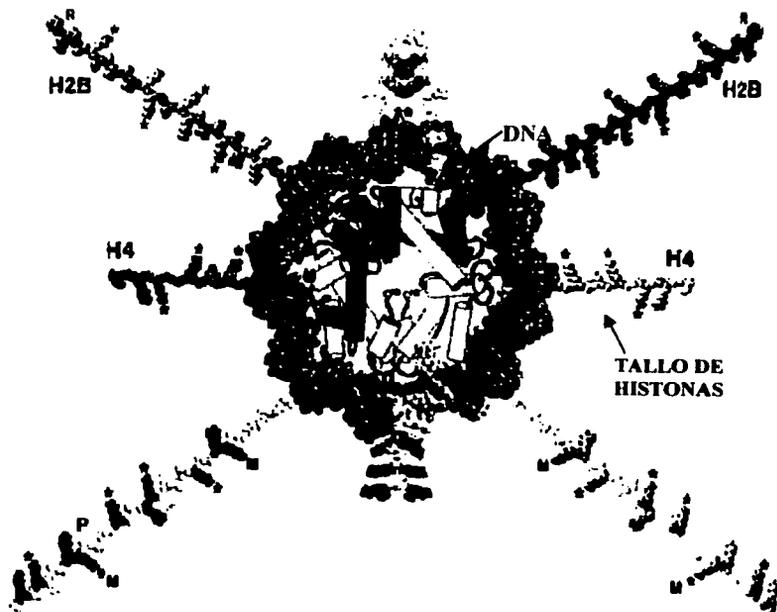


FIGURA 4A. MODELO PROPUESTO PARA LA ESTRUCTURA DEL NUCLEOSOMA (5)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

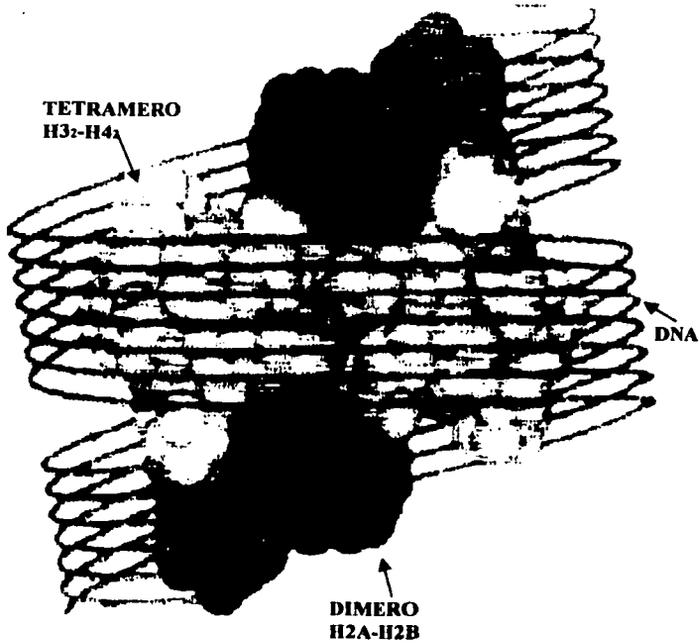


FIGURA 4B. MODELO PROPUESTO PARA LA ESTRUCTURA DEL NUCLEOSOMA (1)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La señal que estimula el ensamblaje de los nucleosomas no ha sido aun bien establecida. Ling y colaboradores (30) basados en la observación de que la diacetilación de las lisinas de H4 correlaciona con el ensamblado de nucleosomas, en organismos tan variados como Tetrahymena, Drosophila y humanos, realizaron estudios consistentes en deleciones en las colas amino terminal de las histonas H3 y H4 y observaron que si se presenta un ensamblaje de los nucleosomas, pero no una adecuada localización. Es clara la importancia de la histona H4 en la formación del núcleo del nucleosoma, pero aún no se establece su función.

Siendo los nucleosomas el primer nivel de compactación de la cromatina, se ha propuesto su participación activa como reguladores de la transcripción. Los nucleosomas pueden encerrar partes del genoma que necesitan ser silenciadas transcripcionalmente y pueden hacer accesibles genes que necesitan ser expresados a una gran velocidad (31,32).

La remodelación de la cromatina parece ser un pre-requisito para activar la transcripción, posteriores modificaciones pueden ocurrir sin transcripción, pero lo contrario no se ha observado. El proceso de remodelación de la cromatina implica el reclutamiento de grandes complejos, dentro de los cuales podemos mencionar: factores asociados a la proteínas de unión a la caja TATA ( TBP, los TAF), la maquinaria remodelante de la cromatina dependientes de ATP, y/o el reclutamiento de las AcetilTransferasas de histonas (HATs) (31).

Los complejos remodelantes de cromatina dependientes de ATP pueden dividirse en tres subfamilias representadas por SNF2 en levaduras, ISWI en *Drosophila* Y CHD1 en ratón. La característica conservada en todas las familias es un núcleo de hidrólisis de ATP con una región de homología a una helicasa y en el cual está basada su actividad. Algunas enzimas remodelantes son estimuladas por DNA y nucleosomas mientras otras son estimuladas por nucleosomas pero no por DNA y para otro grupo los brazos intactos de las histonas son necesarios. Esto muestra que los complejos remodelantes de cromatina reconocen distintas estructuras de la cromatina (31).

Los modelos de acción de SWI/SNF y ISWI parecen ser diferentes pero ambos desestabilizan el nucleosoma eliminando el contacto DNA-histona y creando regiones libres de nucleosomas, lo que aparentemente permite el deslizamiento del octámero de histonas a posiciones adyacentes del mismo DNA. Un modelo para SWI/SNF propone que éste se una a los segmentos terminales del DNA provocando una ruptura de una de las 14 uniones entre la columna fosfodiéster y el octámero de histonas avanzando por movimientos dependientes de ATP hacia el centro del nucleosoma. Las nucleasas y las polimerasas pueden explotar esta debilidad para invadir el nucleosoma avanzando por el extremo con el DNA disociado mientras la superficie expuesta del octámero de histonas puede proveer un punto de entrada para unirse a otro DNA. Por otra parte ISWI puede introducir una deficiencia de un par de bases en el giro de la doble hélice de DNA alrededor del nucleosoma, la

propagación de este defecto alrededor del nucleosoma conduce al deslizamiento del octámero (4,32).

Por otra parte, como ya mencionamos existe una relación entre la acetilación de los brazos del extremo amino de las histonas y la transcripción. Había pocas evidencias de esta relación, hasta ahora que se han caracterizado las enzimas que acetilan y desacetilan a las histonas. Las enzimas que acetilan son llamadas HAT, las cuales resultaron ser componentes de la maquinaria de transcripción. Dentro de este grupo de enzimas se encuentran la HAT A, Gcn5p, PCAF, SRC-1, ACTR, p300/CBP y TAF11230/250. Las desacetilasas de histonas conocidas como (HDAC) juegan un papel en la represión de la transcripción y entre ellas se encuentran las DHAC1, Rpd3, HDA1, HOS1, Sin3. La acción de las HAT puede incluir no solo a las histonas, sino también a otros componentes de la maquinaria de transcripción (33,34).

El sitio de acción de las HAT es el grupo  $\epsilon$ -amino de las lisinas en el brazo amino terminal de las histonas. El mecanismo de acción de estas enzimas puede observarse en los experimentos de inmunoprecipitación usando anticuerpos específicos para isoformas de histonas acetiladas. Las HAT remodelan la cromatina en regiones de promotores, facilitando la posterior unión de otros factores de transcripción y probablemente en etapas posteriores se requiera también acetilación, ya que se ha observado en levaduras que proteínas que participan en la transcripción son HAT (33).

Las HAT pueden ser específicas para una histona o un aminoácido, por ejemplo, p300/CBP puede adicionar grupos acetilo a las cuatro histonas del núcleo del nucleosoma, mientras Gcn5p acetila sólo en dos de ellas, H3 y H4. Estas diferencias sugieren que los grupos acetilo adicionados, además de encender o apagar una señal para la transcripción, también pueden servir como marcas para atraer otras proteínas necesarias para la total activación de los genes (33).

### 1.2.2. FIBRA DE 30 nm.

La mayor parte del DNA en los eucariontes está empaquetada en una fibra de cromatina de 30 nm. Esta fibra se forma por la incorporación de la Histona H1 a los nucleosomas, lo que resulta esencial para la formación de una estructura de orden superior. Se han propuesto una gran variedad de modelos que tratan de explicar la forma en que se origina esta estructura. De estos modelos sólo mencionaremos los tres con mayor soporte experimental (35).

El primer modelo fue descrito por Thoma y colaboradores (36) y consiste en el empaquetamiento de la serie de nucleosomas en una estructura sencilla, helicoidal, de una sola hebra o solenoide, con aproximadamente seis nucleosomas por vuelta y cada vuelta con una altura de 11 nm. La altura se debe a que el eje de los nucleosomas se encuentra paralelo al eje de la fibra (figura 5a). Este modelo fue apoyado por

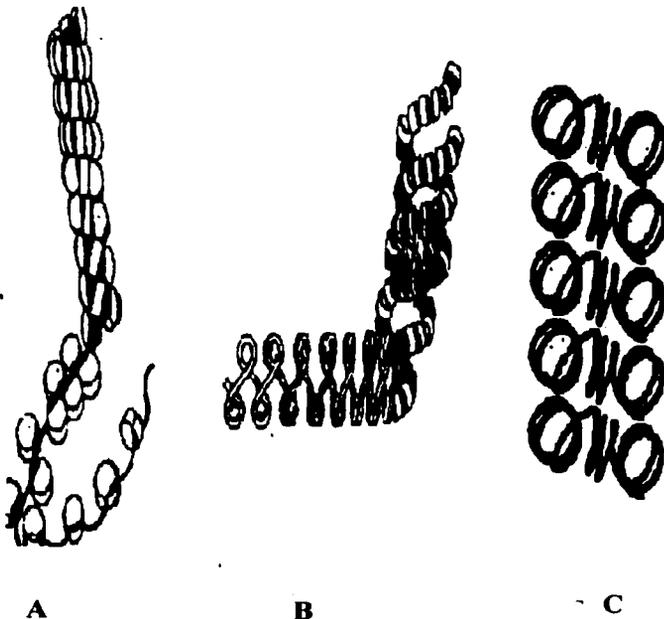


FIGURA 5. MODELO PROPUESTO PARA LA FIBRA DE 30nm (35,37)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

la observación en condiciones iónicas bajas, de un filamento de 10 nm, el cual se pensó que formaba una hélice en condiciones fisiológicas. También se fundamenta en el hecho de que el empaquetamiento de los nucleosomas, puede ser promovido por la interacción entre las histonas H1 y el eje de la fibra (36,37).

El segundo modelo fue propuesto por Woodcock y colaboradores en 1984 (38) y se basa en la observación de un intermediario durante el desempaquetamiento de la fibra de 30 nm. En este modelo los nucleosomas adyacentes forman un patrón en zig-zag, que puede formar una cinta con dos hileras paralelas de nucleosomas, estableciendo contacto entre las caras alternas de nucleosomas. La fibra de 30 nm se forma por el enrollamiento de la doble cinta en sí misma para formar una hélice (figura 5b).

En tercer lugar McGhee y colaboradores (39) propusieron un modelo en el cual los nucleosomas están orientados con sus caras paralelas al eje de la fibra (el ángulo exacto depende de la disposición del DNA entre nucleosomas), colocados en una forma radial, como rayos de rueda de bicicleta (figura 5c).

Athey y colaboradores (40), tomando en cuenta datos de estudios de rayos X y microscopia electrónica, encontraron fallas para los tres modelos mencionados anteriormente. El modelo del solenoide de Thoma y colaboradores, presenta el

problema de estar estructurado de tal manera que es hueco en el centro y además tiene un diámetro constante sin tomar en cuenta el largo del DNA entre nucleosomas, lo cual no está de acuerdo con las observaciones de un aumento en el diámetro de la fibra, conforme se incrementa el largo del DNA entre nucleosomas. Por otra parte el modelo de Woodcock y colaboradores llamado también de cinta torcida, propone que el diámetro es constante, con disminución en la masa a medida que se incrementa el largo del DNA entre los nucleosomas, lo cual está en contra de las observaciones de microscopia electrónica. Por lo que Athey y colaboradores(40) modificaron el modelo del solenoide, para hacerlo adecuado a sus resultados. Proponiendo una hélice que varía en diámetro y número de nucleosomas por vuelta, con lazos del DNA entre nucleosomas hacia el centro de la fibra. El largo del DNA entre nucleosomas y el tamaño del radio de la fibra permite que el número de nucleosomas por vuelta aumente a medida que aumenta el largo del DNA entre nucleosomas.

La controversia ha rodeado por largo tiempo la estructura de la fibra de 30 nm, siendo los modelos del solenoide y del zig-zag los que se mantienen. Sin embargo, Cui y Bustamante(41) realizaron estudios usando pinzas moleculares para obtener los valores de las fuerzas de alargamiento durante la relajación y estiramiento de una fibra 30 nm. Estas mostraron una estructura irregular en forma de zig-zag similar al modelo de Woodcock, lo cual concuerda con los resultados de estudios de criomicroscopia y microscopia de fuerzas atómicas. Por lo que se cree que la estructura en forma de zig-zag se presenta a bajas concentraciones de sales y se compacta más y más cuando las

fuerzas iónicas tienden a valores fisiológicos. Sin embargo, esta densa fibra no permite detectar su geometría exacta (35,41,42).

Los estudios de Cui y Bustamante (41) también muestran una débil atracción entre nucleosomas, probablemente involucrando a las histonas del octámero, lo anterior concuerda con estudios de difracción de neutrones en los que se observa que los brazos de las histonas sobresalen del nucleosoma y al parecer promueven la formación de la fibra de 30 nm quizás por contactos entre nucleosomas adyacentes o por influenciar la configuración del DNA entre nucleosomas. Estudios con sistemas en los cuales las histonas del núcleo carecían de tallos mostraron la falta de formación de la fibra de cromatina y la ausencia de asociaciones fibra-fibra aún con la histona H1 en posición correcta (4,41,42).

Por otra parte la histona H1 estabiliza la estructura de la fibra por medio de la neutralización electrostática de segmentos de DNA entre nucleosomas a través de cargas positivas en sus brazos. La fosforilación de H1 actúa alterando las cargas de una pequeña región que se fosforila debilitando su interacción con el DNA (5,42).

### 1.2.3. ESTRUCTURA DE ORDEN SUPERIOR.

La forma en que se origina la estructura de orden superior, de un cromosoma a partir de la fibra de 30 nm; no está aun bien establecida, Saitoh y colaboradores (43) proponen un modelo que describe la estructura del cromosoma, tomando en cuenta la posible función de sub-elementos como son: los SAR, el armazón proteico y los lazos de cromatina. Con el propósito de describir éste y otros modelo definiremos brevemente cada uno de estos sub-elementos.

#### 1.2.3.1. Los SAR.

La formación de la estructura superior requiere la presencia de secuencias del DNA, las cuales se asocian al armazón proteico y están implicadas en delimitar estructuralmente los lazos de DNA *in vivo*. A estas regiones se les llama SARs, fueron caracterizadas en muchos organismos incluyendo humanos y levaduras, estimándose 10 000 SARs en el genoma de los mamíferos. Se han definido como secuencias de un tamaño variable (0.6 a algunas kb), altamente ricas en AT (más de 70%), con regiones de secuencias oligo(dA)-oligo(dT) llamadas A que estan distribuidas a lo largo. Las regiones A están implicadas en la asociación de los SARs al armazón proteico. Al parecer su participación en la modelación de la cromatina no depende de su especificidad en la secuencia de bases, sino de sus características estructurales, ya que la

presencia de regiones oligo(dA)-oligo(dT) favorecen la formación de un surco que posiblemente sufre plegamiento (44). La función de los SAR se ve apoyada por estudios realizados en el complejo de genes del interferon humano tipo I. La presencia de 36 SAR sugiere la organización de estos genes en una serie de pequeños lazos de DNA (2-10 kb) con las regiones que codifican dentro de cada lazo flanqueadas por SAR. La presencia de los SAR y el agrupamiento de las regiones A sugieren un alto nivel de organización de la cromatina (45).

Una de las funciones principales de los SAR es mediar entre el DNA y las proteínas necesarias para mantener la forma del cromosoma. Strick y colaboradores (46) comprobaron esta participación de los SAR en la estructura de orden superior, por medio de la aplicación de proteínas artificiales inhibidoras de los SAR llamadas MATH (*multi-AT hook*). Ellos observaron que la proteína MATH 20 aplicada antes de la condensación cromosómica ocasiona una condensación que no llega a la forma final del cromosoma, por otra parte si MATH 20 se adiciona después de la condensación cromosómica se origina una reorganización de la cromatina en una forma de esfera. De acuerdo a esto podemos considerar que los SAR no sólo median interacciones durante el ensamblado de los cromosomas, sino que además participan en el mantenimiento de la estructura de orden superior.

Las funciones de los SAR están fuertemente relacionadas con la unión que presentan con la topoisomerasa II. Los SARs se unen selectivamente a la topoisomerasa II por interacciones cooperativas, las cuales se creó que se dan en las regiones A caracterizadas por sufrir una curvatura. Las interacciones entre los SAR y la topoisomerasa II están relacionadas con el papel de esta enzima en la estructura de la cromatina (47).

Por otra parte los SAR también interactúan con la histona H1, esto permite suponer que los SAR localizados en el DNA entre nucleosomas se unen en una forma preferencial y cooperativa a la histona H1 y participan en la regulación de la transcripción. Los SAR se han involucrado no sólo en el empaquetamiento de la cromatina y en la transcripción, sino también se cree que participan en procesos como la replicación y la recombinación (47).

Se han realizado diversos estudios para mapear los SAR, los cuales han permitido localizarlos en los límites de distintos genes, en los orígenes y terminaciones de replicación y en la cromatina condensada de los centrómeros y telómeros (48). El uso de técnicas como la hibridación *in situ* fluorescente (FISH) por Bickmore y colaboradores (49) ha permitido obtener evidencias visuales de que los SAR están asociados con la región axial de los cromosomas metafásicos en mamíferos.

#### 1.2.3.2. LAZOS O ASAS DE CROMATINA.

Los modelos que tratan de explicar la estructura de orden superior, consideran la existencia de lazos o asas de DNA formados por la fibra de cromatina de 30 nm, estos lazos están estructurados como barras con aproximadamente 500 nm de largo y 30 nm de ancho. La cantidad de pares de bases por asa de DNA es de un rango de 5,000 a 120,000 con un promedio de 50,000. Los lazos muestran una polaridad bioquímica como consecuencia de los SAR presentes en sus bases (43,50).

Tomando en cuenta el tamaño de los lazos, el genoma humano haploide de 3.0 billones de pares de bases de DNA correspondería a 60,000 lazos. Se ha propuesto que cada lazo de DNA contiene un gen o un grupo pequeño de éstos que se encuentran ligados y que pueden funcionar como unidades genéticas y estructurales de los cromosomas (43,50).

#### 1.2.3.3. ARMAZÓN PROTEICO.

El armazón proteico es una red de proteínas, las cuales se piensa que organizan la fibra de 30 nm. en lazos topológicos, al unirse al DNA en regiones específicas (SAR). Contiene sólo un 3-4% de la masa total de un cromosoma y fue visualizado primeramente por Paulson y Laemli (51) mediante el tratamiento de los cromosomas con detergentes suaves, que ocasionaban la remoción de histonas y muchas otras proteínas

no histonas, lo que va generando una red de proteínas residuales, como si fueran un fantasma del cromosoma metafásico rodeado por un halo de DNA. Actualmente la aplicación de técnicas de inmunofluorescencia con anticuerpos contra topoisomerasa II permite su visualización. El armazón es una mezcla compleja de proteínas que incluye: a la topoisomerasa II, la SC-2, las proteínas SMC, los complejos de condensinas y las proteínas centroméricas CENP-B y CENP-C, entre otras (44,46).

Estudios bioquímicos y estructurales de cromosomas metafásicos identifican a la topoisomerasa II como el principal componente del armazón proteico, por lo cual se le involucra como un controlador de la condensación cromosómica. Se ha observado que cuando la topoisomerasa II se desfosforila pierde mucha de su actividad, pero la recupera al volverse a fosforilar. Su estado de actividad puede estar relacionado con su papel en la condensación cromosómica durante la mitosis, ya que su fosforilación se incrementa gradualmente a través de S y G2 y llega a su máximo durante la mitosis (47).

Investigaciones realizadas sobre las proteínas de la familia SMC han permitido proponer modelos sobre la forma en que éstas se organizan dentro del armazón proteico. Uno de estos modelos propone que la topoisomerasa II y los complejos de cohesinas están presentes desde la fase S (19). Probablemente las cohesinas se unan a la cromatina durante la interfase para ejecutar su función principal, que es

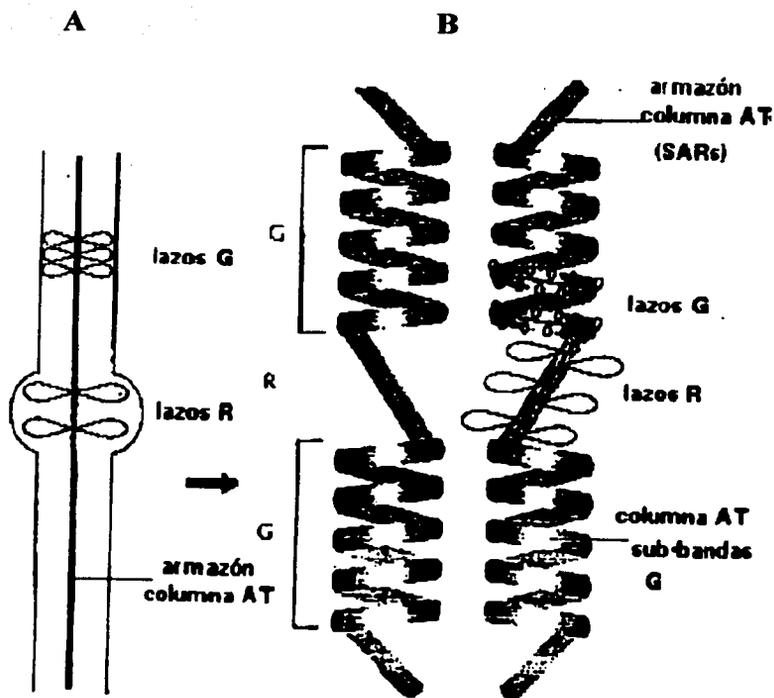
constituir o ser parte de la maquinaria de cohesión, la cual mantiene a las cromátidas hermanas juntas después de la replicación. Mientras tanto el complejo de condensinas parece que están involucrados en el acortamiento del eje interlazos y la compactación de los lazos de cromatina, por la introducción de superenrollamiento. Al parecer el complejo de la fracción 13S de las condensinas induce una tensión de la superhélice de DNA que actúa como una fuerza que impulsa la compactación de la fibra de cromatina en la mitosis. Con la disociación de las cohesinas las cromátidas hermanas se separan y las condensinas participan en la compactación del cromosoma. Este modelo no explica por completo algunas diferencias observadas experimentalmente en *Xenopus* y *S. cerevisiae* sobre la presencia de los complejos de cohesinas y condensinas durante las diferentes etapas del ciclo celular y la forma en que son disociados (19).

Por otra parte Uhlmann y colaboradores(17) propusieron un modelo en el cual las condensinas tienen la función específica de compactar los lazos de los cromosomas, mientras que la organización del eje de los cromosomas parecería ser realizada por proteínas diferentes que probablemente incluyan a las cohesinas. Este modelo se basa en las observaciones de que las condensinas en algunos organismos como *Drosophila* no son esenciales para formar un acortamiento del eje del cromosoma, pero son requeridas para condensar los lazos de cromatina que se extienden de este eje y que por otra parte las cohesinas en algunos organismos como levaduras son requeridas para la total condensación del cromosoma.

#### 1.2.3.4. MODELOS PROPUESTOS PARA LA ESTRUCTURA DE ORDEN SUPERIOR

A pesar del amplio uso de las técnicas de bandeado tanto en el área de la investigación como en la rutina clínica, no existe un modelo que explique totalmente como se da el fenómeno de bandeado y como éste está relacionado con la estructura de orden superior de los cromosomas (43).

Saitoh y Laemmli(43) basados en sus investigaciones propusieron un modelo que trata de explicar la estructura del cromosoma metafásico. Ellos realizaron tinciones diferenciales en cromosomas nativos de *Indican muntjan*. La tinción del cuerpo de los lazos con YOYO-1 seguida de tinción con MG, produce un patrón de bandas R, mientras que la tinción con daunomicina o la aplicación de anticuerpos contra Topoisomerasa II o contra proteínas HMG-1 genera un patrón de bandas Q, tiñendo selectivamente la base de los lazos. En este modelo los lazos de DNA son atados al armazón proteico por medio de los SAR, éstos se alinean en una columna longitudinal, la cual presenta una señal brillante con daunomicina y a la que se ha llamado cola o columna AT (figura 6A). La diferente ruta de empaquetamiento que sufre esta columna AT a través del cuerpo cilíndrico del cromosoma, es lo que da origen al patrón de bandas. En las bandas Q y G la columna se encuentra en un empaquetamiento ajustado(simulando una cuerda para saltar) , el tamaño de los lazos de DNA es corto, aproximadamente de 500 nm, y se encuentran orientados paralelamente al largo del cromosoma.



FIBRA DE CROMATINA

FIGURA 6. MODELO PROPUESTO POR SAITOH PARA LA ESTRUCTURA DE ORDEN SUPERIOR DEL CROMOSOMA (43)

Por otra parte en las bandas R la columna AT se encuentra extendida, con los lazos de DNA largos (800 nm) en forma más radial y no transversales, alcanzando la periferia del cromosoma, lo que le permite una forma más abierta de la cromatina en esta zona rica en genes (figura 6B).

Woodcock y colaboradores(42) propusieron un modelo diferente basados en investigaciones biofísicas de los cromosomas. Utilizando una técnica de micropipeta en cromosomas mitóticos de células de pulmón de tritón, se observó que los cromosomas son objetos altamente extensibles mostrando una deformación reversible cuando se estiran diez veces más que su largo original. Estos datos concuerdan con un modelo en el cual los cromosomas contienen algunos ejes delgados a los cuales la cromatina blanda o suave está anclada, los ejes son muy delgados y se encuentran rodeados de proteínas o complejos proteínicos con propiedades elásticas las cuales pueden ser quebradas por la aplicación de fuerzas, las proteínas SMC son las candidatas para formar los ejes (figura 7).

Otro modelo propuesto para la estructura de orden superior de la cromatina es el de Wanner y colaboradores (52). Este modelo se basa en observaciones realizadas por microscopia electrónica de alta resolución en combinación con tinción separada del DNA y las proteínas de los cromosomas metafásicos. Este modelo (figura 8) considera que durante la condensación se forman lazos del soleinoide los cuales son estabilizados por una proteína, probablemente una

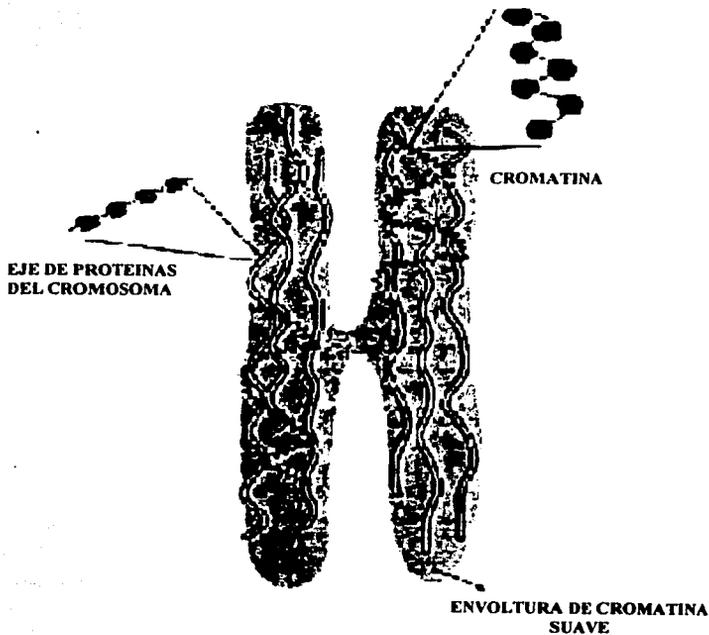


FIGURA 7. MODELO PROPUESTO POR WOODCOCK PAR LA ESTURTURA DE ORDEN SUPERIOR DEL CROMOSOMA (42)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

33-A

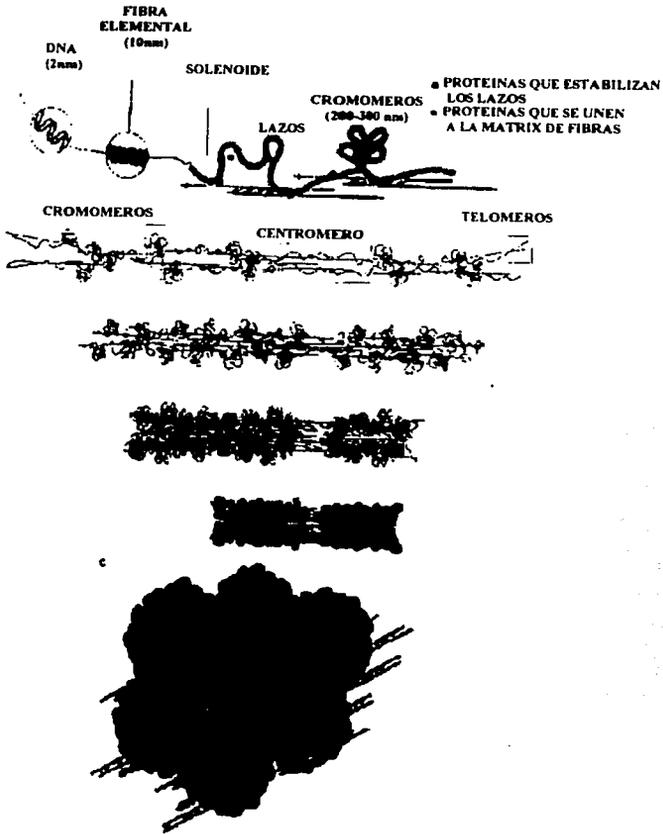


FIGURA 8. MODELO PROPUESTO POR WANNER PARA LA ESTRUCTURA DE ORDEN SUPERIOR DEL CROMOSOMA (5)

33-B

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

topoisomerasa o un miembro de la familia SMC, grupos de cerca de 50 lazos forman los cromómeros con diámetro de 200-300 nm. Durante la condensación el cromosoma se va acortando y engrosando cuando más y más cromómeros se van formando. Esto causa por razones estéricas una tensión vertical a la dirección del eje lo cual fuerza a las cromátidas hermanas a apartarse y ser finalmente separadas.

### 1.3. REGIONES ESPECIALIZADAS DE LA CROMATINA.

La cromatina a lo largo de los cromosomas presenta modificaciones en su estructura, las cuales originan regiones especializadas con funciones específicas. Dentro de éstas se encuentran los telómeros y los centrómeros que participan en procesos como : condensación y segregación cromosómica (53).

#### 1.3.1. TELÓMEROS.

Los telómeros son estructuras nucleoproteicas, localizadas al final de un cromosoma lineal, poseen propiedades muy características como localización en la periferia del núcleo, apariencia física de racimos y una estructura diferente del nucleosoma para su cromatina (54,55).

Los telómeros realizan dos funciones ampliamente conocidas, la primera de ellas es mantener el largo de los cromosomas, dada la inhabilidad de la DNA polimerasa para replicar los extremos del DNA lineal y la segunda es distinguir el final de los cromosomas de una ruptura de la doble cadena de DNA, al formar una capa protectora que evita

la fusión extremo-extremo. Actualmente se les ha asociado además con procesos como la organización nuclear y el apareamiento meiótico, entre otras funciones (54,55).

Los telómeros de distintos eucariontes muestran un DNA con características conservadas. Este consiste de secuencias cortas repetidas, que contienen trectos típicos de 3 o 4 guaninas en una cadena y trectos de citosinas en la cadena complementaria, lo que produce una cadena rica en G y otra rica en C, como por ejemplo T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>/C<sub>3</sub>TA<sub>2</sub> en los telómeros humanos. La cadena rica en G se extiende para formar una horquilla o asa de cadena simple con 12-16 nucleótidos. Esta asa en los protozoarios ciliados existe durante la mayor parte del ciclo celular y en *S. cerevisiae* se presenta durante la fase S, al mismo tiempo que el DNA es replicado. La presencia de trectos de homo purinas le da a la horquilla G la posibilidad de adoptar conformaciones de DNA diferentes del DNA-B, dándole la capacidad de empaquetarse en estructuras cuádruples de guanina o formar complejos multicadenas que pueden adquirir diversas conformaciones. Aún no está establecido si estas conformaciones existen *in vivo*, pero lo más probable es que se establezcan en una etapa particular del ciclo celular. Se ha propuesto que la horquilla G en eucariontes superiores es importante para controlar la actividad de la telomerasa, promover interacciones telómero-telómero durante la meiosis, influenciar el acortamiento de los telómeros y unir los cromosomas a sitios nucleares específicos (54-56).

Los telómeros poseen un DNA que es sintetizado en forma específica por una transcriptasa reversa llamada telomerasa, la cual elonga la cadena rica en G a partir de trectos

preexistentes, con el fin de compensar la progresiva reducción del DNA por la replicación incompleta del final del cromosoma. La telomerasa se puede considerar una ribonucleoproteína por su componente de RNA. En algunos ciliados, levaduras, ratones y humanos el RNA actúa como un template para la adición de nuevo DNA en los telómeros. Se ha observado que la actividad de la telomerasa coincide en tiempo con la replicación del DNA en telómeros lo que hace suponer que estos dos procesos están acoplados mecánicamente. Por otra parte se ha encontrado que en células de mamíferos existen mecanismos independientes de telomerasa para mantener los telómeros tales como la recombinación homóloga (54,56).

La telomerasa se encuentra activa en las células germinales de muchos vertebrados y al inicio del estado embrionario, pero permanece inactiva o reprimida en células somáticas, lo que produce el acortamiento de los telómeros y el envejecimiento celular. La presencia de oncogenes virales o algunas mutaciones somáticas que bloquean el envejecimiento celular ocasionan que las células continúen dividiéndose y erosionando los telómeros, esta erosión de los telómeros conduce probablemente a la activación de la telomerasa. La activación de la telomerasa parece ser necesaria para sostener el crecimiento de muchos tumores humanos, esta idea es apoyada por el hecho de que el 85% de más de 1000 biopsias de tumores malignos estudiadas muestran la presencia de telomerasa activa (57).

### 1.3.2. CENTRÓMEROS.

Los centrómeros son estructuras dentro del cromosoma que realizan diversas funciones, son el sitio final de unión entre cromátidas hermanas durante la mitosis, son la región donde se forman los cinetocoros encargados de unir los microtúbulos, regulan el movimiento de los cromosomas en la mitosis y actualmente se ha propuesto su participación como puntos de control en el ciclo celular. La participación de los cinetocoros como puntos de control se apoya en la observación de que muchas células durante la mitosis, en las cuales los centrómeros no han alcanzado una orientación correcta, envían una señal que demora el ciclo, al parecer los cinetocoros son capaces, de alguna manera, de sentir la tensión producida por una unión bipolar estable y en ausencia de ésta transmiten una señal inhibitoria que detiene la transición metafase-anafase. En humanos la microinyección de anticuerpos contra proteínas centroméricas también causa un retraso en la mitosis (58,59).

Los centrómeros están compuestos por DNA con gran variedad en secuencia y tamaño entre diferentes especies, sólo existe una secuencia que se conserva entre primates y roedores que es el sitio de unión para la proteína CENP-B, llamada caja CENP-B de 17 bp. Los centrómeros en los humanos están formados por DNA  $\alpha$ -satélite, un repetido en tandem rico en A-T de 171 bp, al cual se le ha asociado con las funciones específicas de los centrómeros. La participación del DNA  $\alpha$ -satélite en la funcionalidad de los centrómeros fue estudiada por Sun y colaboradores (60) utilizando centrómeros de minicromosomas de *Drosophila*, determinando que el DNA  $\alpha$ -

satélite en estos organismos y probablemente en eucariontes multicelulares no es ni necesario, ni suficiente para la función de los centrómeros. Ellos proponen que la función de los centrómeros sea realizada por la formación de una estructura de orden superior específica, es decir un conjunto tridimensional organizado que resulta de una arquitectura del DNA y/o interacción específica de proteínas y DNA en el centrómero.

Existen tres grupos de proteínas centrómericas. El primero son proteínas asociadas con el centrómero a través del ciclo celular (CENP A, B, C y D), el segundo son las asociadas transitoriamente (CENP E y F) y el tercero son las INCEPs o proteínas internas del centrómero (61).

CENP-A es una variante de H3 la cual copurifica con partículas del corazón del nucleosoma y que se cree que reemplaza a H3 dentro del tetrámero  $(H3/H4)_2$ . Se ha descubierto que la proteína CENP-A posee un sitio blanco para las proteínas que se asocian a centrómero, lo que hace suponer que CENP-A, se produjo por la necesidad de tener una estructura nucleosomal específica donde el sitio N-terminal pueda tener un contacto selectivo con otros componentes del centrómero, tales como las proteínas CENP-B y CENP-C. El soporte experimental de esta hipótesis viene de trabajos genéticos con *S. cerevisiae*, donde un homólogo de CENP-A, CSF4 es esencial para una segregación correcta de las cromátidas hermanas. Esto sugiere que los nucleosomas que incluyen CENP-A ensamblan un sitio cromosómico diferenciado, que puede servir para facilitar la unión de los cinetocoros y la función de los centrómeros en la segregación cromosómica(61).

CENP-B y CENP-C son grandes proteínas hidrofílicas que tienen la capacidad de unirse al DNA, en el caso de CENP-B se sabe que se asocia principalmente con tubulina y CENP-C se ha encontrado presente sólo en los cinetocoros activos durante la mitosis, probablemente para dar estabilidad (61).

El segundo grupo lo forman las proteínas que se asocian transitoriamente con el centrómero, entre estas se encuentran CEP-E y CEP-F, las cuales se han localizado en la placa externa de los cinetocoros y la corona fibrosa. Estudios con anticuerpos, han determinado que se encuentran sólo en centrómeros activos. CENP-E es una proteína con un sitio para la unión de kinesina localizado próximo al extremo amino. La microinyección de anticuerpos para CEP-E ha mostrado que interfiere con el movimiento apropiado de los cromosomas en metafase, detiene el inicio de la anafase y bloquea el movimiento independiente de ATP de los cromosomas, manejado por despolimerización de microtúbulos. Estos resultados sugieren un papel de CEP-E en el mantenimiento de las uniones de microtúbulos (62).

El mecanismo por el cual estas proteínas están ausentes en los cinetocoros inactivos, no está aún bien clara, se ha propuesto la existencia de un factor organizador, la pérdida del cual produce a gran escala la eliminación de la estructura externa de los cinetocoros, un candidato para esta función es CENP-C, una proteína necesaria para mantener el tamaño y estabilidad de los centrómeros y que interactúa con el DNA (62)

El último grupo de proteínas que se unen a centrómeros son las INCEPs. Estas proteínas unen a las cromátidas

hermanas en el dominio de apareamiento del centrómero y en las regiones donde las cromátidas están en contacto. Las INCEPs son liberadas al inicio de la anafase, por lo cual se ha sugerido que realicen una función en la regulación del apareamiento entre cromátidas hermanas (62).

La estructura de orden superior de los centrómeros fue estudiada por Strissel y colaboradores (63), mediante hibridación DNA-DNA tipo Southern e hibridación in situ fluorescente (FISH) en extractos de cromosomas metafásicos, utilizando sondas de DNA considerado como SAR. Sus resultados mostraron que posiblemente las regiones centroméricas de muchos, sino es que de todos los cromosomas metafásicos, son regiones donde los cromosomas contienen lazos de cromatina más pequeños en tamaño que en los brazos y donde los SAR están concentrados. Este agrupamiento de SAR es responsable en parte del compacto empaquetamiento de la cromatina asociada con la constricción primaria de las regiones centroméricas y parecería que éste les confiere propiedades estereo-físicas, básicas para la realización de las funciones de los centrómeros.

#### 1.4. TÉCNICAS DE BANDEO

Las técnicas de bandeo son un grupo de métodos que producen una tinción diferencial de los segmentos adyacentes de los cromosomas, es decir producen zonas claras u oscuras bien definidas a lo largo de los cromosomas. El patrón originado por estas técnicas es reproducible, de tal manera que nos permite detectar alteraciones estructurales a lo

largo de los cromosomas, haciéndolas valiosas herramientas para el diagnóstico clínico (64).

#### 1.4.1.BANDAS Q.

La técnica de bandas QFQ (bandas Q por Fluorescencia usando Quinacrina) fue descrita por Carperson y colaboradores (69) y consiste en introducir las laminillas en una solución de quinacrina, después lavarlas con amortiguador y observarlas en un microscopio de fluorescencia con un filtro adecuado a una longitud de onda de 450-500 nm (64).

Esta técnica tiene la desventaja de que las laminillas teñidas con quinacrina no son permanentes, después de una exposición fotomicrográfica la fluorescencia se desvanece. Sin embargo, este método tiene como ventajas el hecho de ser muy simple, rápido y de confianza, sin la necesidad de envejecimiento o pretratamiento de las laminillas (64,65).

El patrón de bandas que se genera es muy similar al de bandas G (figura 9), pero con algunas variantes, la región distal del brazo largo del cromosoma Y es mucho más brillante, la región pericentromérica de los cromosoma 3 y 4 y la región pericentromérica y satélite de los cromosomas acrocéntricos presentan polimorfismos. Esto hace que la técnica se pueda utilizar para reconocer variaciones polimórficas en estas regiones (64,65).

Se han propuesto diferentes teorías para explicar el patrón de bandas generado, la primera fue propuesta por Carperson y colaboradores quienes supusieron que la brillantez de determinadas zonas se debía a la presencia de

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

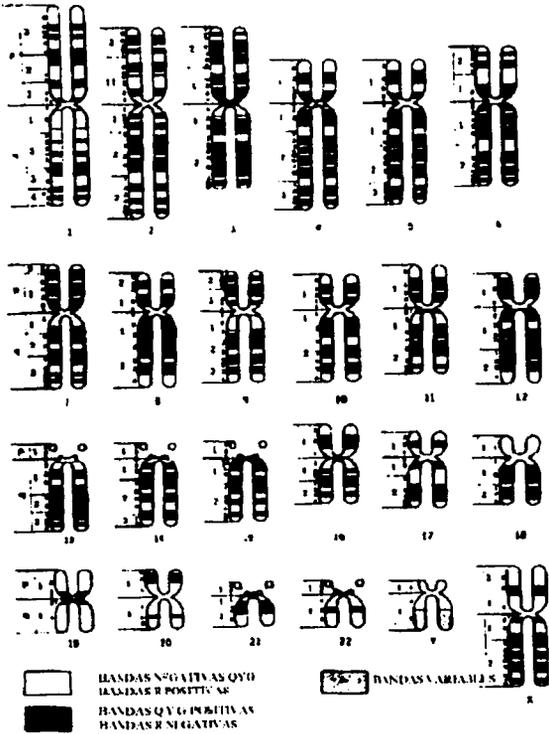


FIGURA 9. DIAGRAMA DE BANDAS DEL CARIOTIPO HUMANO DE ACUERDO A LA CONFERENCIA DE PARIS DE 1971 (65)

una mayor concentración de bases GC. Sin embargo, esto fue rechazado al aplicar estudios de inmunofluorescencia que demostraron el aumento de brillantez en segmentos ricos en AT y que por otra parte las constricciones secundarias ricas en AT de los cromosomas humanos no muestra fluorescencia brillante. Otra propuesta es que la distribución de las proteínas de la cromatina, en especial las no histonas y el empaquetamiento de la fibra de cromatina sean las causas principales de la formación de estas bandas (64). Una explicación más completa del fenómeno de bandeo es la propuesta por Saitoh y Laemmli (43), en la cual las bandas son el resultado de la diferencia en el tamaño y organización de los lazos de cromatina y de la ruta de empaquetamiento que sufre la columna AT en las bandas G/Q y R.

#### 1.4.2. BANDAS G.

Las bandas G pueden ser generadas por tratamientos diversos como la desnaturalización controlada en una solución salina citratada a 60°C, el tratamiento con detergentes o enzimas proteolíticas como la tripsina bandas GTG (bandas G por Tripsina usando Giemsa) o quimiotripsina y una posterior tinción con Giemsa (64,65).

Estas técnicas de bandas presentan ciertas ventajas comparadas con las bandas Q, ya que tienen mayor resolución y son permanentes. Las características de las bandas G han facilitado su aplicación en varios campos como la genética clínica humana, la botánica y la zoología (66,67). Actualmente esta técnica puede combinarse con otros métodos

como son las técnicas de alta resolución y la hibridación *in situ* (68).

El patrón de bandas generado por estos métodos es esencialmente el mismo que el de bandas Q a excepción de las regiones centroméricas de los cromosomas y las constricciones secundarias de los cromosomas 1 y 16, que se tiñen más oscuro. La región distal del brazo largo del cromosoma Y se tiñe menos intensamente (69).

Las diferentes explicaciones para la existencia del patrón de bandas G consideran que las bandas se encuentran ya presentes en los cromosomas debido a la forma de organización de la fibra de cromatina en las bandas G y R y que las técnicas al desnaturalizar proteínas sólo las ponen de manifiesto (64).

#### 1.4.3. BANDAS R

La técnica de bandas R consiste principalmente en el tratamiento de las laminillas con álcali y calor (80-90°C) para producir una desnaturalización en los cromosomas y subsecuente tinción con Giemsa, bandas RHG (bandas R por Calentamiento usando Giemsa) o naranja de acridina, bandas RFA (bandas R por Fluorescencia usando Acridina) (64,70).

Las bandas producidas por este método son el reverso del patrón de bandas Q y G, es decir que en éstas aparece oscuro lo que en las otras aparece claro y viceversa. Las bandas R son preferidas por algunos laboratorios de citogenética clínica por ofrecer la ventaja de que las regiones teloméricas de muchos cromosomas, que tiñen claro en bandas

Q/G se tiñen oscuras en bandas R, permitiendo detectar deleciones y translocaciones en estas regiones (69,70).

Algunas de las teorías propuestas para explicar el mecanismo de obtención de bandas R consideran que se originan por el contenido rico en AT del DNA de las bandas G, el cual sufre una desnaturalización más rápida por el tratamiento, dejando en su estado nativo al DNA rico en GC de las bandas R o bien que las proteínas asociadas a este DNA rico en AT sufran una desnaturalización (64). Las teorías que tratan de explicar las bandas generadas por diversas técnicas pueden ser complementarias y no excluyentes, ya que al parecer el contenido de DNA, el empaquetamiento de la cromatina y las proteínas asociadas a DNA, forman segmentos específicos en el cromosoma, los cuales poseen características que les proporcionan un potencial de tinción distinto y que se pone de manifiesto por diferentes pretratamientos (43).

#### 1.4.4. BANDAS C

La técnica de bandas CBG (bandas C usando hidróxido de Bario y Giemsa) consiste en someter los cromosomas a un tratamiento primero con ácido (HCl), después con álcali (hidróxido de Bario) y soluciones salinas (2xSSC) y calor (60°C), antes de la tinción con Giemsa (69).

Las bandas C tienen muchas aplicaciones clínicas, pueden ser usadas como marcadores en una familia, utilizarse para detectar puntos de ruptura o translocaciones que incluyan la región centromérica, así como para identificar la región distal del brazo largo del cromosoma Y. (64)

Las bandas C ponen de manifiesto la heterocromatina de las regiones centroméricas de los cromosomas y la porción distal del brazo largo del cromosoma Y. Con esta técnica se pueden observar polimorfismos en los cromosomas 1, 9, 16 y el brazo largo del cromosoma Y (65,69).

Se han propuesto principalmente dos teorías que tratan de explicar la obtención de bandas por esta técnica. La primera de ellas considera que las bandas se originan por la rápida renaturalización del DNA altamente repetitivo de los centrómeros, sin embargo, esta teoría tiene en contra la presencia de bandas C positivas en regiones con DNA no repetitivo. La segunda propuesta considera que las bandas C se deben a la presencia de proteínas específicas no histonas que impiden la desnaturalización, fragmentación y pérdida del DNA. Esta teoría se apoya en la observación de proteínas específicas en las regiones centroméricas, como la variante de las histonas CENP-A y las proteínas CENP-B y CENP-C, las cuales les confieren características estructurales específicas (64,71).

Kunze y colaboradores (72) estudiaron la formación de bandas C utilizando cromosomas de *Mus musculus*, los cuales poseen un sitio citogenéticamente polimórfico para una banda C. Sus observaciones mostraron que se requiere de una cantidad mínima de 10.5-17.5 Mb para que esta región tiña como banda C positiva, de lo contrario aparece como banda C negativa. Estos resultados hacen suponer que cantidades menores de repetidos no son detectados como bandas C por limitaciones de la técnica y no por diferencias en la estructura de la cromatina. Sin embargo, Kunze y colaboradores(72) también mencionan que no es suficiente un

número grande de repetidos para producir bandas C, también deben contar con secuencias que tengan capacidad para formar una estructura específica de la heterocromatina constitutiva.

#### 1.4.5. BANDAS T

El método de bandas THG (bandas T por Calentamiento usando Giemsa) es una modificación de la técnica de bandas R, puede realizarse introduciendo la laminilla en una solución amortiguadora de fosfatos a pH 6.5 a 87 °C o bien incubando por 20-60 min. en una solución salina balanceada de Earle a 87°C. El método de bandas T pone de manifiesto las regiones teloméricas de los cromosomas (65,69).

Se cree que las bandas T se producen en parte por una desnaturalización más rápida del DNA rico en AT, el cual pierde su afinidad por el Giemsa. Por otro lado al incrementar el tiempo de tratamiento con calor, las bandas R gradualmente se destiñen permaneciendo sólo las bandas T más ricas en GC (64).

Dentro de estas bandas se han encontrado la mayor parte de los genes y oncogenes mapeados, por lo que la detección de cambios estructurales dentro de estas regiones por las técnicas de bandeo es importante para el diagnóstico citogenético (64,69).

#### 1.4.6. CARACTERISTICAS DE LAS BANDAS.

Las técnicas de bandeo antes descritas ponen de manifiesto diferentes regiones a lo largo del cromosoma con

características específicas, lo cual hace considerar que las bandas obtenidas por estas técnicas no sólo representan las propiedades de tinción de una región, sino que también señalan áreas con funciones, composición y estructura específica (64).

Una característica observada de las bandas G/Q y R es el proceso que las origina, estas bandas se forman por la condensación que presenta la cromatina para pasar de la replicación a la mitosis. El proceso de condensación fue estudiado por Drovin y colaboradores (73), utilizando cuatro diferentes técnicas de bandeo GTG, GHG, RHG y THG, para seguir el paso de profase (1,250 bandas) a metafase tardía (300 bandas). Sus resultados mostraron que las 300 bandas que se observan en la metafase tardía, principalmente resultan de la fusión progresiva de numerosas bandas pequeñas llamadas sub-bandas, las cuales aumentan su ancho y acortan su longitud, lo que favorece su agrupamiento. En la mayoría de los casos dos bandas mayores que limitan a una menor se funden para dar una banda principal. La fusión de las bandas no se da en forma sincronizada y se ha observado que hay algunas bandas que sólo se contraen y no se fusionan. Por otra parte la condensación parece darse preferencialmente en los brazos largos más que en los cortos, se condensa primero la cromatina de replicación tardía de las bandas G y las bandas R de replicación temprana se condensan menos.

Por otra parte las bandas G y R no sólo muestran diferencias en su proceso de condensación, Holmquist y colaboradores (74) realizaron una investigación que reunió un conjunto de características específicas de cada tipo de bandas y que permitió clasificar la cromatina de las bandas

en cinco sabores de acuerdo a la composición de bases y la localización de secuencias: un sabor para las bandas G y cuatro diferentes para las bandas R, las típicas R (GTG-, Alu-, GC-), las (GTG-, Alu+, GC+), las (GTG- Alu-, GC+) y las (GTG- Alu+, GC+) (figura 10). Los dos últimos grupos forman las bandas T.

Los resultados obtenidos mostraron características individuales para cada tipo de bandas. Las bandas G/Q mostraron tener un contenido más rico en AT, aun cuando éste sólo es de un 3.2%, son escasamente sensibles a DNAsas, poseen pocos puntos de ruptura y rearrreglos, contienen un número pequeño de genes y éstos generalmente son tejido específicos, son pobres en secuencias Alu, ricas en Ll y su replicación es tardía (74).

En relación a las bandas R, Homquist y colaboradores (74) mencionan que dentro de los cuatro sabores que las forman, se encuentran todos los genes de mantenimiento "housekeepings" y la mitad de los genes tejido específicos, todos ellos de replicación temprana y con islas CpG. Las bandas R también se caracterizan por sensibilidad a DNAsas y por la presencia de un número mayor de rupturas y rearrreglos comparadas con las bandas G, así como una replicación temprana.

Las bandas T fueron divididas por Holmquist y colaboradores (74), de acuerdo a las secuencias que contienen en dos grupos: ricas en Alu y GC y las no ricas en Alu pero ricas en GC. Dentro de estas bandas se ha encontrado la mayor parte de los genes y oncogenes mapeados, así como los puntos de ruptura que producen cáncer y los cambios cromosómicos asociados con algunas neoplasias, lo mismo que la mayor parte

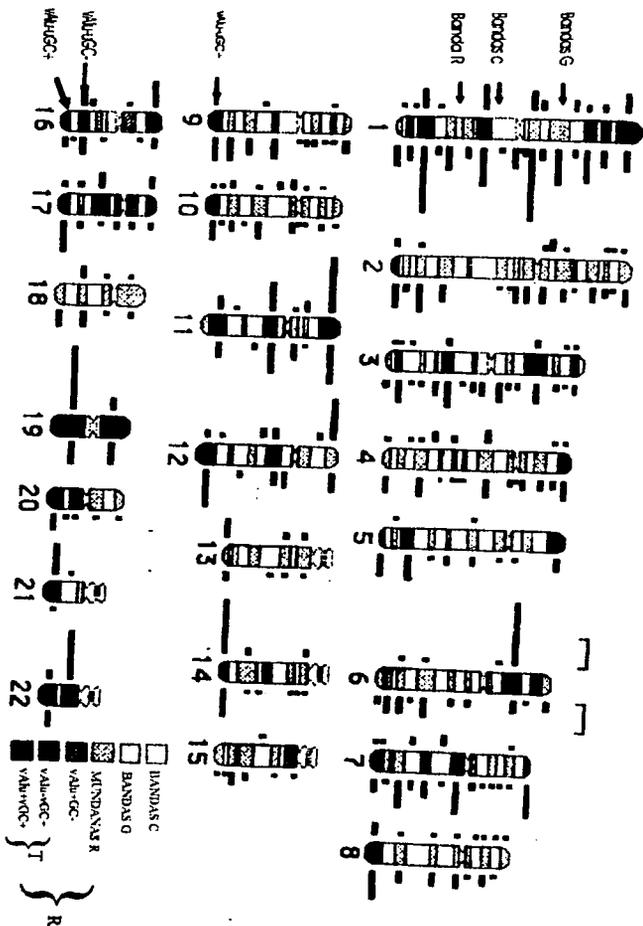


FIGURA 10. PATRON DE BANDAS PARA LOS CROMOSOMAS HUMANOS METAFISICOS, CON LOS CINCO SABORES PROPUESTOS POR HOLMSQUIST (74)

de las rupturas inducidas por rayos X, quiasmas meióticos y rearrreglos de la evolución.

Gardiner (75) retoma los trabajos de Holmquist sobre los sabores de la cromatina, pero también menciona otros trabajos en los cuales se mapeo la composición de bases de 21q y Xq26-q28, con el propósito de analizar la densidad de islas CpG y el contenido de Alu y L1 (76,77). En estos trabajos se observó que las bandas R con alto nivel de GC (50%) tenían una alta densidad de islas CpG y las bandas con bajo nivel de GC tenían baja frecuencia de islas CpG, sin embargo, las bandas con contenido moderado de GC, presentaban variedad en la densidad de islas, así como el contenido de Alu y L1, no mostrando variaciones extremas entre estas bandas R y las G, lo cual es contrario a lo predicho en estudios anteriores. La reunión de estos datos sugiere que a nivel de 10 a pocos cientos de kilobases la relación entre la composición de bases, densidad de islas CpG y contenido de repetidos son bastante variables dentro de las bandas R.

Por otra parte Gardiner (75) menciona que los estudios realizados en 6p, región donde se localiza el complejo principal de histocompatibilidad, así como en Xq28 y 21q, muestran un agrupamiento y organización de genes en fragmentos de aproximadamente 100 Kb, que recuerdan los lazos de DNA propuestos por Saitoh y colaboradores (43). Aunque no se ha establecido claramente la relación entre las funciones de estos grupos de genes, se ha propuesto que este agrupamiento debe permitir un control regional o temporal de la transcripción. En el cromosoma 21, más del 90% de los genes mapean dentro de la porción distal del brazo largo, correspondiente a una banda R (21q22), mientras que la banda

G (21q21) contiene el 40% del DNA del brazo largo, pero menos del 5% de los genes. Esto parece coincidir en todas las bandas G (75).

Las bandas G como se ha mencionado contienen una gran proporción de DNA y pocos genes, esto ha hecho preguntarse que función tiene el 95% del DNA que no codificante, la primera propuesta es que sea DNA chatarra sin ninguna función. Sin embargo, existen estudios que apoyan lo contrario, por ejemplo, se ha observado que la secuencia de 100 Kb del receptor de células T de humano y ratón está altamente conservada no sólo en la secuencia codificante, lo cual hace suponer que dentro del DNA no codificante existe información específica. Por otra parte, el examen de secuencias de DNA como palabras de 3-8 Kb, utilizando estadísticas que se aplican a un lenguaje natural, mostró que el DNA que no codifica presenta un orden que hace suponer que contenga información en otro lenguaje distinto al del DNA que codifica para una proteína (75).

## 1.5. APLICACIONES CLÍNICAS

La citogenética es una herramienta fundamental en el diagnóstico de enfermedades genéticas, adquirió una mayor importancia durante los años sesenta cuando aumentó la observación de la correlación cariotipo-fenotipo (78,79).

Las enfermedades cromosómicas detectadas por citogenética, presentan una prevalencia de 1:150 o 1:200 recién nacidos vivos, son una causa significativa de retraso mental (especialmente cuando se asocia a características dismórficas) y de amenorrea primaria (50%). Las anomalías cromosómicas también son la causa del 60% de los abortos espontáneos en el primer trimestre (80).

Los padecimientos cromosómicos pueden ser originados por anomalías numéricas o estructurales. Dentro de las anomalías numéricas se encuentran las poliploidías, que se presentan cuando el número de cromosomas es un múltiplo del número haploide y mayor al número diploide y las aneuploidías que se presentan por exceso o pérdida de uno o más cromosomas. Muchas anomalías numéricas se presentan esporádicamente, por lo que los padres del paciente tendrán un cariotipo normal. Las aneuploidías de autosomas más frecuentes responsables de síndromes clínicos específicos son las trisomías 21, 13 y 18 y en los de cromosomas sexuales son 47,XXY y 47,XYY en masculinos y 45,X en femeninos (78,81,82).

Las aberraciones estructurales incluyen deleciones, translocaciones, duplicaciones, inversiones, isocromosomas y cromosomas en anillo. Las deleciones se deben a una ruptura o pérdida de un segmento de un cromosoma. Las translocaciones son producto de la ruptura de dos cromosomas, con transferencia y fusión del fragmento roto de un cromosoma a otro. Las duplicaciones se originan por un entrecruzamiento desigual entre las cromátidas durante la meiosis originando la duplicación de un segmento en el cromosoma. Las inversiones son consecuencia de dos rompimientos en un mismo

cromosoma, donde el segmento que se forma se invierte antes de volverse a unir. Los cromosomas en anillo se producen por dos rupturas en un mismo cromosoma, en el cual los extremos se pegan y forman un anillo. Los isocromosomas se originan por la división anormal del centrómero durante la mitosis, produciendo que un brazo se pierda y el otro este duplicado o por un evento anormal de cromátidas hermanas o cromosomas homólogos (78,81).

Cuando se presenta un rearrreglo estructural siempre debe identificarse si es *de novo* o si es heredado de uno de los padres, si este es el caso debe tratarse de determinar la naturaleza del arreglo e identificar otros miembros de la familia que sean portadores del mismo. Pueden encontrarse rearrreglos balanceados en los padres de un paciente con translocación no balaceada y en parejas con pérdidas recurrentes del embarazo o infertilidad. También pueden presentarse mosaicos cromosómicos en los cuales un individuo posee dos líneas celulares cada una diferente en su constitución cromosómica. Por último los cromosomas en anillo pueden ser más difíciles de identificar debido a la variación en su estabilidad y en las células en que se encuentra (78,81).

El diagnóstico citogenético es importante para que el médico conozca las posibles manifestaciones de la enfermedad al nacimiento, durante la niñez y en la adolescencia, las principales indicaciones clínicas para un análisis citogenético son: retraso en el desarrollo, retraso mental, anomalías múltiples congénitas, características dismórficas, ambigüedad o anomalía genital, desarrollo sexual anormal, infertilidad, desórdenes del crecimiento,

sospecha de algún síndrome cromosómico y diagnóstico prenatal (80).

El diagnóstico citogenético se apoya en una serie de técnicas, algunas de las cuales se han modificado con los avances tecnológicos. Dentro de estas técnicas se encuentra el raspado bucal. Este método se ha usado principalmente para la detección rápida de cromatina sexual, ya que una masa de cromatina sexual (cuerpo de Barr) representa al cromosoma X inactivo. El número de cuerpos de Barr es igual al número de cromosomas X menos 1. Otra aplicación del raspado bucal es la tinción con quinacrina, que produce una zona de fuerte brillantez en el brazo largo del cromosoma Y (cromatina Y), que es más visible en células en interfase. Esta técnica se usa principalmente cuando se quiere llegar al diagnóstico asociado a condiciones de anormalidad o ambigüedad genital y en caso de desarrollo sexual anormal. Sin embargo, estas son solo pruebas presuntivas del complemento cromosómico sexual y siempre debe confirmarse con un cariotipo (79).

Una técnica fundamental para el avance de la citogenética fue la realización del cariotipo. Esta consiste en aplicar a un cultivo celular, un tratamiento con fitohemaaglutinina y soluciones de colchicina e hipotónicas antes de fijar. El grupo de células estudiadas se bioquean en la etapa de metafase del ciclo celular, posteriormente se rompe la membrana celular y subsecuentes procesos y tinción permiten visualizar claramente los cromosomas de una célula de un individuo. La obtención del contenido completo de cromosomas permite identificar a los cromosomas por su tamaño y la posición del centrómero lo que hace posible

clasificarlos en grupos pero no identificarlos individualmente (65,69).

Otras técnicas importantes para la citogenética son las de bandeo, éstas se desarrollaron en los 70', al aplicar métodos de tinción diferentes como la fluorescencia (bandas Q) y técnicas de desnaturalización (bandas G) (79). Por medio de éstas fue posible identificar y conocer la arquitectura de cada cromosoma humano, así como detectar anomalías estructurales como translocaciones, deleciones y duplicaciones. Una banda de un cromosoma metafásico obtenida por estas técnicas corresponde a 7.5 Mb, por lo cual con estos métodos es posible detectar deleciones o duplicaciones en el rango de 5-10 Mb. Debido a las características antes mencionadas las técnicas de bandeo son de amplio uso en el diagnóstico citogenético, generalmente para el inicio de un análisis se emplean las bandas G y si se tiene duda del diagnóstico obtenido por esta técnica o bien si se sospecha de un sitio específico donde se presente la aberración, se utilizan técnicas de bandeo que pongan de manifiesto esa región, por ejemplo bandas C, R, T ó NOR (81).

Otra técnica citogenética es la utilizada para la detección del síndrome del X frágil, este método consiste en el empleo de un medio de cultivo carente o con antagonistas del ácido fólico, con el cual se produce la manifestación de un sitio frágil en Xq27.3(86). Con la aplicación de técnicas directas de DNA para el gen del síndrome de X frágil (*FMR-1*) su uso ha disminuido. La aplicación de esta técnica es recomendada en pacientes masculinos con RM no dismórficos, autistas o individuos con historia familiar de RM ligado al X (79).

La citogenética también cuenta con métodos como las técnicas de alta resolución, las cuales implican la sincronización del cultivo de células, para obtener una población rica en profases o prometafases, cuando los cromosomas se encuentran menos condensados. La aplicación de técnicas de bandeado de alta resolución revela una mayor cantidad de bandas, mientras una célula típica en metafase contiene de 400-500 bandas por genoma haploide, las preparaciones de cromosomas sincronizadas hacen posible visualizar 1,000-2,000 bandas. Este estudio se aplica en circunstancias en las cuales una región particular del cromosoma se estudia en gran detalle, ya que no es posible aplicar alta resolución a todos los estudios cromosómicos por el trabajo que requiere y la dificultad del análisis. Una de sus mayores aplicaciones es para el diagnóstico de síndromes de genes contiguos, en los cuales el padecimiento se debe a una microdelección o duplicación de un segmento cromosómico que incluye múltiples genes, cada uno de los cuales contribuye al fenotipo, como por ejemplo en los síndromes de Miller-Dicker, DiGeorge y Prader-Willi o Angelman (78,79,81).

La técnica de alta resolución que produce 1000 bandas, tiene una sensibilidad para detectar deleciones o duplicaciones en un rango de 2-3 Mb. En los casos donde las anomalías estructurales son más pequeñas es recomendable utilizar técnicas citogenéticas moleculares como la hibridación *in situ* fluorescente (FISH), con una sensibilidad que detecta deleciones submicroscópicas de menos de 3Mb. Este método consiste en la hibridación de una sonda específica marcada con el DNA desnaturalizado en preparaciones de cromosomas en metafase, en células en

interfase o secciones de tejidos fijadas. Las sondas marcadas de DNA incluyen sondas de secuencias únicas, secuencias repetitivas o bien de una biblioteca de un cromosoma particular. Dependiendo de las sondas, esta técnica puede ser utilizada para detectar el número de copias de un cromosoma específico, identificar los derivados o cromosomas marcadores y detectar microdelecciones y translocaciones crípticas (81). Una modificación de esta técnica es el Múlti FISH ó M-FISH el cual permite visualizar a los 22 autosomas y los 2 cromosomas sexuales cada uno con un color diferente. La técnica consiste en la hibridización de un grupo de sondas de DNA específicas para cada cromosoma marcadas con una combinación diferente de fluorocromos. El M-FISH permite detectar anomalías estructurales y numéricas de todos los cromosomas en un solo FISH. Se ha utilizado en algunos casos para: a) detectar cromosomas marcadores y determinar el contenido de heterocromatina del marcador, b) detectar anomalías estructurales como translocaciones o inserciones y demostrar que rearrreglos dentro de un cromosoma no contienen material de otro. Es importante notar que en el caso de rearrreglos intracromosómicos es necesario realizar bandas G ya que estos pueden escapar a la detección por M-FISH por lo que las bandas G clásicas continúan siendo indispensables. Sin embargo las técnicas de M-FISH tienen la desventaja del alto costo de las sondas y la necesidad de un equipo automatizado para poder integrar los diferentes colores (78,79,81, 83).

La utilización de las técnicas de bandeo en conjunto con las técnicas moleculares permite obtener una mayor información genética. Es posible establecer nuevos protocolos para el trabajo en laboratorio como el propuesto por Dawson y

colaboradores para determinar el origen de un cromosoma marcador, de inicio se realizan las bandas GTG, posteriormente las bandas C para detectar la presencia de centrómero en el marcador Y de acuerdo a los resultados se pueden obtener mas datos a partir de técnicas de bandeado específicas como bandas Q, bandas NOR, DAPI y con estos resultados poder realizar un estudio de FISH, para llegar a determinar el origen del marcador (83,84).

La citogenética realiza diversas funciones dentro del campo clínico, no sólo en la determinación de la etiología, diagnóstico y manejo de enfermedades cromosómicas, sino que también realiza un papel central en la elucidación del desarrollo de neoplasias. El primer hallazgo cromosómico en una neoplasia fue el cromosoma Filadelfia, el cual se describió completamente en 1973, estableciendo un modelo que sugiere la especificidad de cambios cromosómicos para producir condiciones neoplásicas. Las translocaciones en *loci* que involucran a los proto-oncogenes y genes tumor supresor permitieron comenzar a determinar la participación de éstos en la formación de neoplasias. El monitoreo citogenético está integrado en la mayor parte de las neoplasias como una evaluación básica en el diagnóstico y como una herramienta en su manejo. (80).

Las técnicas citogenéticas también se aplican en el diagnóstico prenatal. Este estudio debe realizarse en caso de edad avanzada de la madre, parejas con un producto previo con trisomía o una historia familiar con trisomía, parejas con rearrreglo estructural que presentan el riesgo de un producto no balanceado, parejas portadoras de un padecimiento hereditario, parejas con antecedentes de síndrome de X-frágil

y en el caso de que el ultrasonido o los metodos de tamizaje no invasivos provean indicios de alguna anormalidad cromosómica. Las muestras para el diagnóstico prenatal pueden ser de células de líquido amniótico, vellosidades coriónicas o del cordón umbilical (78).

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS.

### TÉCNICA PARA CARIOTIPO DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA

#### I. Cultivo de linfocitos.

1. Tomar sangre en condiciones asépticas con jeringa heparinizada.
2. Colocar 10 gotas de sangre heparinizada y 0.1 ml. de fitohemaglutinina en 5 ml de medio RPMI suplementado. Deben prepararse dos frascos por paciente.
3. Incubar el frasco a 37 °C durante 72 hrs.
4. Una hora y media antes de las 72 hrs. Adicionar 50µl, de colchicina al 0.02% y reincubar los frascos a 37 °C para completar el tiempo.

#### II. Cosecha de linfocitos.

1. Después de haber incubado una hora y media con colchicina, pasar el contenido de los frascos a tubos de centrifuga de 15 ml y centrifugar a 3500 rpm, durante 5 minutos.
2. Decantar el sobrenadante y resuspender el botón. Agregar 5 ml de solución hipotónica 0.075 M a 37 °C agitando en el vortex.
3. Incubar a 37°C durante 30 minutos. Pasados los 30 min. Centrifugar a 3000 rpm durante 5 min y decantar el sobrenadante.
4. Realizar la primera fijación añadiendo al botón resuspendido 5 ml de solución fijadora de Carnoy gota a gota con agitación.
5. Dejar reposar 15 minutos a temperatura ambiente

6. Pasado este tiempo centrifugar nuevamente y repetir el paso anterior cuantas veces sea necesario para obtener un botón blanco y un sobrenadanta transparente
7. Para hacer las preparaciones decantar el sobrenadante y adicionar aproximadamente 1 ml de fijador para resuspender el botón.
8. Tomar con una pipeta Pasteur la suspensión y dejar caer 3 gotas sobre cada laminilla perfectamente limpia y desgrasada. Dejar secar al aire.
9. Teñir las laminillas por cinco minutos con una solución de Giemsa. Lavar con agua común y dejar secar
10. Observar al microscopio con objetivo seco débil para ver la calidad y cantidad de las metafases y hacer más laminillas para técnica de bandeó.

#### TÉCNICA DE BANDAS GTG.

1. Las preparaciones cromosómicas del paso anterior se secan al aire y se dejan envejecer durante una semana.
2. Sumergir una laminilla en la solución de tripsina a temperatura ambiente durante 10 segundos
3. Pasado el tiempo lavar la laminilla en una solución amortiguadora de fosfato pH 6.8.
4. Teñir las laminillas por 3 minutos con Giemsa, lavar con agua corriente y dejar secar.
5. Ver algunas metafases con el objetivo de inmersión para observar las bandas producidas. De acuerdo a la observación determinar el tiempo adecuado de tripsina para el resto de las laminillas.

#### TÉCNICA DE BANDAS CBG.

1. Colocar las preparaciones cromosómicas en HCl 0.2 N. durante 30 minutos.
2. Transcurrido el tiempo lavar con agua destilada
3. Colocar las laminillas en  $Ba(OH)_2$  0.065 M. a 37°C durante 30 minutos.
4. Lavar con agua destilada a 37°C
5. Colocar las laminillas en una solución (2xSSC) a 60°C durante 2 hrs.
6. Lavar con agua destilada a 60°C y con agua corriente.
7. Secar y teñir con una solución de Giemsa durante 3 minutos.
8. Lavar con agua corriente y dejar secar.
9. Observar y analizar al microscopio.

#### TÉCNICA DE ALTA RESOLUCIÓN.

##### I. Cultivo de linfocitos.

1. En tubos de polipropileno se coloca de 10 gotas de sangre heparinizada en 5 ml. de medio RPMI640 suplementado. Se prepara por duplicado.
2. Incubar por 72 horas a 37 °C. Adicionar 0.05 ml de una solución de metrotexate  $10(-5)M$ .
3. Se mezcla bien para inducir la sincronía y se incuba a 37 °C por 17 horas.
4. Pasado este tiempo centrifugar a 3500 rpm durante 5 minutos. Decantar el sobrenadante y adicionar 5 ml. de solución Hanks y resuspender el botón en condiciones estériles. Repetir el lavado
5. Decantar el sobrenadante y adicionar 5 ml. de medio RPMI 1640 y 50  $\mu$ l de solución de BrdU. Incubar a 37°C por 5 horas.

6. Adicionar 50  $\mu$ l, de colchicina al 0.02%.

7. Incubar a 37 °C durante 15 minutos.

## II. Cosecha de linfocitos.

seguir los pasos de la cosecha de linfocitos de la técnica de cariotipo de linfocitos.

### TÉCNICA DE X-frágil.

Inducción de sitios frágiles usando medio deficiente en ácido fólico.

#### I. Cultivo de linfocitos.

1. En un tubo de polipropileno se colocan 10 gotas de sangre heparinizada, 0.1 ml de fitohemaglutinina en 5 ml. de medio de cultivo RPMI-1640 deficiente en ácido fólico suplementado.

2. Incubar por 96 horas a 37 °C.

3. Adicionar 0.2 ml de colchicina 0.02% 45 minutos antes de la cosecha.

#### II. Cosecha de linfocitos.

seguir los pasos de la cosecha de linfocitos de la técnica de cariotipo de linfocitos.

Inducción del sitio frágil usando fluorodesoxiuridina como inhibidor de la timidilato sintetasa.

#### I. Cultivo de linfocitos.

1. Tomar sangre en condiciones asépticas con jeringa heparinizada.

2. Colocar de 10 gotas de sangre heparinizada y 0.1 ml. de fitohemaglutinina en 5 ml de medio MacCoy 5A suplementado. Deben prepararse dos frascos por paciente.
3. Incubar el frasco a 37 °C durante 72 hrs.
4. Adicionar 0.1 ml. de Fluorodesoxiuridina de una solución de trabajo 10(-5) M a cada tubo.
5. Incubar 24 horas más a 37 °C.

## II. Cosecha de linfocitos.

seguir los pasos de la cosecha de linfocitos de la técnica de cariotipo de linfocitos

### 3. RESULTADOS

En las tablas 1-10 se muestran los resultados obtenidos. Se estudiaron en el servicio de Genética del Hospital General de México SSa; en el periodo de enero de 1995 a diciembre de 1996 un total de 1948 individuos, que incluyen casos índices, familiares, cónyuges y controles (tabla No.1). de los cuales se tomó muestra para estudio citogenético a 456 individuos (23.39%) y se analizó el 14.83%. El 4.51% no pudieron ser analizadas, porque el número de metafases fue insuficiente para realizar el estudio y en el 4.05%, se obtuvieron cromosomas con un patrón de bandas deficiente para poder integrar un diagnóstico.

El análisis de las causas por las que se realizó estudio citogenético (tabla 2) mostró como las más frecuentes al retraso en el desarrollo y/o mental y los síndromes asociados con éste. Para los estudios citogenéticos realizados en 1995 y 1996 el cariotipo normal fue el más frecuente representando el 71.62% (tabla 3). En los cariotipos con resultados anormales se presentaron con mayor frecuencia aberraciones en autosomas, principalmente asociadas a Síndrome de Down. Las aberraciones en cromosomas sexuales básicamente estuvieron presentes como causa de Síndrome de Turner (tablas 4 y 5).

La clasificación de los cariotipos por la presencia de aberraciones numéricas o estructurales, permite identificar a las aberraciones numéricas en autosomas, como las más frecuentes, ya que representan un 51.21% (tabla 6).

De las aberraciones en autosomas observadas en los cariotipos realizados a los pacientes en 1995 se observa a la trisomía 21 y las translocaciones robertsonianas como las más frecuentes con un porcentaje de 62.06% y 20.68% respectivamente. En el caso de los pacientes estudiados en 1996, la trisomía 21 sigue siendo la aberración numérica más frecuente, pero las translocaciones no robertsonianas fueron las aberraciones estructurales de mayor porcentaje (tabla 7 y 9).

Por otra parte las aberraciones cromosómicas sexuales encontradas más frecuentemente en los cariotipos realizados en 1995 y 1996, son las asociadas al síndrome de Turner, correspondiendo principalmente a la monosomía 45,X (tabla 8 y 10).

**TABLA No1**  
**RESULTADOS DEL TOTAL DE MUESTRAS A LAS QUE SE LES REALIZO**  
**ESTUDIO CITOGENÉTICO EN 1995-1996.**

ESTUDIOS CITOGENÉTICOS	1995		1996		TOTAL	
	No.	%	No.	%	No	%
No. DE PACIENTES DE 1ª VEZ DEL SERVICIO DE GENÉTICA	1141	58.57	807	41.42	1948	100
TOTAL DE MUESTRAS RECIBIDAS PARA ESTUDIO	277	100	179	100	456	100
CARIOTIPOS ANALIZADOS	153	55.23	136	75.97	289	63.37
MUESTRAS QUE NO CRECIERON	78	28.15	10	5.58	88	19.29
MUESTRAS NO ANALIZABLES	46	16.60	33	18.43	79	17.32

**TABLA No.2**  
**CAUSAS POR LAS QUE SE REALIZO ESTUDIO CITOGENÉTICO EN 1995-1996.**

CAUSAS POR LAS QUE SE REALIZO CARIOTIPO	PACIENTES 1995		PACIENTES 1996		TOTAL	
	No.	%	No.	%	No.	%
RETRASO EN EL DESARROLLO Y/O RETRASO MENTAL	30	10.83	26	16.20	56	12.28
Sx. DE DOWN	28	10.10	24	13.40	52	11.40
Sx. DE X-FRÁGIL	0	00.00	3	1.67	3	0.65
Sx. de PRADER WILLI	4	1.44	2	1.11	6	1.31
DESARROLLO SEXUAL ANORMAL						
SÍNDROME DE TURNER	13	4.68	21	11.73	34	7.45
SÍNDROME DE KLINEFELTER	1	0.36	5	2.79	6	1.31
SÍNDROME DE XYY	1	0.36	0	0.00	1	0.21
DISGENESIA GONADAL MIXTA	3	1.08	0	0.00	3	0.65
DISGENESIA GONADAL PURA	2	0.72	7	3.91	9	1.97
VARÓN XX	0	0.00	2	1.11	2	0.43
AMENORREA 1' Y 2'	6	2.16	6	3.35	12	2.63
AMBIGÜEDAD GENITAL	2	0.72	2	1.11	4	0.87
OTRAS CAUSAS	6	2.16	4	2.23	10	2.19
SOSPECHA DE ALGUN SÍNDROME EN ESPECIFICO						
RETINOBLASTOMA	5	1.80	0	0.00	5	1.09
ICTIOSIS LIGADA AL X del(Xp22.3-p21.3)	22	7.94	0	0.00	22	4.82
EXPOSICIÓN A AGENTES CLASTOGENICOS						
EXPOSICIÓN A RAYOS X E INDIVIDUOS CONTROL	5	1.80	3	1.67	8	1.75
EXPOSICIÓN A Co.	1	0.36	0	0.00	1	0.21
DEFECTOS CONGÉNITOS	20	7.21	12	6.70	32	7.01
PROBLEMAS DE LA CONCEPCIÓN						
ABORTO HABITUAL	27	9.74	14	7.82	41	8.99
ESTERILIDAD	8	2.88	8	4.46	16	3.50
EMBARAZO DE ALTO RIESGO	13	4.69	8	4.46	21	4.60
PADRES U OTROS MIEMBROS DE LA FAMILIA DEL CASO ÍNDICE	35	12.63	11	6.14	46	10.08
OTRAS CAUSAS	45	16.24	21	11.73	66	14.47
TOTAL	277	100	179	100	456	100

**TABLA No.3**  
**RESULTADOS DE LOS CARIOTIPOS REALIZADOS A LOS**  
**PACIENTES EN 1995-1996.**

RESULTADOS ENCONTRADOS	PACIENTES EN 1995		PACIENTES EN 1996		TOTAL	
	No.	%	No.	%	No	%
CON ABERRACIÓN DE LOS AUTOSOMAS	29	18.95	28	20.58	57	19.72
CON ABERRACIÓN DE LOS CROMOSOMAS SEXUALES	12	7.84	13	9.55	25	8.65
SIN ALTERACIONES	112	73.20	95	69.85	207	71.62
<b>TOTAL</b>	<b>153</b>	<b>100</b>	<b>136</b>	<b>100</b>	<b>289</b>	<b>100</b>

**TABLA No.4**  
**RELACIÓN ENTRE EL CUADRO CLÍNICO Y LOS RESULTADOS**  
**OBTENIDOS EN LOS PACIENTES DE 1995**

CUADRO CLÍNICO	CARIOTIPOS NORMALES		CARIOTIPOS ANORMALES		TOTAL	
	No.	%	No.	%	No.	%
RETRASO EN EL DESARROLLO Y/O						
RETRASO MENTAL	11	9.82	2	4.87	13	8.49
Sx de DOWN	2	1.78	21	51.21	23	15.03
Sx de PRADER WILLI	2	1.78	1	2.43	3	1.96
DESARROLLO SEXUAL ANORMAL						
SÍNDROME DE TURNER	3	2.67	7	17.07	10	6.53
SÍNDROME DE KLINEFELTER	0	0.00	1	2.43	1	0.65
SÍNDROME DE XYY	0	0.00	1	2.43	1	0.65
DISGENESIA GONADAL MIXTA	0	0.00	3	7.31	3	1.96
DISGENESIA GONADAL PURA	2	1.78	0	0.00	2	1.30
AMENORREA 1° Y 2°	5	4.46	0	0.00	5	3.26
AMBIGÜEDAD GENITAL	1	0.89	0	0.00	1	0.65
OTRAS CAUSAS	3	2.67	0	0.00	3	1.96
SÍNDROMES ESPECÍFICO						
ICTIOSIS LIGADA AL X	8	7.14	0	0.00	8	5.22
EXPOSICIÓN A AGENTES CLASTOGÉNICOS						
EXPOSICIÓN A RAYOS X E INDIVIDUOS CONTROL	5	4.46	0	0.00	5	3.26
EXPOSICIÓN A Co.	1	0.89	0	0.00	1	0.65
DEFECTOS CONGÉNITOS	10	8.92	0	0.00	10	6.53
PROBLEMAS DE LA CONCEPCIÓN						
ABORTO HABITUAL	22	19.64	0	0.00	22	14.37
ESTERILIDAD	6	5.35	0	0.00	6	3.92
EMBARAZO DE ALTO RIESGO	5	4.46	0	0.00	5	3.26
PADRES U OTROS MIEMBROS DE LA FAMILIA DEL CASO ÍNDICE	6	5.35	4	9.75	10	6.53
OTRAS CAUSAS	20	17.85	1	2.43	21	13.72
TOTAL	112	100	41	100	153	100

**TABLA No.5**  
**RELACION ENTRE EL CUADRO CLÍNICO Y LOS RESULTADOS**  
**OBTENIDOS EN LOS PACIENTES DE 1996**

CUADRO CLÍNICO	CARIOTIPOS NORMALES		CARIOTIPOS ANORMALES		TOTAL	
	No.	%	No.	%	No.	%
RETRASO EN EL DESARROLLO Y/O						
RETRASO MENTAL	17	17.89	1	2.43	18	13.23
Sx DE DOWN	1	1.05	23	56.09	24	17.64
Sx DE X-FRÁGIL	2	2.10	1	2.43	3	2.20
Sx. DE PRADER WILLI	2	2.10	0	0.00	2	1.47
DESARROLLO SEXUAL ANORMAL						
SÍNDROME DE TURNER	7	7.36	12	29.26	19	13.97
SÍNDROME DE KLINEFELTER	4	4.21	1	2.43	5	3.67
DISGENESIA GONADAL PURA	5	5.26	0	0.00	5	3.67
VARÓN XX	0	0.00	0	0.00	0	0.00
AMENORREA 1' Y 2'	6	6.31	0	0.00	6	4.41
AMBIGÜEDAD GENITAL	1	1.05	0	0.00	1	0.735
OTRAS CAUSAS	3	3.15	0	0.00	3	2.205
EXPOSICIÓN A AGENTES CLASTOGENICOS						
EXPOSICIÓN A RAYOS X E INDIVIDUOS CONTROL	3	5.26	0	0.00	3	2.205
DEFECTOS CONGÉNITOS						
	5	5.26	0	0.00	5	3.67
PROBLEMAS DE LA CONCEPCIÓN						
ABORTO HABITUAL	11	11.57	0	0.00	11	8.08
ESTERILIDAD	3	3.15	0	0.00	3	2.20
EMBARAZO DE ALTO RIESGO	8	8.42	0	0.00	8	5.88
PADRES U OTROS MIEMBROS DE LA FAMILIA DEL CASO ÍNDICE	4	4.21	1	2.43	5	3.67
OTRAS CAUSAS	13	13.68	2	4.87	15	11.02
TOTAL	95	100	41	100	136	100

TABLA No.6  
CARIOTIPOS CON ABERRACIONES NUMÉRICA Y ESTRUCTURALES

TIPO DE ABERRACIÓN	PACIENTES EN 1995		PACIENTES EN 1996		TOTAL	
	No	%	No	%	No	%
NUMÉRICA	32	78.04	34	82.92	66	80.48
AUTOSOMAS	20	48.78	22	53.65	42	51.21
CROMOSOMAS SEXUALES	12	29.26	12	29.26	24	29.26
ESTRUCTURAL	9	21.95	7	17.07	16	19.51
AUTOSOMAS	9	21.95	6	14.63	15	18.19
CROMOSOMAS SEXUALES	0	0.00	1	2.43	1	1.21
TOTAL	41	100	41	100	82	100

**TABLA No. 7**  
**TIPO DE ABERRACIONES ENCONTRADAS EN AUTOSOMAS**

TIPO DE ABERRACIÓN	PACIENTES EN 1995		PACIENTES EN 1996	
	No.	%	No.	%
<b>NUMÉRICA</b>	20	68.96	22	78.57
TRISOMÍA 21	18	62.06	19	67.85
MARCADOR	02	6.89	00	00.00
MOSAICO	00	00.00	03.00	10.71
<b>ESTRUCTURALES</b>	09	31.03	06.00	21.42
DELECIÓN	01	03.44	02.00	07.14
TRANSLOCACIÓN ROBERTSONIANA	06	20.68	01.00	03.57
BALANCEADA	03	10.34	00.00	00.00
NO BALANCEADA	03	10.34	01.00	03.57
TRANSLOCACIÓN NO ROBERTSONIANA	02	06.89	03.00	10.71
BALANCEADA	00	00.00	01.00	03.57
NO BALANCEADA	02	06.89	02.00	07.14
<b>TOTAL</b>	29	100.00	28.00	100.00

**TABLA No. 8**  
**TIPO DE ABERRACIONES ENCONTRADAS EN CROMOSOMAS SEXUALES**

TIPO DE ABERRACIÓN		PACIENTES EN 1995		PACIENTES EN 1996	
		No.	%	No.	%
NUMÉRICA		12	100	12	92.30
	45,X	4	33.33	9	69.23
	MOSAICO				
	45,X/46,XX	3	25.00	2	15.38
	45,X/46,XY	3	25.00	0	00.00
	47,XXY	1	8.33	1	7.69
	47,XYY	1	8.33	0	0.00
ESTRUCTURALES		0	0.00	1	7.69
	MOSAICO				
	45,X/46,X <sub>i</sub> (Xq)	0	0.00	1	7.69
<b>TOTAL</b>		12	100	13	100

TABLA No.9

CARIOTIPOS CON ABERRACIONES EN AUTOSOMAS

TIPO DE ABERRACIÓN	PACIENTES EN 1995		PACIENTES EN 1996		TOTAL	
	No	%	No.	%	No.	%
SÍNDROME DOWN	21	75.86	23	82.14	44	77.19
TRISOMÍA	18	62.06	19	67.85	37	64.91
MOSAICO	0	0.00	3	10.71	3	5.26
TRANSLOCACIÓN ROBERTSONIANA	3	10.34	1	3.57	4	7.01
TRANSLOCACIONES EN GENERAL	5	17.24	3	10.71	8	14.03
DELECCIONES	1	3.44	2	7.14	3	5.26
MARCADORES	2	6.89	0	0.00	2	3.50
TOTAL	29	100	28	100	57	100

TABLA No.10  
CARIOTIPOS CON ABERRACIONES DE LOS CROMOSOMAS SEXUALES

TIPO DE ABERRACIÓN	PACIENTES EN 1995		PACIENTES EN 1996		TOTAL	
	No	%	No.	%	No	%
SÍNDROME DE TURNER	7	58.33	12	92.33	19	76.00
45,X	4	33.33	9	69.23	13	52.0
45,X/46,XX	3	25.00	2	15.38	5	20.0
45,X/46,X,i(Xq)	0	0.00	1	7.69	1	4.0
SÍNDROME DE KLINEFELTER 47,XXY	1	8.33	1	7.69	2	8.0
SÍNDROME 47,XYY	1	8.33	0	0.00	1	4.0
DISGENESIA GONADAL MIXTA (45,X/46,XY)	3	25.00	0	0.00	3	12.0
TOTAL	12	100	13	100	25	100

#### 4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Como se observó en los resultados anteriores el retraso en el desarrollo y/o mental fue la principal causa (12.28%) de estudio citogenético (tabla No.2). Los factores que lo producen pueden ser perinatales, posnatales y genéticos, dentro de estos últimos se encuentran las anomalías cromosómicas en un 10.7% de los casos. El retraso mental puede estar asociado en síndromes bien definidos como X frágil, Down, Edward y Patau, entre otros (85). Los pacientes con retraso mental estudiados en este servicio presentaron retraso mental aislado, asociado a otras anomalías o asociado a un síndrome específico.

El síndrome más frecuente asociado con retraso mental es el de Down. Este padecimiento se presenta en 1:700 recién nacidos. Su fenotipo es muy singular, lo cual facilita su detección. La región cromosómica crítica de este síndrome se localiza en 21q22.2-q22.3, por lo tanto es de esperar que los hallazgos citogenéticos en estos pacientes impliquen al cromosoma 21, ya sea en una trisomía regular, una translocación robertsoniana o no, un isocromosoma 21q o un mosaico. La trisomía 21 regular es la principal causa de este síndrome (86.58-95%) (86) y se debe en su gran mayoría a una no disyunción meiótica materna, la cual se ha visto asociada con edad avanzada (79,87,88). Las translocaciones son causa menos frecuente de este síndrome (7.67%) principalmente son robertsonianas y en algunos casos los padres pueden ser portadores de una translocación balanceada que heredan a su hijo. Otra causa de síndrome Down en menor proporción son los

mosaicos (5.75%) que se presentan por una no disyunción en los cigotos (86).

En el servicio de Genética se estudió un total de 52 pacientes con sospecha de síndrome Down (tabla 2), en los casos que pudieron ser analizados, la trisomía 21 regular fue la causa citogenética del síndrome más frecuente (77.19%), seguida por las translocaciones robertsonianas (7.01%) y por último los mosaicos (5.26%) (tabla 9). Las proporciones observadas son semejantes a las reportadas en la literatura (86), las translocaciones son todas robertsonianas t(13;21), t(21;21) y t(14;21), la última de éstas estuvo presente en tres miembros sanos de la familia de un paciente, el padre y dos hermanos. Por último sólo tres de los pacientes con datos clínicos de Sx. Down presentaron un cariotipo normal. En estos casos dado que las bandas GTG no detectan duplicaciones crípticas o submicroscópicas en 21q22.2-q22.3 que se han visto asociadas con la presencia de Síndrome Down es recomendable seguir la metodología sugerida por Heras y colaboradores(89) que consiste en descartar la posibilidad de un mosaico analizando 50 metafases o estudiando por FISH 500 células en interfase, posteriormente se re-evalúa al paciente considerando los criterios de Jackson y colaboradores (90) para detectar rearrreglos crípticos de 21q y de considerarse necesario se realice FISH con sondas que mapean en 21q22.2-q22.3 y seguir si es necesario con el estudio de otras células como fibroblastos. El diagnóstico deberá ser reexaminado si todos los resultados son normales.

El síndrome de X-frágil representa la causa más común de retraso mental por un patrón de herencia ligado al cromosoma X, se estima que se presenta en 1:4425 a 1:60445 varones.

Citogenéticamente es detectado por la inducción de un sitio frágil en Xq27.3 el cual se expresa en 70% de los casos (81,87). En este estudio resulto positiva la inducción del sitio frágil en Xq27.3 para uno de los tres casos estudiados (tabla 2). Se recomienda realizar este estudio cuando no se ha encontrado otra causa posible de la enfermedad, si hay un diagnóstico de autismo o si la historia familiar muestra un retraso mental con patrón de herencia ligado al cromosoma X (81,87).

Otro síndrome que presenta retraso mental es el de Prader Willi (PW), que tiene una frecuencia de 1:10 000 recién nacidos. Más del 70% de los pacientes con PW presentan una deleción de la región 15q11q13. La deleción puede ser detectada citogenéticamente por técnicas de alta resolución. En el Servicio de Genética se estudiaron con técnicas de alta resolución, cinco pacientes con síndrome de PW (tabla 4 y 5) de los cuáles sólo en uno fue posible detectar la deleción 15q11-13 como la causa del padecimiento (tabla 7), es posible que en los otros pacientes la deleción no pueda observarse citogenéticamente o no esté presente, por lo que requieren de otros estudios como hibridación *in situ* fluorescente, hibridación DNA-DNA tipo Southern o PCR para buscar arreglos submicroscópicos y poder corroborar el diagnóstico (79,91).

En los casos estudiados con retraso mental no asociado a un síndrome específico en 1995 y 1996, cinco mostraron aberraciones citogenéticas, dos de las cuales fueron estructurales y tres numéricas. Las aberraciones estructurales fueron: 46,XY,-6,+der(6)t(6;?)(q25;?); 47,XY,+der(9)t(6;9)(p22.3;q21.2) y las aberraciones numéricas

fueron: 47,XXY; 47,XX,+mar y 45,X. Los rearrreglos estructurales encontrados en los cromosomas 5,6 y 9 apoyan las observaciones de que los autosomas contiene genes para el crecimiento, desarrollo y función normal de un individuo y que aberraciones en ellos producen retraso en el crecimiento, retraso mental y anomalías congénitas (79). Por otra parte en casos esporádicos puede presentarse el retraso mental asociado con aberraciones en cromosomas sexuales, como se detectó en dos pacientes, en los cuales la realización del estudio citogenético permitió el diagnóstico de un paciente con síndrome de Klinefelter y una paciente con síndrome de Turner, los cuales generalmente no cursan con retraso mental (79).

Los 28 casos restantes que mostraron un cariotipo normal y que no poseen señales clínicas que hagan sospechar de una anomalía cromosómica específica, pueden ser estudiados por multi-FISH o por Hibridización Genómica Comparativa (CGH). Esta última consiste en detectar rearrreglos crípticos en las regiones subtelerómicas ricas en genes y en donde se ha observado que se presenta la mayor parte de rearrreglos asociados con retraso mental (64,91).

Existe un conjunto de enfermedades que en ocasiones están asociadas con alteraciones citogenéticas en autosomas y que fueron causa de estudio en este Servicio de Genética, dentro de las que podemos mencionar el retinoblastoma. El retinoblastoma es un tumor maligno que se presenta en la retina de infantes, con una incidencia de 1:20 000 recién nacidos y se origina por una mutación en el gen *RB1* mapeado en 13q14. Los hallazgos citogenéticos pueden ser deleciones o translocaciones que impliquen esta región. En el servicio de

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Genética se recibieron 5 pacientes con retinoblastoma en 1995 (tabla 2), pero las muestras no fueron analizables probablemente porque los pacientes ya habían recibido quimioterapia (79).

Otro padecimiento estudiado en el servicio de Genética fue la Ictiosis ligada al X. Esta enfermedad se presenta en la mayoría de los casos por una deleción en la región Xp22.3, donde se localiza el gen de la esteroide sulfatasa (STS). Las deleciones que ocasionan este padecimiento son muy pequeñas y sólo en algunos casos pueden ser observadas por la técnica de alta resolución (87). En este Servicio se estudio a 22 individuos, que incluyen pacientes y familiares, a los cuales se les realizaron estudios bioquímicos, moleculares y citogenéticos. Los últimos con el propósito de buscar algún rearrreglo cromosómico fortuito asociado al padecimiento o bien una deleción lo suficientemente grande para ser detectada, lo cual no se observó ya que todos los cariotipos fueron normales.

En el servicio de Genética también se realizó estudio citogenético a individuos que trabajan con radiación y que pudieran estar expuestos a ésta. Es conocido que los rayos X y otras radiaciones ionizantes pueden causar rupturas cromosómicas en algún estado del ciclo mitótico o meiótico. El estudio citogenético de estos individuos incluyen la realización del mismo estudio a un individuo control de igual sexo y edad, con el propósito de poder comparar los resultados. En estos pacientes se encontraron rupturas cromosómicas y cromatídicas; poliploidías y endoreduplicaciones. Un índice de ruptura de 0-2% se considera normal, lo cual se observo en 7 de los casos y sus

controles. Un caso con exposición accidental a Co radioactivo, presentó un 16% de células poliploides, por lo que se recomendó un seguimiento. En uno de los individuos estudiados en 1996 se observó un alto porcentaje de rupturas cromosómicas y endoreduplicaciones, sin embargo en el control también hubo un alto porcentaje, por lo cual se repitió el estudio y los resultados fueron normales, de tal manera que se considera que los datos iniciales no tienen ninguna relevancia clínica (65).

Por otra parte los problemas relacionados con la reproducción son una de las causas principales de estudio citogenético durante la edad adulta. Dentro de éstos podemos mencionar los abortos habituales, la esterilidad y los embarazos de alto riesgo (92). En el caso de aborto habitual se ha encontrado que en poco menos del 10% de las parejas que lo presentan, uno de los cónyuges es portador de un rearreglo cromosómico balanceado. Por otra parte en las parejas con infertilidad inexplicable las anomalías citogenéticas también pueden ser responsables del problema. Por último las parejas que han tenido un niño con aberraciones cromosómicas estructurales, por ejemplo translocación, duplicación, inversión, deben ser estudiados, para determinar si son portadores equilibrados del rearreglo. En estos casos el estudio citogenético además de explicar la etiología del problema, determina el consejo genético para la familia. En el servicio de Genética se tomó muestra para cariotipo a 48 individuos con problemas de la concepción, en 1995 y a 30 en 1996, siendo una de las principales causas de estudio citogenético (17.09). Todos los cariotipos estudiados fueron normales.

Un grupo importante de padecimientos cromosómicos, son los correspondiente a aberraciones en cromosomas sexuales. En el servicio de Genética, los estudios cromosómicos realizados durante 1995-1996, mostraron un total de 12 y 12 cariotipos (29.26%) con aberraciones en cromosomas sexuales (tabla 3). La bibliografía menciona que las aberraciones cromosómicas más frecuentes son en el número de cromosomas sexuales, siguiendo en frecuencia los autosomas y por último los rearreglos estructurales (87), la diferencia entre las proporciones bibliográficas y las obtenidas en este estudio (tabla 3 y 6) se debe a que se utilizó una población seleccionada del total de individuos que acuden al Hospital General, los pacientes que se atienden en el Servicio de Genética en su mayoría son canalizados por los médicos de otros servicios, los cuales pueden no detectar algunos pacientes con aberraciones de cromosomas sexuales, que presentan fenotipos menos severos que los de los autosomas o incluso normales, lo cual dificulta su identificación y diagnóstico. Las principales causas de consulta en este servicio relacionadas con aberraciones en cromosomas sexuales fueron probable síndrome de Turner, amenorrea 1ª y 2ª, disgenesia gonadal y cuatro casos de genitales ambiguos (tablas 2 y 3).

La diferenciación sexual en el humano se lleva acabo en varias etapas, que incluyen el establecimiento del sexo cromosómico durante la fertilización, el desarrollo del sexo gonadal y la definición de los genitales internos y externos. Este proceso de diferenciación y formación gonadal requiere de toda una cascada génica. En el caso de la diferenciación testicular se ha considerado al gen *SRY* localizado en Yp11.3 como el control maestro. Aparte de *SRY* existen genes en

autosomas o ligados al X que participan en la diferenciación sexual, dentro de los que podemos mencionar a *SOX9*, *WT1*, *DAX1* y *SF1*. Las mutaciones en este conjunto de genes dan origen a diversas patologías sexuales. Por otra parte la ausencia o exceso de cromosomas X y la pérdida de un segmento de su brazo corto, origina fenotipos femeninos con anomalías ocasionadas por un aumento o disminución del producto de genes que no están sujetos al proceso de inactivación (93,94,95).

Citogenéticamente aberraciones estructurales y numéricas en cromosomas sexuales producen diversos síndromes dentro de los que podemos mencionar a los de Turner, Klinefelter y XYY. Las aberraciones de los cromosomas sexuales observadas en el servicio de Genética en mayor porcentaje fueron monosomías del cromosoma X que producen síndrome de Turner (tabla 10). Está reportado que el 50% de los síndromes de Turner presentan un cariotipo 45,X, el 15% 45,X/46,XX y el 8% 45,X/46,X,i(Xq)(81). La frecuencia de las causas citogenéticas observada en este estudio, es similar a la reportada en la literatura y todos los casos se deben a la ausencia de un cromosoma X o la pérdida de un segmento de su brazo corto (tabla 10). En los últimos años se ha propuesto que el promedio de monosomías 45,X como causa de síndrome de Turner puede ser mucho menor, ya que se ha observado la necesidad de una línea celular 46,XX o 46,XY para la supervivencia en la etapa embrionaria. Un estudio de mosaicos 45,X/46,XX mostró que en la mayoría de los casos la primera línea celular fue 46,XX y la segunda se formó por la pérdida de un disómico normal. De las anomalías estructurales que producen síndrome de Turner, la más frecuente es el

isocromosoma del brazo largo del X, del cual se encontró un caso en 1996 (93,94,95).

Dentro de los síndromes con aberraciones cromosómicas sexuales y fenotipo masculino, observados en este estudio se encuentra el de Klinefelter y el 47,XXY. En 1996 se estudiaron cuatro pacientes probables Klinefelter, de los cuales tres presentaron un cariotipo normal y sólo uno fue 47,XXY (tabla 10). Por otra parte en 1995 se presentó un paciente con probable síndrome de Usher en el cual su estudio citogenético mostró un cariotipo 47,XXY. En general los pacientes con Sx de Klinefelter este síndrome tienen un fenotipo masculino normal, por lo general cursan con azoospermia, aunque algunos mosaicos pueden ser fértiles y es difícil detectarlos.

Otras anomalías estudiadas son las reversiones sexuales parciales o completas, las cuales producen discordancia entre el sexo cromosómico y gonadal-fenotípico, pueden estar aisladas o como parte de otros síndromes. Estos padecimientos se originan por mutaciones en los genes que participan en la diferenciación gonadal. En el caso de la disgenesia gonadal pura completa 46,XY, el 10-15% de los pacientes presentan mutaciones o deleciones en *SRY*, el resto se ha postulado que se deban a mutaciones en genes aún no caracterizados, que participan en la determinación gonadal. La reversión sexual también esta asociada a síndromes monogénicos bien definidos, esta asociación ha permitido reconocer la participación de genes como *WT1* y *SOX9* en el proceso de formación y diferenciación sexual. La disgenesia gonadal también está asociada con anomalías cromosómicas como: duplicación de Xp21, deleción de 9p y deleción de 10q. En este estudio se

realizó cariotipo a siete pacientes con disgenesia gonadal pura, observándose un resultado 46,XY para cuatro y 46,XX en tres, también se estudiaron tres probables disgenesias gonadales mixtas que presentaron un cariotipo de 45,X/46,XY. Ningún cariotipo mostró aberraciones cromosómicas estructurales, que también pueden estar involucradas en este padecimiento (93,94,95).

## 5. CONCLUSIONES.

De acuerdo con la investigación bibliográfica realizada es importante señalar que la estructura de la cromatina no solo es vital para la condensación y segregación de los cromosomas durante la división celular, las modificaciones que ésta presenta son un medio para regular la expresión de genes. El tiempo y acción de los activadores, represores, metiladores, acetiladores condensadores y remodeladores de la cromatina, es una compleja coreografía en la que un pequeño defecto rompe el proceso intacto de la información. Actualmente se sabe que muchas enfermedades genéticas humanas resultan de mutaciones en genes que producen proteínas que se conoce o se sospecha que están involucradas en mantener o modificar la estructura de la cromatina. Dada la importancia de la estructura de la cromatina resulta fundamental continuar con el estudio detallado de ésta.

Por otra parte, la forma en que se organiza la cromatina a lo largo de los cromosomas metafásicos, genera regiones o bandas que se ponen de manifiesto por un conjunto de métodos llamados técnicas de bandeo. Las bandas revelan regiones con características diferentes y específicas como son: nivel de condensación, composición de bases, presencia de puntos de ruptura y rearrreglos, tiempo de replicación, sensibilidad a DNAasa, contenido de genes, presencia de mutaciones, etc.

Las técnicas de bandeo que se realizan en un estudio citogenético permiten identificar los cromosomas o las regiones de éstos implicadas en un padecimiento o síndrome

cromosómico, lo cual facilita la búsqueda o aportación de información sobre dichas regiones.

De igual manera se observó que el estudio cromosómico, es fundamental para el diagnóstico adecuado de pacientes con probables padecimientos o síndromes, los cuales son ocasionados por aberraciones cromosómicas. La aplicación de las técnicas de bandeado y otros métodos citogenéticos, permitieron corroborar o descartar la presencia en 289 de los individuos estudiados, de aberraciones cromosómicas asociadas a un cuadro clínico.

Aún cuando se estudio una población seleccionada, la incidencia de las anormalidades cromosómicas numéricas y estructurales, fueron similares a los porcentajes mostrados en estudios realizados en otras poblaciones, siendo la trisomía 21 la aberración en autosomas más frecuente y en cromosomas sexuales, la monosomía 45,X.

Por último podemos mencionar la necesidad de contar con médicos familiarizados con las características fenotípicas producidas por las aberración cromosómica para que se realice un adecuado diagnóstico clínico, lo cual permita que los pacientes con este tipo de padecimientos sean apropiadamente canalizados.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Lewin B; "Genes VII" Oxford University Press, New York pp567-612 (1997).
2. Salamanca F; "Citogenética humana" 1ªed. Panamericana. Mexico D.F; pp37-43 (1990).
3. Ramakrishnan V; "Histone structure and the organization of the nucleosome" Annu Rev Biophys Biomol Struct (26):83-112 (1997).
4. Kornber D; "Twenty-five years of the nucleosome, Fundamental particle of the Eukaryote Chromosome" Cell 98:285-294 (1999).
5. Wolffe P. A; "Chromatin disruption and modification" Nucleic Acids Res 27(3):711-720 (1999).
6. Baxevanis D. A; Landsman D; "Histone sequence database: new histone fold family members" Nucleic Acids Res 26(1):372-375 (1998).
7. Ramakrishnan V; Finch J. T; Graziano V. "Crystal structure of globular domain of histone H5 and its implications for nucleosome binding" Nature 362:219-223 (1993).
8. Vila R; Ponte I; "DNA-induced alpha-helical structure in the N-terminal domain of histone H1" J Biol Chem Oct. (2) (2001).
9. Hayes J. J; Hansen C. J; "Nucleosomes and the chromatin fiber" Curr Opin Genet Dev (11):124-129 (2001).
10. Liu X; Li B; Gorovsky A. M; "Essential and nonessential histone H2A variants in *Tetrahymena thermophila*" Mol Cell Biol 8:4305-4311 (1996).
11. Suto R. K; Clarkson; "Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z" Nat Struct Biol (7):1121-1124 (2000).

12. Ramirez G. M; Rocchini C; Ausio J. "Modulation of chromatin folding by histone acetylation" *J Biol Chem* 270:17923-17928 (1995).
13. O'Neill P. L; Turner M. B "Histone H4 acetylation distinguishes coding region of the human genome from heterochromatin in a differentiation-dependent but transcription-independent manner" *J Biol* 120:227-290 (1993).
14. Megee C. P; Morgan A. B; Smith M. M; "Histone H4 and the maintenance of genome integrity" *Genes & Dev* 9:1716-1727 (1995).
15. Vettese D. M; Grant A. P; Hebbes R. T. "Acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA *in vitro*" *EMBO J* 15(10):2508-2518 (1996).
16. Nelson C. H; "Structure and function of DNA-binding proteins" *Curr Opin Genet Dev* 5:180-189 (1995).
17. Uhlmann Frank; "Chromosome condensation: Packaging the genome" *Curr Biol* 11:R384-R387 (2001).
18. Bakshi R; Galande S; Munniyappa K; "Substrate specificity plays an important role in uncoupling the catalytic and scaffolding activities of rat testis DNA topoisomerase IIalpha" *J biomol Struct Dyn* 18(5):749-60 (2001).
19. Heck M. S; "Condensins, cohesins and chromosome architecture: how to make and break a mitotic chromosome" *Cell* 91:5-8 (1997).
20. Strunnikov A. V; Larionov V. L; Kashland D; "SMC1: an essential yeast gene encoding a putative head-rad-tail protein is required for nuclear division and defines a new ubiquitous family" *J. Cell. Biol* 123:1635-1648 (1993).
21. Hirano T; Mitchison J. T; "A heterodimeric coiled-coil protein required for mitotic chromosome condensation *in vitro*" *Cell* 79:449-458 (1994).
22. Strunnikov A. V; "SMC proteins and chromosome structure" *Trends In Cell* 8:454-63 (1998).

23. Strunnikov A. V; "Structural maintenance of chromosome (SMC) proteins" Eur.J. Biochem. 263:6-13 (1999).
24. Kimura K; Cuvier O; Hirano T; "Chromosome condensation by a human condensin complex in *Xenopus* egg extracts" J. Biol. Chem. 276 (8):5417-5420 (2001).
25. Travers A. A; Ner S. S; Churchill A. E. " DNA Chaperones: a solution to a persistence problem? " Cell 77:167-169 (1994).
26. Nightingale K; Dimitrov S; Reeves R; Wolffe P. A. "Evidence for a shared structural role for HMG 1 and like histones B4 and H1 in organizing chromatin" EMBO J 15(3):548-561 (1996).
27. Mello A. G; "The ins and outs of nucleosome assembly" Curr Opin Genet Dev 11:136-141 (2001).
28. Slavotinek M. A; Biesecker G. L; "Unfolding the role of chaperones and chaperonins in human disease" Trends Genet 17(9):528-535 (2001).
29. Luger K; Mader W. A; Richmond K. R; " Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution" Nature 389:251-260 (1997).
30. Ling X; Harkness A. A. T; Schult C. M; Adams F. G; Grustein M; "Yeast histone H3 and H4 amino termini are important for nucleosome assembly *in vivo* and *in vitro*: redundant and position-independent function in assembly but not in gene regulation" Genes & Deve 10:685-699 (1996).
31. Muller C; "Chromatin remodelling in development and differentiation" Curr Opin Genet Dev 11:167-174 (2001).
32. Zaret K; Wolffe A. P; "Chromosomes and expression Mechanisms the post-genomic era of gene control" Curr Opin Genet Dev 11:121-123 (2001).

33. Marmorstein R; Roth Y. S; "Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis Curr Opin Genet Dev 11:155-161 (2001).
34. Khochbin S; Verdell A; Lemerrier C; Seigneurin B. D; "Function significance of histone deacetylase diversity" Curr Opin Genet Dev 11:162-166 (2001).
35. Schiessel H; "DNA folding: Structural and mechanical properties of the two-angle model for chromatin" J Biophys 80(4):1940-1956 (2001).
36. Thoma T; Koller T; Klung A; "Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin" J Cell Biol 83:403-427 (1979).
37. Felsenfeld G; McGhee D. J. "Structure of the 30 nm chromatin fiber" Cell 44:375-377 (1986).
38. Woodcock C. L; Frado Y. L; Rattner B. J; "The higher order structure of chromatin: evidence for a helical ribbon arrangement" J Cell Biol 99:42-52 (1984).
39. McGhee J. D; Nickol J. M; Felsenfeld G; "Higher order structure of chromatin; orientation of nucleosome within the 30 nm. Chromatin solenoid is independent of species and spacer length" Cell 33:831-841 (1983).
40. Athey D. B; Smith F. M; Rankert A. D; Williams P. S; Langmore; "The diameters of frozen-hydrated chromatin fibers increase with DNA linker length: evidence in support of variable diameter models for chromatin" J Cell Biol 111:795-806 (1990).
41. Cui Y; Bustamante C; "Pulling a single chromatin fiber reveals the force that maintain its higher-order structure" Proc Natl Acad Sci USA 97:127-132 (2000).
42. Woodcock L.C; "Higher-order structure of chromatin and chromosome" Curr Opin Genet Dev 11:130-135 (2001).
43. Saitoh Y; Laemmli U. K. "Metaphase chromosome structure: bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold" Cell 76:609-622 (1994).

44. Kas E; Laemmli K.U. "In vivo topoisomerase II cleavage of the *Drosophila* histone and satellite III repeats: DNA sequence and structural characteristics " EMBO J 2:705-716 (1992).
45. Strissel P. L; "Scaffold-associated regions in the human type I interferon gene cluster on the short arm of chromosome 9" Genomics 47(2):217-229 (1998).
46. Strick R; Laemmli K. U. "SARs are cis DNA elements of chromosome dynamics: synthesis of a SAR repressor protein " Cell 83:1137-1148 (1995).
47. Kas E; Poljak L; Adachi Y; Laemmli K. U. "A model for chromatin opening: stimulation of Topoisomerase II and restriction enzyme cleavage of chromatin by distamycin" EMBO J 1:115-126 (1993).
48. Glazko G. V; "Comparative study and prediction of DNA fragments associated with various elements of the nuclear matrix" Biochim Biophys Acta 1517(3):351-364 (2001).
49. Bickmore A. W; Oghene K; "Visualizing the spatial relationships between defined DNA sequences and the axial region of extracted metaphase chromosomes" Cell 84:95-104 (1996).
50. Razin V. S; "Chromosomal DNA loppes may constitute basic units of the eukaryotic genome organization and evolution" Ekaryotic Expression 9(3-4):279-283 (1999).
51. Paulson J. R; Laemmli U. K; "The structure of histone depleted metaphase chromosome" Cell 12:817-28 (1977).
52. Wanner G; "A new chromosome model" J Struct Biol 132:147-161 (2000).
53. Zakiam A. V; "Telomeres: Beging to understand the end" Science 270:1601-07 (1995).

54. Shore D; "Telomeric chromatin: replicating and wrapping up chromosome ends" *Curr Opin Genet Dev* 11:189-198 (2001).
55. Huerta D; Azorin P; "Structural polymorphism of homopurine DNA sequences d(GGA) and d(GGGA)<sub>n</sub> repeats form intra molecular hairpins stabilized by different base-pairing interactions " *Biochemistry* 35(40):13125-35 (1996).
56. Makarov L. V; Hirose Y; "Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening" *Cell* 88:657-666 (1997).
57. Shay J. W; Wright W. E; "Telomerase activity in human cancer" *Curr Opin Oncol* 8(1):66-71 (1996).
58. Pluta A. F; Mackay A. M; Ainsztein A. M; Goldberg I. G; "The centromere: hub of chromosomal activities" *Science* 270:1591-94 (1995).
59. Saffery N; Irvine D. V; Griffiths B; Kalitsis P; Wordeman L; Choo K. H; "Human centromeres and neocentromeres show identical distribution patterns of 20 functionally important kinetochore-associated proteins" *Hum Mol Genet* 9(2):175-185 (2000).
60. Sun X; Wahlstrom J; Karpen G; "Molecular structure of a functional *Drosophila* centromere" *Cell* 91:1007-1019 (1997).
61. Wolffe P. A; Pruss D. "Deviant nucleosomes: the funtional specialization of chromatin" *Trends Genet* 12(2) (1996).
62. Faulkner E. N; Vig B; Echeverri J. C; Wordeman L; Vallee B. R; "Localization of motor-related proteins And associated complexes to active but not inactive, centromeres" *Hum Mol Genet* 7(4):671-677 (1998).

63. Strissel L. P; Espinosa R; Rowley D. J; "Scaffold attachment regions in centromere-associated DNA" *Chromosoma* 105:122-133 (1996).
64. Verma R. S; Babu A; "human chromosome principles and techniques" 2<sup>nd</sup> ed. Mc Graw Hill New York (1995).
65. Therman E; Susman M; "Human chromosome structure, behavior and effects" Springer-Verlag pp 33-46 (1993).
66. Odierna G; Baldaza F; Aprea G; "Occurrence of G-banding in metaphase chromosome of *Encarsia berlesei* (Hymenoptera: Aphelinidae)" *Genome* 36:662-667 (1993).
67. Macera J. M; Verman R. A; Conte M. G; Klein V. R; "Mechanisms of the origin of a G-positive band within the secondary constriction region of human chromosome 9" *Cytogenet Cell Genet* 69:235-239 (1995).
68. Duncan L. M; Dietzsch E; Rudduck C. Garson O. M; "A simple G-banding technique following nonradioactive in situ hybridization" *Cytogenet Cell Genet* 62:228-230 (1993).
69. Rooney D. E; Czepulkowski B. H; "Human cytogenetics: a practical approach" 2<sup>nd</sup> ed, Oxford University Press pp 91-117 (1992).
70. Burkholder D. G; "The ultrastructure of R-banded chromosomes" *Chromosoma* 83:473-480 (1981).
71. Wettergren Y; Arnason U; Haaf T; Levan A. Levan G; "C-band-positive double minute have kinetochore proteins" *Cytogenet Cell Genet* 68:54-56 (1995).
72. Kunze B; Weichenhan P; Virks P; Traut W; Winking H; "Copy numbers of a clustered long-range repeat determine C-band staining" *Cytogenet Cell Genet* 73:86-91 (1996).
73. Drovin R; Lemieux N; Richer C L; "Chromosome condensation from prophase to late metaphase: relationship to chromosome bands and their replication time" *Cytogenet Cell Genet* 57:91-99 (1991).

74. Holmquist G. P; "Review article: Chromosome bands, their chromatin flavors, and their functional features" *Am J Hum Genet* 51:17-37 (1992).
75. Gardiner K; "Human genome organization" *Curr Biol* 5:315-322 (1995).
76. Tasone F; Cheng S; Gardiner K; "Analysis of chromosome 21 yeast artificial chromosome (YAC) clones" *Am J Hum Genet* 51:1251-1264 (1992).
77. Porat G; Zucchi Y; Hiller L; "Alu and sequence distributions in q24-q28 and their comparative utility in YAC contig assembly and verification" *Genomics* 16:417-425 (1993).
78. Cohen M. M; Rosenblum -Vos S. L; Prabhakar G; "Human cytogenetics" *AJDC* 147:1159-66 (1993).
79. Chin-to F; "Clinical diagnosis of genetic disease" *Pediatric Annal* 22:277-281 (1993).
80. Shapiro R. L; Wlomot L. P; "Cytogenetic diagnosis of genetic diseases" *Pediatric Annal* 22: 298-301 (1993).
81. Scriver R. C; Beaudel L. A; Sly S.W; "The metabolic and molecular bases of inherited disease" 7<sup>th</sup> ed. McGraw Hill (1995).
82. Guizar V. J; "Genetica clinica" 2<sup>a</sup> ed. Manual moderno (1994).
83. Uhrig S; Schuffenhauer S; Fauth C; Wirtz A; Daumer-Haas C; "Multiplex-FISH for pre- and postnatal Diagnostic Applications" *Am J Hum Genet* 65:448-462 (1999).
84. Dawson A. J; Konkin D; Riordan D; Chudley A. E; "Mosaic trisomy of a small r(1) with an abnormal phenotype" *Am J Med Genet* 103:32-35 (2001).
85. Tucker J. D; Morgan A. A; Bauchinger M; Blakey D; "A proposed system for scoring structural aberrations detected by chromosome painting " *Cytogenet Cell Genet* 68:211-221 (1995).

86. Ajuariaguerra J; Rego A; "Manual de psiquiatria infantil" ed. MASSON Mexico (1986).
87. Thompson W. M; Mcinnes R. E; "Genetics in medicine" 5<sup>a</sup> ed. W B Saunders Company-Philadelphia (1991).
88. Butomo I. V; Kovaleva N. V; "Structural chromosomal reorganizations and mosaicism in the parents of children with Down's syndrome" Tsitol Genet (1):87-91 (1993).
89. Heras G. J; Nages R. P; "A brief review of cryptic duplication of 21q as an emerging cause of Down syndrome: practical considerations for accurate detection" Clin Genet 55:207-211 (1999).
90. Jackson J. F; North III E. R; Thomas J. G; "Clinical diagnosis of Downs syndrome" Clin Genet 9:483-7 (1976).
91. Ghaffari R. S; Boyd E; Tolmie J. L; Crow J. Y; "A new strategy for cryptic telomeric translocation screening in patients with idiopathic mental retardation" J Mol Genet 35:225-233 (1998).
92. King R. C; "Estudio cromosómico: ¿cuándo solicitarlo y por qué?" Tribuna Médica Julio:1-5 (1980).
93. López L. M; Cervantes P. A; Kofman A.S; "Avances en el conocimiento del proceso genético en la diferenciación sexual del humano" Rev Invest Clin 48:129-137 (1996).
94. López L. M; Canto P; Aguinaga M; et al. "Frequency of Y chromosomal material in Mexican patients with Ullrich-Turner syndrome" Am J Med Genet 76:120-124 (1998).
95. López L. M; Zenteno J. C; Méndez J. P; Kofman A. S; "Heterogeneidad genética y variabilidad fenotípica en la reversión sexual 46,XY" Rev Invest Clin 50:171-176 (1998).

## 7. ANEXO

### PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Solución de antibiótico  
solución de estreptomina

estreptomina 1.00 gr.  
agua destilada 5.00 ml.

solución de penicilina

penicilina 800.000 U.  
agua destilada 5.00 ml.

preparar una solución 1% p/v de estreptomina con 1000 U de penicilina

Medio suplementado RPMI.

solución de antibiótico 1.00 ml.  
suero fetal de bovino 10.00 ml.  
medio RPMI 1640 cbp. 100.00 ml.

Colchicina al 0.02%

colchicina 0.02 gr.  
agua destilada cbp, 100.00 ml.

Solución hipotónica de KCl 0.0375 M,

KCl 5.6 gr.  
agua destilada cbp 1.00 Lt.

Fijador de Carnoy

metanol absoluto 75.00 ml.  
ácido acético glacial 25.00 ml.

Colorante de Giemsa.

Giemsa 5.00 gr.  
glicerina 250.00 ml.

se calienta a 60°C con agitación aproximadamente por 1.0 hr, se agrega metanol (450 ml.) y se filtra.

Tripsina al 0.1%

tripsina 0.03 gr.

buffer de fosfatos pH 6.8	50.00 ml.
Buffer de fosfatos pH 6.8 0.1 M.	
fosfato de potasio monobasico	6.63 gr.
fosfato de sodio dibasico	2.56 gr.
agua destilada	cbp. 1.00 lt
Acido clorhidrico 0.2 N.	
HCl (37%)	1.64 ml.
agua destilada	100.00 ml.
Hidróxido de Barlo 0.065 M.	
Hidróxido de barrio	11.039 g.
agua destilada	1.00 lt.
Solución salina citratada doble (2xSSC)	
citrato de sodio	2.205 gr.
cloruro de sodio	8.765 gr.
agua destilada	500.00 ml.
Medio suplementado RPMI 1640.	
solución de antibiótico	1.00 ml.
suero fetal de bovino	10.00 ml.
medio RPMI 1640	cbp. 100.00 ml.
Solución de metrotexate	
Frasco con metrotexate (50mg/ml)	0.045 ml.
agua estéril destilada	5.00 ml.
Solución de BrdU	
BrdU	0.02 gr.
agua estéril y destilada	10.00 ml.
Solución de Fudr 10(-5)M.	
Fudr	0.i mg.
Solución de Hankg	5.0 ml.

De la solución anterior se toma 1ml. Y se lleva a un volumen de 8 ml en solución de hankg.