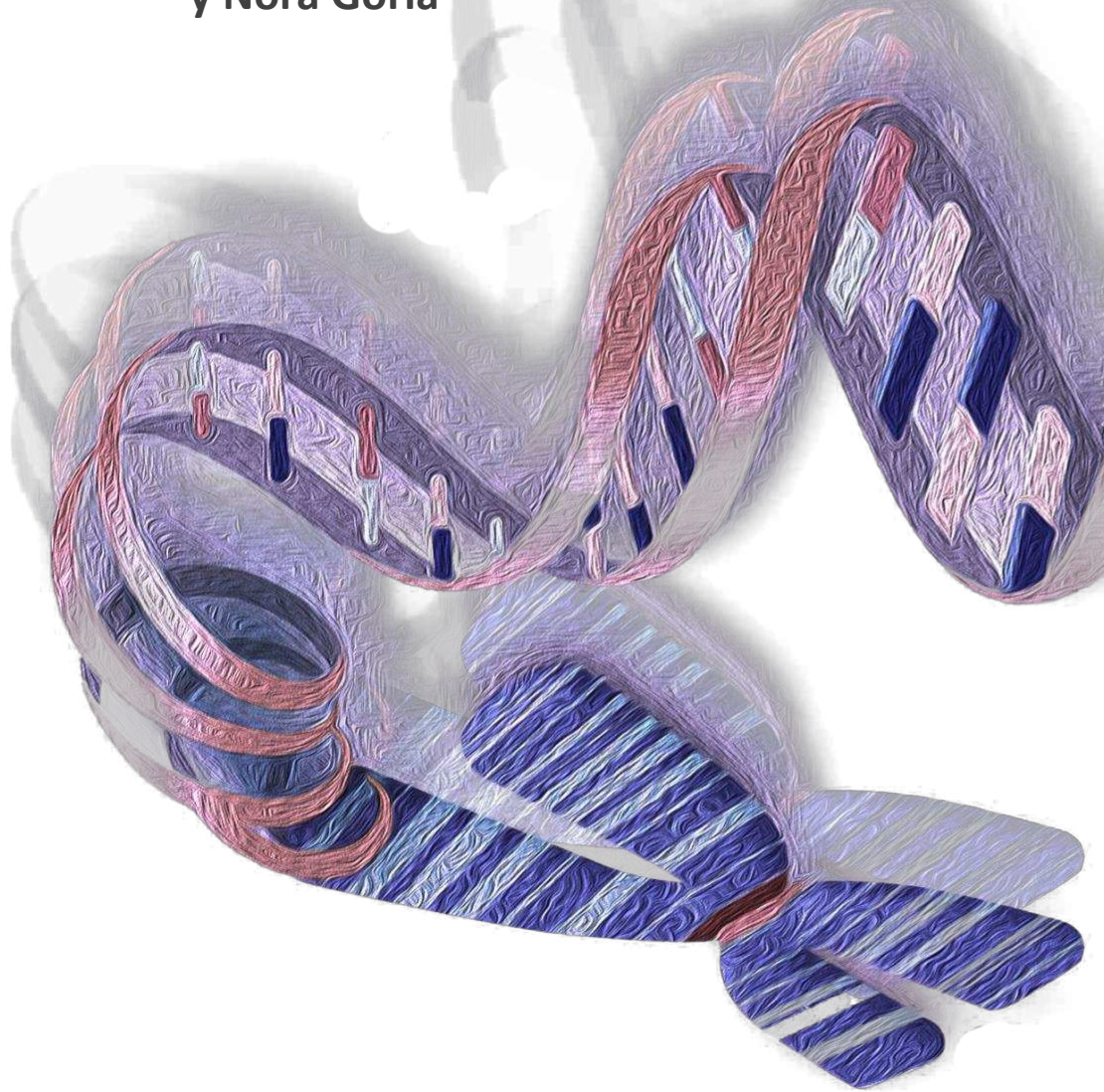


CITOGENÉTICA

Teoría y Práctica

**Delia Aiassa, Beatriz Bosch,
Natalia Gentile, Fernando Mañas
y Nora Gorla**



MANUAL

CITOGENÉTICA
Manual
Teoría y práctica

Delia Aiassa
Beatriz Bosch
Natalia Gentile
Fernando Mañas
Nora Gorla

Colección Manuales

Citogenética: teoría y práctica: manual /
Delia Aiassa... [et.al.]. - 1a ed. - Córdoba: CEPYD, 2015.
E-Book.

ISBN 978-987-29502-3-1

1. Citología. 2. Manual. I. Aiassa, Delia
CDD 572.8

Fecha de catalogación: 17/03/2015

Queda hecho el depósito que marca la Ley 11.723
Impreso en Argentina – Printed in Argentina
Queda prohibida la reproducción total o parcial del texto de la presente
obra en cualquiera de sus formas, electrónico o mecánica
sin el consentimiento previo y escrito de los autores.

Imagen de tapa tomada y modificada de http://www.ferato.com/wiki/index.php/Imagen:20080519_mgb_Cromosoma_.jpg

INDICE	Página
INTRODUCCIÓN	5
Historia de la Citogenética	7
Revisión de los aspectos citogenéticos de la herencia	9
Bibliografía de consulta	11
1 CROMOSOMAS AUTOSÓMICOS Y SEXUALES	12
Morfología de los cromosomas	12
Mecanismos de determinación sexual y cromosomas sexuales	13
Determinación genética del sexo	13
Historia de los cromosomas heteromorfos	14
Sistema XX/XY	15
Sistema ZZ/ ZW	16
Sistema determinado por la proporción de cromosomas X respecto de la dotación de cromosomas autosómicos	17
Sistema de cromosomas sexuales múltiples	18
Haplodiploidía - Sistema XX/XO	18
Determinación ambiental del sexo	19
ACTIVIDADES DE COMPRENSIÓN	21
1 Observación al microscopio óptico	21
2 Armado de cariotipo humano con coloración de Giemsa	22
3 Análisis de diferentes situaciones	24
Bibliografía citada y de consulta	28
2 CROMOSOMAS A PARTIR DE MATERIAL DIRECTO	30
Material directo y preparados cromosómicos	30
Estudio de cromosomas en material directo	32
Mediciones	32
Idiograma	33
Índice mitótico (IM)	33
Figuras meióticas	34
ACTIVIDADES DE COMPRENSIÓN	35
1. Obtención de preparados	35
2. Observación al microscopio, cálculo de IM e IF	37
3. Observación al microscopio de figuras meióticas	39
4. Análisis de esquemas y fotografías de meiosis	39
5. Armado de cariotipos a partir de mediciones cromosómicas	43
Bibliografía citada y de consulta	44
3 CROMOSOMAS A PARTIR DE CULTIVOS CELULARES	46
Cultivo celular	46
Contenedores y composición de los medios más utilizados para cultivos celulares	50
Sitios frágiles y cromosomas prometafásicos	50
ACTIVIDADES DE COMPRENSIÓN	51
Bibliografía citada y de consulta	54
4 METODOS PARA EL ESTUDIO DE LOS CROMOSOMAS BANDAS Q, G, C, NOR, R.	55
Material de estudio y métodos utilizados en citogenética	55
Colorantes Fluorescentes	56
Nomenclatura de las bandas y sub-bandas	59
Resolución de bandas	59
ACTIVIDADES DE COMPRENSIÓN	62
Bibliografía citada y de consulta	68
5 CITOGENÉTICA MOLECULAR	69
Hibridación in situ	69
Hibridación in situ en interfase nuclear (ish nuc)	71
FISH Multicolor	71
ACTIVIDADES DE COMPRENSIÓN	72

Bibliografía de consulta	78
6 CITOGENÉTICA DE PLANTAS	79
Cromosomas de las plantas	79
Citogenética molecular en plantas	81
Cromosomas B en los vegetales	82
<i>ACTIVIDADES DE COMPRENSIÓN</i>	83
Bibliografía de consulta	89
7 CITOGENÉTICA ANIMAL	90
Estudios cromosómicos en animales	90
Animales domésticos y citogenética	92
<i>ACTIVIDADES DE COMPRENSIÓN</i>	94
Bibliografía de consulta	106
8 CITOGENÉTICA HUMANA	108
Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética	108
Especialidades médicas y diagnóstico citogenético	110
Anomalías cromosómicas humanas	111
Normatizaciones para los laboratorios de citogenética	114
<i>ACTIVIDADES DE COMPRENSIÓN</i>	122
Bibliografía de consulta	127
9 CITOGENÉTICA Y CÁNCER	128
Variaciones cromosómicas y neoplasias	128
<i>ANÁLISIS CITOGENÉTICO</i>	134
<i>ACTIVIDADES DE COMPRENSIÓN</i>	141
Bibliografía de consulta	149
10 CITOGENÉTICA APLICADA A LA DETECCIÓN DE DAÑO GENÉTICO	150
La detección de mutágenos y carcinógenos	150
Los ensayos de genotoxicidad	157
<i>ACTIVIDADES DE COMPRENSIÓN</i>	167
Bibliografía de consulta	170

INTRODUCCIÓN

Este manual contiene actividades básicas de apoyo para un curso de Citogenética. Al inicio de cada contenido a desarrollar se presenta una breve introducción relacionada con la temática comenzando con la definición de la ciencia y su historia.

El propósito de este material didáctico es el de presentar a los estudiantes universitarios un conjunto de actividades de comprensión que se implementaron y se mejoraron durante el proceso de enseñanza y aprendizaje de la asignatura Citogenética Básica y Aplicada (3133) de las carreras Licenciatura y profesorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Río Cuarto, desde hace más de cinco años.

CITOGENÉTICA: área de la Genética que estudia la estructura, función y comportamiento de los cromosomas.

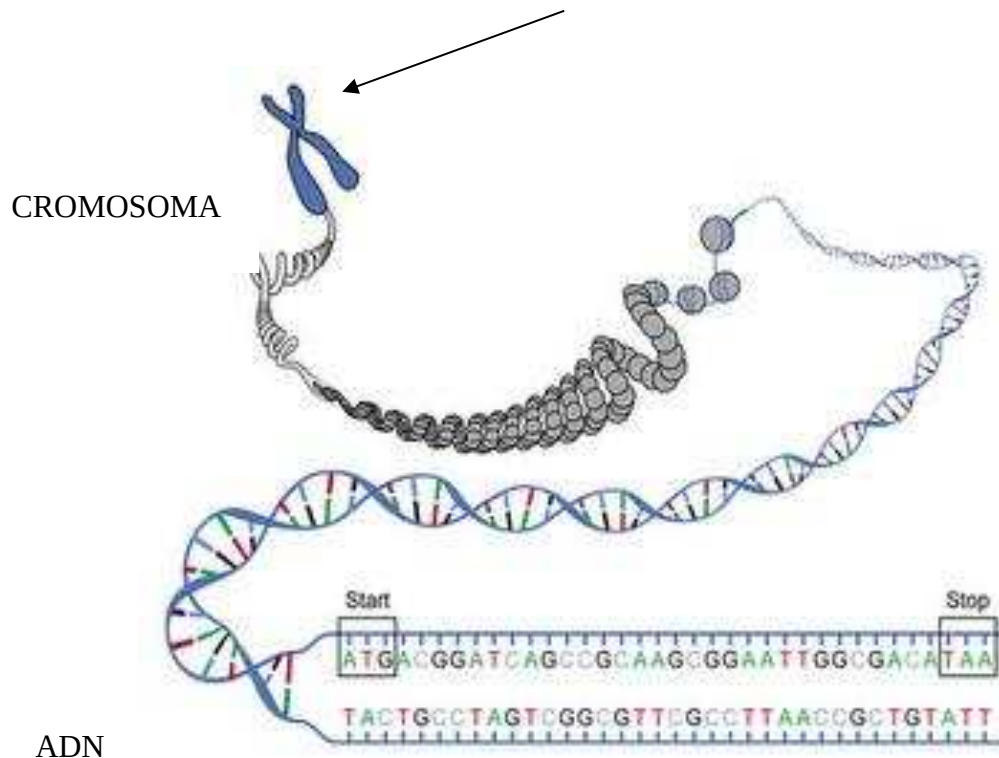


IMAGEN TOMADA de <http://imagenessincopyright.blogspot.com/2011/08/estructura-del-adn.html>



A principios de 1870, el bioquímico Friedrich Meischer obtuvo una sustancia química no conocida a partir del núcleo, un material ácido con un muy alto contenido de fósforo. Debido a que estaba en el núcleo y a sus propiedades ácidas, se dio a este material el nombre de ácido nucleico. A principios de 1900, cuando se descubre que los cromosomas eran los portadores de la información genética, los estudios se enfocaron en el análisis de su composición química. Hoy sabemos que un cromosoma eucariótico está compuesto de proteínas, una proporción mayor de una clase específica de ácido nucleico, el ácido desoxirribonucleico (ADN) y una pequeña proporción de otro ácido nucleico, el ácido ribonucleico (ARN).

Friedrich Meischer

Historia de la Citogenética

Los cromosomas fueron observados por primera vez en células de plantas por el botánico suizo Karl Wilhelm von Nägeli en 1842 e, independientemente, por el científico belga Edouard Van Beneden en nemátodos del género *Ascaris*. El uso de drogas basofílicas (p.ej. las anilinas) en las técnicas citológicas para observar el material nuclear fue fundamental para los descubrimientos posteriores.

Aunque la citogenética como disciplina, ha existido desde el 1800, muchos consideran que tuvo su comienzo oficial en 1956 cuando los investigadores Tjio y Levan sugirieron por primera vez que podría haber 46 cromosomas en la especie humana en lugar de los 48 que se creyeron por 30 años. Pero, no fue sólo este conocimiento, sino la manera en que se pudieron ver y contar los cromosomas que se convirtió en el acontecimiento primordial en la citogenética. Lo fue porque, por primera vez, los investigadores habían podido ver los cromosomas como algo diferente a una masa de líneas vermiformes. Hasta se le dio un nombre al milagro: «el milagro hipotónico». En realidad, según Kimberly Hayes, no comenzó siendo un milagro. Comenzó con un error, cuando un auxiliar en el laboratorio del Dr. T. C. Hsu, un citogenetista de renombre mundial, volcó por error una solución salina sobre una muestra provocando que las células, increíblemente y de forma imprevista, se separasen y los cromosomas se hicieran visibles.

El descubrimiento realizado por Tjio y Levan (1956) permitió una efectiva separación de los cromosomas y su adhesión al portaobjeto en un único plano óptico.

En esa época el protocolo de Tjio y Levan (colchicina, choque hipotónico, fijación con ácido acético y etanol y coloración con azul de Unna) para poder observar las células en división fue utilizado por los médicos Jérôme Lejeune y Marta Gauthier en París (Francia). Lo notable del caso es que, con este método, lograron obtener metafases increíblemente claras, con cromosomas largos y libres de distorsión mecánica dado que todo el procedimiento se realizaba dentro del tubo de cultivo, lo que evitaba cualquier perturbación celular o producción de artefactos indeseables y, lo cual era sumamente importante, impedir la mezcla de cromosomas provenientes de células vecinas asegurando un recuento e identificación precisos de los cromosomas de cada metafase. Al alcanzar este punto de perfeccionamiento tecnológico, Lejeune dedicó considerable tiempo a establecer con singular precisión el

cariotipo humano de varones y mujeres. Sus inequívocas y admirables imágenes cariológicas lo impulsaron a intentar la identificación de cada par cromosómico. En particular, no existían dudas sobre los pares 1, 2, 3, 9, 16 y el Y, pero la clasificación de los miembros de los pares 4-5, 6-12 inclusive el X, 13-15, 17-18, 19-20 y 21-22, resultaba muchísimo más problemática. No obstante, Lejeune manifestó que *"aunque era algo ilusoria la tarea de identificar esos grupos de cromosomas valía la pena esforzarse en diferenciarlos"*, aconsejando observar detenidamente pequeñas variaciones morfológicas orientadoras.

CARIOTIPO: Cariotipo: Del griego *karyon*, núcleo y *tipos*, huella

Levitsky (1924) fue el primero en dar una definición a cariotipo como el aspecto fenotípico de los cromosomas somáticos, en contraste con su contenido de genes. Este concepto siguió siendo estudiado con los trabajos de Darlington (1939) y White (1973a y b).

El término se utiliza actualmente para el conjunto completo de cromosomas en una especie, un organismo o una célula.

Darlington C.D. 1939. Evolution of genetic systems. Cambridge University Press. 2nd ed, revised and enlarged, 1958. Oliver & Boyd, Edinburgh.

Levitsky G.A. 1924. The material basis of heredity. State Publication Office of the Ukraine, Kiev. [in Russian]

White M.J.D. 1973a. Animal cytology and evolution. 3rd ed, Cambridge University Press.

White M.J.D. 1973b. The chromosomes. 6th ed, Chapman & Hall, London.

La minuciosa y exacta clasificación usada por Lejeune fue reiteradamente rebatida por muchos autores de aquella época. Es absolutamente sorprendente, en el contexto actual, la extensa polémica (122 páginas) que originó una de las presentaciones de Lejeune controvertida particularmente por Klaus Patau, el descubridor de la trisomía 13. Durante la mencionada presentación, Lejeune expuso un nuevo método para identificar en particular cada par del grupo 6-12 cuyos pares carecían de marcadores cromosómicos especiales (a excepción del par N° 9 que porta una constricción secundaria muy clara) empleando la longitud relativa y el índice centromérico. Lejeune empleó una técnica fotográfica de desenfoque de los puntos obtenidos pensando que las áreas de mayor concentración de dichos puntos representaban las localizaciones medias correspondientes a cada par inclusive el X. Aunque algunos de los fundamentos matemáticos que Patau empleó para oponerse a los puntos de vista de Lejeune eran en parte ciertos, debe señalarse que sus errores de apreciación se originaron principalmente por el empleo de cromosomas sumamente acortados debido al uso de dosis elevadas de colcemid (una colchicina sintética sumamente activa), lo cual le impedía detectar pequeñas variaciones morfológicas existentes entre los distintos pares cromosómicos. Era claro que en ese tiempo dos "escuelas citogenéticas" (la francesa y la anglosajona) se oponían generando encendidas polémicas.

Nomenclatura. ¿Cómo se escribe el cariotipo?

El cariotipo de una célula, de un individuo o de una especie se escribe indicando el número total de cromosomas (incluidos los sexuales) seguido de una coma y a continuación los cromosomas sexuales.

El cariotipo de una mujer es: 46, XX

El cariotipo de un varón es: 46, XY

Si existen anomalías cromosómicas, éstas se escriben a continuación del par sexual precedidas de una coma.

El cariotipo de una mujer con un cromosoma 21 extra es: 47, XX, +21

Revisión de los aspectos citogenéticos de la herencia**1. El ciclo celular**

- a) Realiza un esquema que represente el ciclo celular indicando el nombre de cada fase.
- b) ¿Qué enzimas participan en el ciclo celular? Señala en el esquema de la pregunta 1, dónde actúan cada una de ellas.
- c) ¿Cuál es la fase del ciclo celular dónde cada cromosoma está compuesto de dos cromátidas?
- d) ¿Cuál es la etapa del ciclo celular dónde la célula se está preparando para comenzar la replicación del ADN?
- e) ¿Qué características de la división celular son diferentes en células animales y vegetales?
- f) El esputo (secreción expulsada de los pulmones) de muchos fumadores contiene células con mutaciones (errores) en el gen p53. Las mutaciones inducidas por el hábito de fumar parecen ser un signo precoz, indicando la posible aparición de cáncer de

pulmón. ¿Cuál es la probable relación entre una temprana mutación en p53 y el desarrollo de cáncer de pulmón?

2. La Mitosis

- a) ¿Cuál es el significado biológico de la Mitosis?
- b) ¿En qué etapa de la mitosis, los cromosomas comienzan a volverse visibles en el microscopio?
- c) ¿Cuál es la alteración más frecuente que puede ocurrir en la división mitótica?

3. La Meiosis

- a) ¿Cuál es el significado biológico de la Meiosis?
- b) ¿Cuáles son las diferencias entre la segregación de cromosomas meiótica y mitótica?
- c) ¿Cuáles son los modelos de organización de los cromosomas en la meiosis?

4. Teoría cromosómica de la herencia

- a) ¿Cuáles son los postulados de la Teoría cromosómica de la herencia? ¿quién fue el científico que la enuncia? ¿en qué año?
- b) ¿Cuáles son los aportes de las investigaciones de Walter Sutton en 1902?
- c) ¿Cómo se hereda el material genético? Patrones de herencia clásicos y no clásicos.

Bibliografía de consulta:

1. Brown T. 2008. Genomas. 3ª edición. Editorial Médica Panamericana.
2. Griffith A., W. Gelbart, J. Miller y R. Lewontin 2000. Genética Moderna. McGraw-Hill-Interamericana. Griffiths A., Wessler S., Lewontin R., Carroll S. 2008. Genética 9ª edición en español. Editorial McGraw-Hill.
3. Griffiths A., S. Wessler, R. Lewontin y S. Carroll. 2008. Genética 9ª edición en español. Editorial McGraw-Hill. Pierce B. 2005. Genética. Un enfoque Conceptual. 2ª edición en español. Editorial Médica Panamericana.
4. Klug W., M. Cummings y C. Spencer. 2006. Conceptos de Genética. 8ª edición. Editorial Pearson-Prentice Hall.

1 CROMOSOMAS AUTOSÓMICOS Y SEXUALES

Morfología de los cromosomas

Los cromosomas se observan en el microscopio óptico, como estructuras delgadas y alargadas. Tienen un brazo corto y otro largo separados por un estrechamiento o constricción primaria, llamada centrómero. El brazo corto se designa como **p** y el brazo largo como **q**. El centrómero es el punto donde se une el huso mitótico y es parte integral del cromosoma. Es esencial para el movimiento y segregación normales del cromosoma durante la división celular. Los cromosomas metafásicos presentan cuatro formas básicas y se pueden clasificar de acuerdo con la longitud de los brazos corto y largo, así como por la posición del centrómero. Los cromosomas **metacéntricos** tienen los brazos corto y largo de aproximadamente la misma longitud, con el centrómero en el punto medio. Los cromosomas **submetacéntricos** tienen los brazos corto y largo de longitudes desiguales, con el centrómero más próximo a uno de los extremos. Los cromosomas **acrocéntricos** tienen el centrómero muy cerca de un extremo, con un brazo corto muy pequeño. Con frecuencia tienen constricciones secundarias en los brazos cortos, que conectan trozos muy pequeños del ADN, llamados tallos y satélites, con el centrómero (Figura 1). Los tallos contienen genes que codifican el ARN ribosómico. Los cromosomas **telocéntricos** tienen el centrómero en un extremo.

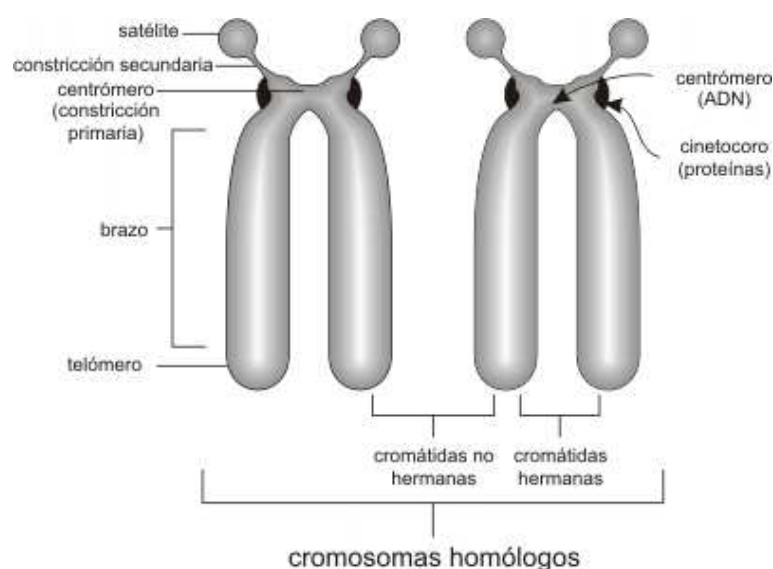


Fig. 1. Partes de cromosomas metafásicos acrocéntricos en mitosis

IMAGEN TOMADA de <http://www.genomasur.com/lecturas/Guia10.htm>

En la morfología cromosómica dos estructuras son funcionalmente muy importantes: los telómeros y los centrómeros:

Los telómeros cumplen importantes funciones en la replicación del cromosoma y mantenimiento de la proliferación celular, ayudan a prevenir la proliferación ilimitada, están formados por 100 a 1.000 repeticiones de una simple secuencia que contiene grupos de residuos G (en los seres humanos AGGGTT), cada división celular los telómeros se acortan 50 a 100 nucleótidos, la enzima telomerasa mantiene la longitud de los mismos.

Los centrómeros dirigen el movimiento de los cromosomas durante las divisiones celulares. Están “incrustados” en la heterocromatina, están formados por secuencias de ADN satélite (ricas en AT) repetidas miles de veces. Las proteínas se unen en los mismos para formar el cinetocoro formando el sitio de unión a los microtúbulos del huso celular.

Mecanismos de determinación sexual y cromosomas sexuales

En la naturaleza encontramos al menos dos mecanismos de determinación sexual:

- **Determinación genética del sexo (GSD-** sigla de “Genetic Sex Determination”)
- **Determinación ambiental del sexo (ESD-** sigla de “Environmental Sex Determination”)

La determinación genética del sexo es el mecanismo por el cual uno o varios genes ubicados en cromosomas sexuales o no, determinan que el embrión se desarrolle como macho o hembra. En la determinación ambiental, el ambiente tiene una enorme influencia en la determinación del sexo, principalmente dependiente de la temperatura. En algunos reptiles, como todos los cocodrilos, la mayoría de las tortugas y algunos lagartos, la determinación del sexo se consigue de acuerdo con la temperatura de incubación de los huevos durante un período crítico en el desarrollo embrionario.

Determinación genética del sexo

En la determinación genética pueden encontrarse heterogamia, arrenotoquia (haplo-diplodía) o determinación polifactorial (poligénica).

En la determinación sexual por **Heterogamia** existen cromosomas heteromorfos, es decir los cromosomas sexuales difieren en ambos sexos. Pueden ser machos XY y por lo tanto con heterogamia masculina o hembras ZW y en ese caso existe heterogamia femenina. Los

cromosomas sexuales heteromorfos definen la determinación sexual, la cual es determinada en la concepción. También se observa heterogamia masculina en el sistema determinado por la proporción de cromosomas X respecto de la dotación de cromosomas autosómicos.

En la **haplo-diploidía** los machos se originan a partir de huevos no fertilizados y las hembras de huevos fertilizados. La determinación sexual puede ser ambiental (basada en la fertilización) o puede ser genotípica (basada en el nivel de ploidía u otro).

En la determinación del sexo **Polifactorial** el sexo se determina en el cigoto por efecto acumulado de muchos factores con efectos individuales pequeños, pudiendo influir también el ambiente. Este sistema de determinación del sexo se puede observar en peces.

Historia de los cromosomas heteromorfos

En 1891 el biólogo alemán Henking observó que algunas células espermáticas de algunos himenópteros tenían 12 cromosomas mientras otras tenían 11. A este misterioso elemento nro. 12, que era diferente del resto, lo llamó “elemento X”, para destacar su naturaleza desconocida. Mc Clung amplió estos estudios a arácnidos, roedores y ortópteros y en 1902 comunicó, avalado por su discípulo Sutton, que este “cromosoma X” estaría involucrado funcionalmente en la determinación del sexo.

Hasta el presente se conocen los siguientes cromosomas sexuales y mecanismos de determinación sexual con cromosomas heteromorfos (Tabla I):

Tabla I. Sistemas de determinación sexual con cromosomas heteromorfos

Cromosomas sexuales	Presentes en:	Sistema de determinación sexual	
		Machos	Hembras
X e Y	Humanos, otros mamíferos. Hemíptera.	XY	XX
Z y W	Numerosas aves, invertebrados (lepidoptera, trichoptera, crustacea, trematoda). Algunos reptiles, anfibios y peces	ZZ	ZW
Balance X/Autosómicos	Diptera (<i>Drosophila sp.</i>)	X/2A XY/2^a	3X/3A 2X/2^a
X e Y Z y W (cromosomas sexuales múltiples)	Algunos mamíferos, y reptiles	$X_1X_2Y_1Y_2$ $X_1X_1X_2X_2$ ZZZ ZZWW, ZWW, y variantes	

Sistema XX/XY

El Sistema XX/XY es el más común de los sistemas de determinación cromosómica. Está presente en la especie humana y otros mamíferos. Los dos cromosomas sexuales (X e Y) generalmente son muy diferentes en forma y tamaño (Figura 2). En el hombre el cromosoma Y es considerablemente más pequeño que el X. El informe de la OMIM: On Line Mendelian Inheritance in Man, con fecha de marzo del 2012 indica que el cromosoma X humano contiene alrededor de 718 genes y el cromosoma Y solamente 46 genes. Esta diferencia en el número de genes está dada no solamente por el tamaño mucho más pequeño del cromosoma Y sino que además aproximadamente el 40% de su extensión es un gran bloque heterocromático en el brazo q, carente de genes codificantes.

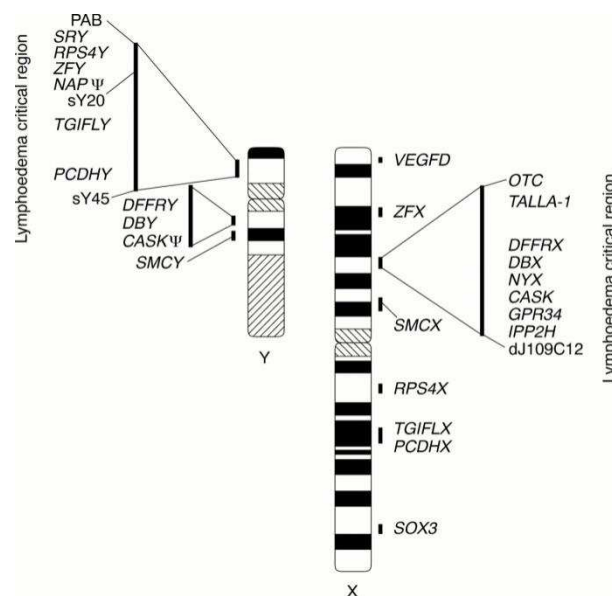


Fig. 2. Morfología y tamaño de los cromosomas sexuales Y - X de *Homo sapiens*.

En los esquemas se indica la localización de los genes.

IMAGEN TOMADA de J Med Genet 2001;38:591-598 doi:10.1136/jmg.38.9.591

Este sistema fue descubierto en hemípteros (*Lygaceus*), las hembras son $2n = 14$ y los machos también. Las hembras son XX homogaméticas. Los machos son XY heterogaméticos porque producen dos tipos diferentes de gametas respecto de sus cromosomas sexuales. El sexo de la descendencia es determinado por el macho al igual que en el sistema XX/X0.

En función de la localización de los genes en las distintas regiones de estos cromosomas se conoce la herencia Ligada al X y herencia ligada al Y.

En los *Homo sapiens*, el cromosoma Y determina la masculinidad. Los cariotipos Klinefelter (47,XXY y variantes) y Turner (45,X y variantes) y sus correspondientes fenotipos sexuales masculino y femenino respectivamente, permiten concluir que el cromosoma Y determina la masculinidad. En su ausencia el sexo del individuo es femenino, incluso si sólo se encuentra un cromosoma X. La presencia del cromosoma Y en los hombres con síndrome de Klinefelter es suficiente para determinar la masculinidad, aun cuando no se complete el desarrollo masculino. Igualmente, en el caso de las mujeres con síndrome de Turner, no se produce la masculinización.

En la región del cromosoma Y que determina el sexo (SRY) un producto génico: el factor de la determinación testicular (TDF) obliga al tejido indiferenciado gonadal del embrión a formar testículos. En la especie humana, se estima que también otros genes autosómicos forman parte de una cascada de expresión génica iniciada por SRY, como los genes SOX9, WT1, SF1, entre los más estudiados.

Sistema ZZ/ZW

Este sistema está presente en aves, algunos insectos, algunos reptiles, algunos anfibios y peces, y al menos en una planta (*Fragaria orientalis*). En el caso de los animales las hembras son ZW heterogaméticas y los machos son ZZ homogaméticos. Los óvulos de la hembra son los que determinan el sexo. En función de la localización de los genes en las distintas regiones de estos cromosomas se habla de herencia Ligada al Z y herencia ligada al W.

En algunos reptiles (ej: “serpientes”) que presentan la forma ZZ/ZW, es imposible distinguir un cromosoma sexual de cualquier otro en ambos sexos. También en este grupo se encuentran ambos sistemas XX/XY y ZZ/ZW, dependiendo de la especie.

El gen DMTR1 del cromosoma Z estaría involucrado en la determinación sexual de las aves. Las aves *Gallus gallus* tienen dos copias del gen DNRT1 que está localizado en el cromosoma Z. En mamíferos está localizado en el cromosoma 9 y también es necesario para el desarrollo testicular aún en presencia del gen SRY.

En la Figura 3 se observa la escasa diferencia de tamaño entre los cromosomas Z y W comparados con los cromosomas sexuales de la figura 2.

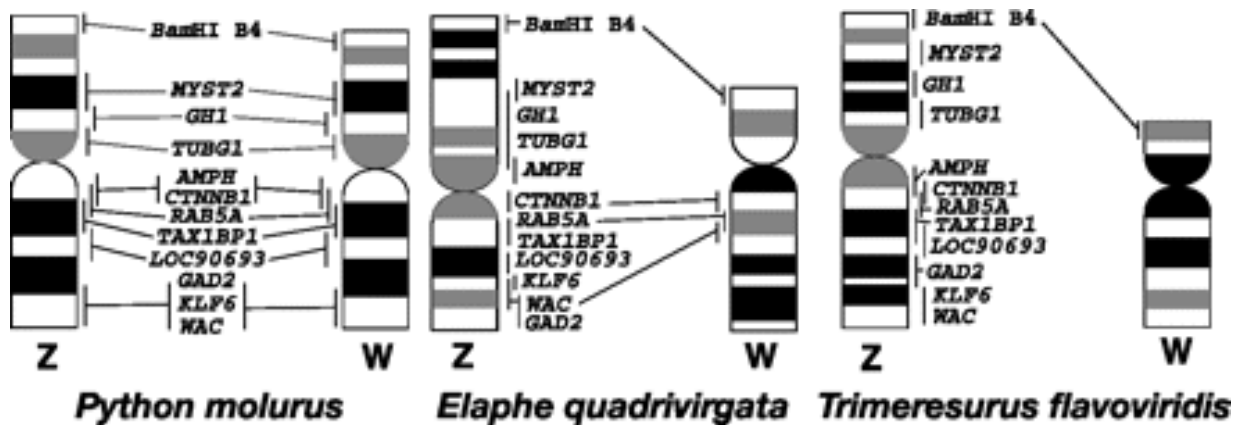


Fig. 3. Cromosomas sexuales de tres especies de serpientes.

IMAGEN TOMADA de PNAS (2006).

Sistema determinado por la proporción de cromosomas X respecto de la dotación de cromosomas autosómicos

En algunos dípteros, como en *Drosophila*, que posee cromosoma Y, la determinación del sexo cromosómico está dada por los cromosomas sexuales y además por los cromosomas autosómicos. El nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Figura 4) también presenta este tipo de determinación cromosómica del sexo, aunque carece de cromosoma Y.



Fig. 4. *Caenorhabditis elegans*

IMAGEN TOMADA de <http://cims.nyu.edu/~binliu/hobbies.html>

En este sistema el factor crítico en la determinación del sexo es la proporción de cromosomas X respecto del número de dotaciones autosómicas haploides (A) presentes. Las hembras normales ($2X: 2A$) y triploides son fértiles, ambas con proporción 1:1.

Sistema de cromosomas sexuales múltiples

Este sistema está formado por varios cromosomas sexuales en lugar de solamente dos como en los casos anteriores. Dos de ellos tienen centrómero de los cromosomas X, Y, Z o W según corresponda a la especie y el/los otro/otros son cromosomas con regiones de cromosomas autosómicos y otras regiones de aquellos cromosomas.

En la notación: el número en subíndice indica si el centrómero pertenece al cromosoma sexual (1) o al cromosoma autosómico (2):

Por ejemplo:

X: cromosoma X original.

Y_1 : cromosoma producto de una translocación entre el cromosoma Y y el autosoma, conserva el centrómero del Y.

Y_2 : cromosoma producto de una translocación entre el cromosoma Y y el autosoma, conserva el centrómero del autosoma.

Haplodiplodía - Sistema XX/XO

El sistema XX/XO es el sistema de determinación del sexo de numerosos insectos. Las hembras son XX y los machos XO tienen un solo cromosoma sexual. Los machos pueden originarse a partir de dos mecanismos diferentes: por el desarrollo de huevos sin fertilizar (n) o por pérdida de un genoma parental (n). Los Hymenoptera, Thysanoptera, Nematoda, Coleoptera tienen especies que desarrollan machos a partir de huevos sin fertilizar. En Diptera hay especies que desarrollan machos a partir de la pérdida de un genoma parental.

Este sistema fue descubierto en 1906 por E Wilson en el insecto *Protenor*, las hembras son $2n=14$ y homogaméticas, los machos son $2n=13$ y producen gametas con 6 y 7 cromosomas. La fecundación por un espermatozoide que lleva el cromosoma X da descendencia femenina. Y la fecundación por un espermatozoide sin cromosoma X da lugar a descendencia masculina.

Al igual que en el sistema XY el sexo de la descendencia es determinado por el macho. Este aporta un cromosoma X para las hembras y ninguno para los machos.

Todos los Himenópteros son *haplodiploides* esto es, los machos son haploides y las hembras diploides. Los machos se desarrollan a partir de huevos *sin fecundar*, y tienen sólo una copia de cada cromosoma; las hembras se desarrollan de huevos *fecundados* y tienen dos copias de cada cromosoma. El himenóptero *Apis mellifera* (Figura 5) tiene 32 cromosomas. La descendencia de una reina, que nacen de óvulos fecundados, son las obreras con 32 cromosomas. La que nace de óvulos sin fecundar, son los zánganos con 16 cromosomas.



Fig. 5. *Apis mellifera*

IMAGEN TOMADA de <http://www.duke.edu/~jspippen/hymenoptera/apis.htm>

Determinación Ambiental del sexo.

Además de la temperatura como factor ambiental más difundido en la determinación del sexo, existen otros factores predisponentes que se observan en invertebrados. Los invertebrados presentan una alta diversidad de mecanismos de determinación del sexo, incluyendo tanto determinación genética del sexo (GSD) como determinación ambiental del sexo (ESD) que se presentan en la Tabla III.

Tabla III: Mecanismos de determinación sexual ambiental descriptos para invertebrados (Modificada de Cook 2002).

Factores predisponentes	HEMBRAS	MACHOS	Ejemplos
Temperatura	Alta	Baja	Diptera (<i>Aedes stimulans</i>)
Nivel de nutrición de la madre	Alto	Bajo	Nematoda
Fotoperiodo	Corto largo	Largo	Crustacea, Amphipoda
Disponibilidad de pareja	Por omisión	Si hay hembras presentes	Echiuroidea

En síntesis, como se ilustra en la Figura 6, los vertebrados exhiben una extraordinaria variabilidad en los sistemas de constitución cromosómica y de determinación sexual.

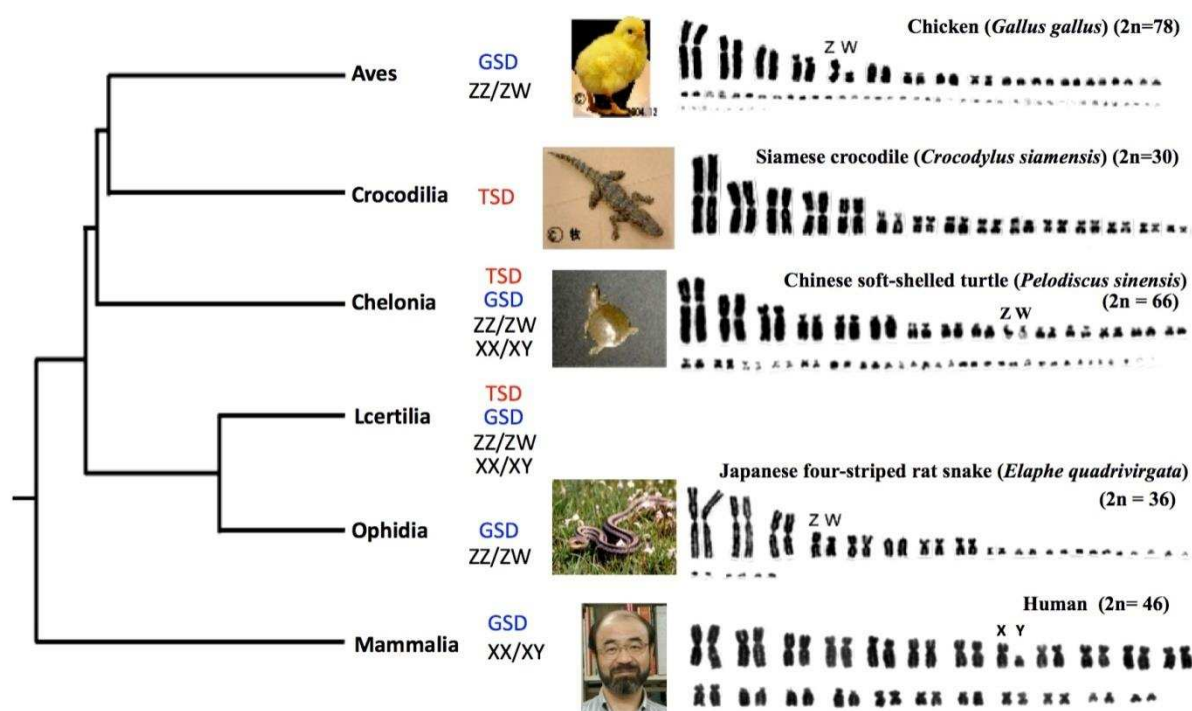


Fig. 6. Sistemas de determinación cromosómica del sexo y de determinación sexual (Dr. Yoichi Matsuda, Nagoya University, Japón).

IMAGEN TOMADA de <http://www.bio.nagoya-u.ac.jp/gcoe/english/member/matsuday.html>

En marsupiales al igual que los mamíferos placentarios el sistema de determinación sexual más extendido es XX/XY, las aves tienen un sistema ZZ/ZW, los reptiles y anfibios tienen diferentes sistemas, incluyendo la determinación sexual dependiente de la temperatura, y los sistemas XX/XY y ZZ/ZW que difieren en su origen de las aves y de los mamíferos placentarios. Los mapas génicos comparativos entre *Homo sapiens* y *Gallus gallus* revelan

que los cromosomas sexuales humanos XX/XY y de gallina ZZ/ZW no presentan homologías, sugiriendo que los cromosomas sexuales de mamíferos y de aves derivan de pares diferentes de cromosomas autosómicos de un ancestro común.

ACTIVIDADES DE COMPRENSIÓN

Para construir comprensión sobre los contenidos desarrollados en este capítulo se presentan actividades que permiten:

- Determinar morfologías cromosómicas con coloración de Giemsa
- Armar cariotipos con coloración de Giemsa
- Interpretar numérica y estructuralmente cariotipos de diferentes especies de animales
- Recabar información, analizarla y elaborar producciones escritas

1. Observación de cromosomas al microscopio óptico

- Recorre en 40X un extendido cromosómico e identifica las metafases
- Dibuja una metafase en 100X ocupando todo el espacio siguiente e indica las diferentes morfologías cromosómicas que observas

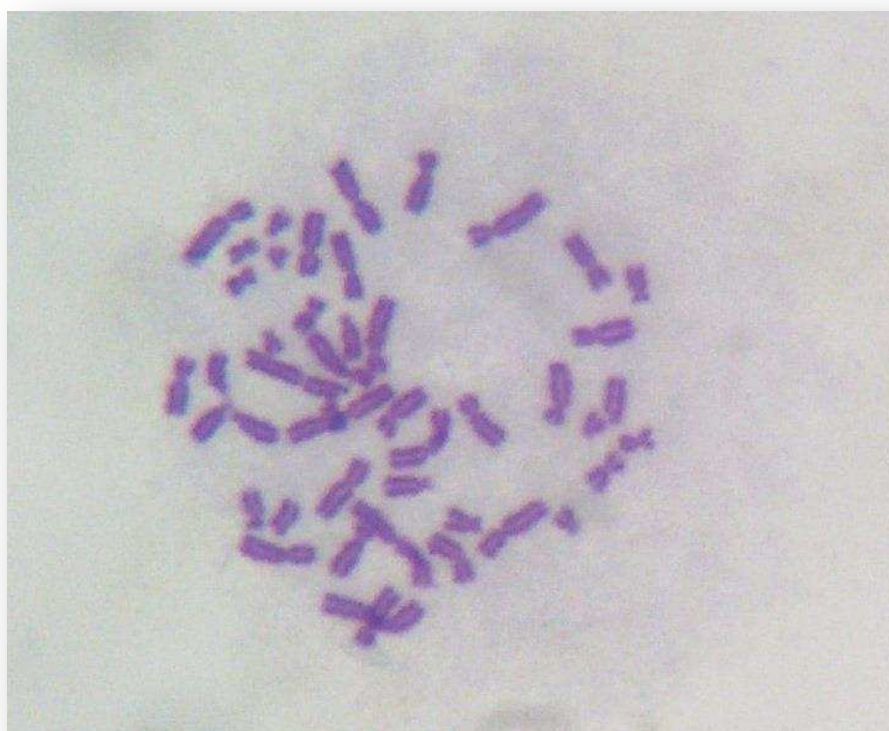
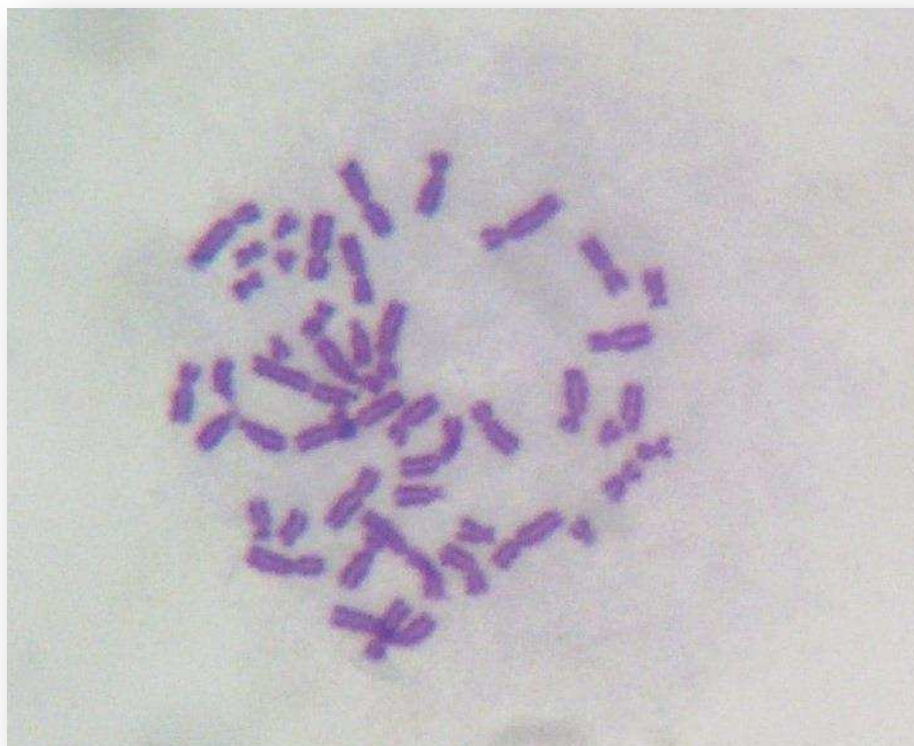
2. Armado de cariotipo humano con coloración de Giemsa

Utiliza la microfotografía de la metafase de linfocitos humanos de la página 23 y procede de la siguiente manera:

- Recorta los cromosomas
- Ordena los cromosomas según el tamaño y posición del centrómero en el esquema que se presenta a continuación

Esquema para armar un cariotipo humano

1	2	3	4	5			
6-12							
13	14	15	16	17	18	19	20
21	22	X	Y				

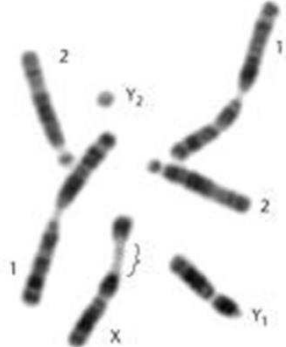


Microfotografía de metafases de linfocitos humanos con coloración convencional de Giemsa.
(Foto: Beatriz Bosch)

3. Análisis de diferentes situaciones

- En la observación que realizaste y el cariotipo armado: ¿Cuántas cromátidas hermanas tiene cada cromosoma? ¿La información que posee una cromátida es la misma respecto de la otra? ¿Por qué?
- ¿El cariotipo que armaste pertenece a un hombre o a una mujer? ¿Por qué?
- En el cariotipo con coloración de Giemsa, ¿qué cromosomas y/o grupos cromosómicos puedes identificar?
- ¿Cuántos pares de cromosomas acrocéntricos se reconocen en el cariotipo que armaste? Indica los números de los pares de cromosomas acrocéntricos.
- En la Tabla IV se muestra un ejemplar de *Muntiacus muntjac* y una metafase obtenida por cultivo de células sanguíneas de un ejemplar de esa especie. Lee la leyenda y observa los cromosomas detenidamente y luego responde los interrogantes que se presentan a continuación del mismo.

Tabla IV: Fenotipo y cariotipo del venado *Muntiacus muntjac*

 IMAGEN TOMADA de http://yeswehunt.eu/download/es/1231664/file/scaletomax-600-600-DOWN/muntjac_shutterstock_518061.gif <i>Muntiacus muntjac</i> de la India es el mamífero que tiene el menor número de cromosomas, $2n=6$. La hembra tiene dos pares de autosomas y un par sexual. Los machos tienen 7 cromosomas.	 IMAGEN TOMADA de http://www.els.net/WileyCDA/ElsArticle/refId-a0005799.html - Escribe el cariotipo que representa la figura del cuadro superior - Indica qué sistema de determinación sexual exhibe y qué significan los subíndices de los cromosomas sexuales. - Indica la morfología de cada par cromosómico - Indica si pertenece a un macho o a una hembra de <i>Muntiacus muntjac</i>
---	---

- En la Tabla V se muestran ejemplares de *Alouatta caraya* y dos cariotipos. Observa los cariotipos detenidamente y luego responde los interrogantes que se presentan a continuación de los mismos.

Tabla V. Fenotipo y cariotipo de primate neotropical *Alouatta caraya*



Ejemplares de *Alouatta caraya*, (una hembra a la izquierda, un macho a la derecha) del Zoológico de Mendoza.

(FOTO D. M. Ferré)

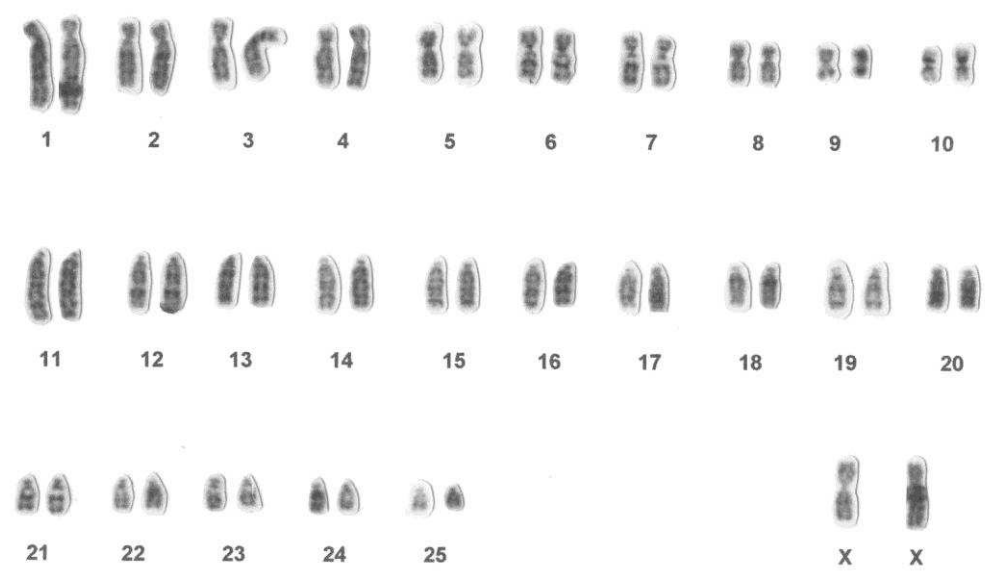


IMAGEN TOMADA de Ferré (2011).

- Escribe el cariotipo que representa la figura anterior
- Indica la morfología de cada par cromosómico
- Indica si pertenece a un macho o a una hembra de *Alouatta caraya*

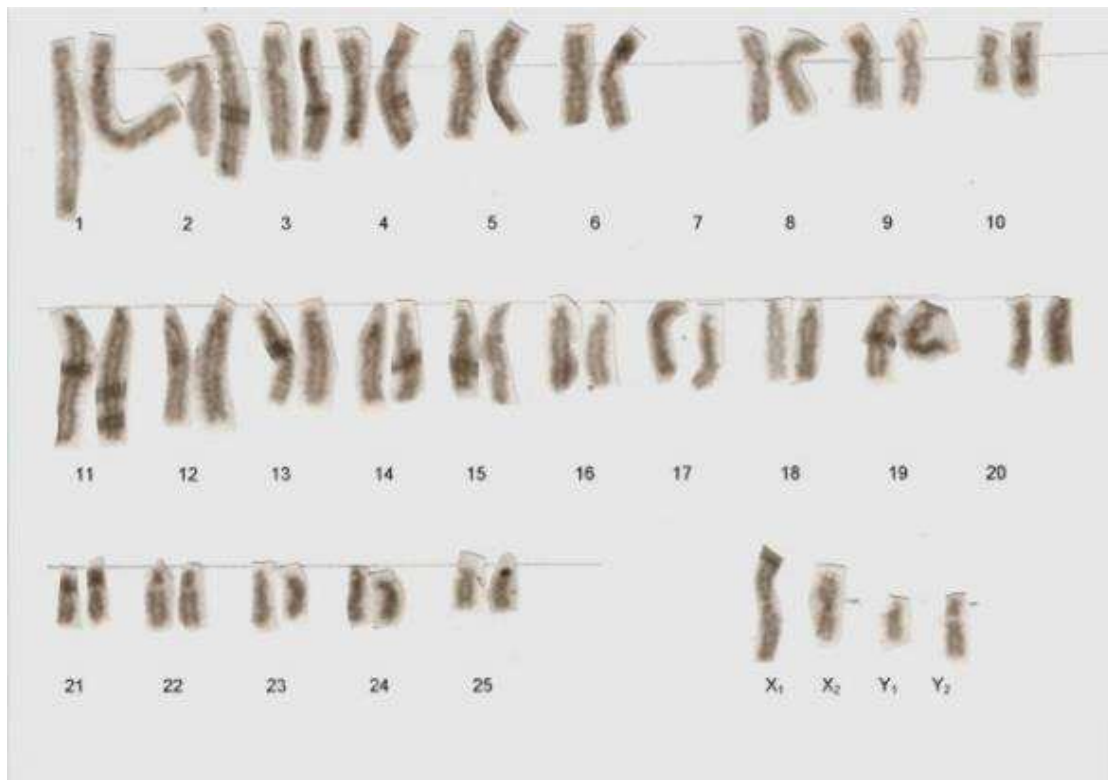


IMAGEN TOMADA de Ferré (2011).

- Escribe el cariotipo que representa la figura anterior
- Deduce y expresa cual es el cromosoma autosómico que trasloca con los cromosomas sexuales
- Indica si pertenece a un macho o a una hembra de *Alouatta caraya*

- En *D. melanogaster* el cromosoma Y es escasamente de mayor tamaño que el X y tiene morfología diferente. Según la relación entre el número de cromosomas X y el número de sets autosómicos (A) se forma una hembra o un macho de la especie.

Observa el contenido de la Tabla VI donde se muestra la fórmula cromosómica y las morfologías sexuales de *Drosophila melanogaster* y luego responde los interrogantes que se presentan a continuación de la misma.

Tabla IV: Fenotipo y cariotipo de *Drosophila melanogaster*

 <i>Drosophila melanogaster</i> IMAGEN TOMADA de http://www.bancomoscas.fciencias.unam.mx	Fórmula cromosómica 3X/2A 3X/3A 2X/2A 3X/4A 2X/3A X/2A XY/2A XY/3A	Morfología sexual metahembra hembra hembra intersexo intersexo macho macho metamacho
---	---	---

- Realiza una búsqueda bibliográfica en relación a los fenotipos de las metahembras, metamachos e intersexos.
- Elabora un texto explicativo con las características de cada uno de los fenotipos mencionados.

Bibliografía citada y de consulta

1. Aiassa, D. y N. Gorla. 2010. Prevalencia de anomalías cromosómicas en pacientes referidos para diagnóstico citogenético en la Ciudad de Río IV. *Experiencia Médica* 28: 5-16.
2. Aiassa, D, R. Martori y N. Gorla. 2005. Citogenética de los lagartos del género *Liolaemus* (Iguania: Liolaemidae) de América del Sur. *Cuadernos de herpetología*, 18, 2, 23-36.
3. Ayala, F.J. y J. A. Kiger. 1984. *Genética Moderna*. Ed. Omega.
4. Bender, M., J. Davidson, y M. Kastenbaum. 1967. *Chromosome Analysis. Use of Computers in Analysis of Experimental Data and the Control of Nuclear Facilities*. US Atomic Energy Commission.
5. Cook, J. M., C. W. Ian. 2002. Sex determination in Invertebrates. En *Sex ratios: concepts and research methods*, ed. Hardy, I. I.C.W. Cambridge University Press. 438 págs.
6. De Meyer T, E R. Rietzschel, M L. De Buyzere, W Van Crielinge, S Bekaert. 2008. Studying telomeres in a longitudinal population based study, *Frontiers in Bioscience* 13, 2960-2970.
7. Ferré, D. M. 2011. El conocimiento genético en la conservación de las especies de exhibición. Estudio citogenético de los primates neotropicales del zoológico de Mendoza. Tesis de grado. Facultad de Ciencias Veterinarias y Ambientales, Universidad Juan Agustín Maza, Mendoza, Argentina.
8. Ferré D, Steinberg ER, Albarracín L, Pedrosa A, Hynes V, Duarte A, Mudry MD, Gorla N. 2009. Utilización de variables citogenéticas y antropométricas para un eficiente manejo de primates neotropicales en cautiverio. *InVet*, 11, 99-103.
9. Fundia, A. F., Gorla, N. B. M., Gutierrez, M., Larripa, I. B., Mudry, M., Slavutsky, I. 1991. CITOGÉNÉTICA, En: *Manual de Técnicas*, Instituto de Investigaciones Hematológicas "Mariano R. Castex" Academia Nacional de Medicina. Capítulo VII, pp. 2-23, Editores L.J. Bergna, M.A. Lazzari, Gráfica Yanina, Buenos Aires.
10. Hoff M. 2009. Male or Female? For Honeybees, a Single Gene Makes All the Difference. *PLoS Biol* 7, 10.
11. ISCN. 2009. *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature* Shaffer L.G., Slovak ML, Campbell LJ (eds); S. Karger, Basel.
12. Klug W S, Cummings MR. Spencer CA. 2006. *Conceptos de Genética*, 6ta.edición. Prentice Hall, Inc.

13. Levan, A. K. Frega, A. Sandberg. 1964. Nomenclature of centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
14. MacGregor, H, J. Barley. 1983. *Working with Animal Chromosomes* Ed. John Wiley & Sons. Reino Unido.
15. Matsubara K , Tarui H, M Toriba M, Yamada K, Nishida-Umehara C, Agata K, Matsuda Y , 2006. Evidence for different origin of sex chromosomes in snakes, birds, and mammals and step-wise differentiation of snake sex chromosomes, *PNAS*, 103, 48, 18190-18195.
16. Ménsua JL. 2004. *Genética Problemas y ejercicios resueltos*, Ed Pearson Prentice Hall, Madrid.
17. Miko I. 2008. Sex chromosomes and sex determination, *Nature Education* 1, 1- 5.
18. Mudry MD, Rahn M, Gorostiaga M, Hick A, Merani MS, Solari AJ. 1998. Revised karyotype of *Alouatta caraya* (primates: Platyrrhini) based on synaptonemal complex and banding analyses. *Hereditas*, 128, 9-16.
19. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM). McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD) and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, MD), {date of download}. World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>
20. Rosset, S. 2007. Algo sobre poliploidía. *Biológica* 1: 4-5.
21. Steinberg ER. 2011. Determinación sexual en Primates Neotropicales: el caso de los monos aulladores. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
22. Therman, E. M. Susman. 1993. *Human Chromosomes. Structure, Behavior, and Effects.* Third Edition. Springer-Verlang Eds.
23. Tjio, J.H. y Levan, A. 1956. The chromosome number of man. *Hereditas* 42, 1-6.

2 CROMOSOMAS A PARTIR DE MATERIAL DIRECTO

Material directo y preparados cromosómicos

El análisis cromosómico se puede realizar a partir de una variedad de tejidos. Hay tres tipos de materiales que pueden ser usados. Material en división activa “in vivo” como médula ósea, bazo, epitelio intestinal, muy útil en estudios citogenéticos de mamíferos, aves y reptiles. Un segundo tipo de material es aquel tejido que tiene división relativamente infrecuente en el organismo como corazón, riñón e hígado a partir de los cuales se pueden realizar cultivos celulares. Un tercer tipo de material que normalmente no se divide “in vivo” como los linfocitos de sangre periférica de mamíferos, aves y reptiles. El cultivo más difundido en humanos, es el de linfocitos de sangre periférica de 72 horas. Este método es rápido, relativamente económico y provee un adecuado número de células en división (Watt y Stephen, 1986). Bajo circunstancias normales los linfocitos no sufren división mitótica ya que han alcanzado su diferenciación, sin embargo pueden ser estimulados a dividirse con el agregado de sustancias mitogénicas que los involucran a blastos. Además de linfocitos, es posible realizar cultivos más laboriosos, de fibroblastos, de células exfoliadas de mucosa, de células del feto presente en el líquido amniótico y otros. También se pueden efectuar preparaciones directas, sin cultivo de células, provenientes de tejidos en división activa, como médula ósea, bazo, epitelio intestinal, testículo. La calidad de estas preparaciones directas es menor que las obtenidas a partir de cultivos de células, pero tienen la ventaja de ser analizadas el mismo día de la toma de muestra y no presentan los problemas de artefactos que suelen formarse durante el cultivo de células.

En cualquier tejido que se divida activamente es posible obtener preparados cromosómicos deteniendo las células en la metafase, el estadio del ciclo celular en el que los cromosomas alcanzan su condensación máxima.

En la práctica, sin embargo, sólo se emplea un pequeño número de tejidos para los análisis cromosómicos en material directo:

En humanos: médula ósea- vellosidades coriales- espermatozoides

En otros animales: médula- intestino-bazo- testículos- córnea

En plantas: tejidos meristemáticos- anteras

La obtención de preparaciones para el análisis de cromosomas se realiza mediante diversas técnicas como el aplastado o la dispersión celular. Estas técnicas generalmente presentan las siguientes etapas:

a. Obtención del material

b. Pretratamiento: muchos tejidos requieren el uso de soluciones que permitan dispersar o separar los cromosomas. En animales se usan soluciones salinas (Cloruro de Potasio, Citrato de Sodio, Cloruro de Sodio) o agua destilada, provocando un choque hipotónico a la célula. Para estudiar las características de los cromosomas de una especie, o para comparar especies distintas, se pueden utilizar agentes antimitóticos (colchicina, colcemid, hidroxiquinoleína, etc.) que actúan como inhibidores de la formación del huso mitótico. De esta manera el número de metafases se incrementa de forma significativa

c. Fijación: tiene por finalidad preservar las estructuras celulares que nos interesan. El líquido fijador varía según la técnica a utilizar. El fijador más utilizado para técnicas con tinción estándar es el llamado 3:1 (metanol o etanol: ácido acético). Para la realización de técnicas inmunocitoquímicas en general se utilizan fijadores del tipo de los glutaraldehidos o metanoles

d. Coloración: en las técnicas estándar se usan varios colorantes tales como: orceína, hematoxilina acética, Feulgen y Giemsa. La elección del colorante depende de los fines perseguidos. En inmunocitoquímica se utilizan fluorocromos con el fin de colorear la cromatina (DAPI, Hoechst, Ioduro de propidio)

e. Montaje: esta etapa consiste en preservar el preparado colocando un cubreobjeto y sellándolo con parafina líquida, esmalte de uñas, bálsamo de Canadá o resinas sintéticas.

Estudio de los cromosomas en material directo

Los aspectos básicos del análisis, la interpretación y los reportes del cariotipo son quizás algunos de los aspectos menos desarrollados en los textos de citogenética y las guías de instrucciones más detalladas son las que se obtienen de los trabajos en citogenética clínica humana que sirven de referencia para el resto de las especies de animales. Esta es la razón por la que en general, las actividades prácticas que se plantean refieren a cariotipos humanos.

El análisis de cada metafase se realiza sistemáticamente comenzando con el recuento de los cromosomas y la comparación de cada uno con su homólogo. Si se trabaja con coloración convencional de Giemsa, las mediciones de cada brazo cromosómico son una herramienta importante para asignar objetivamente la ubicación de cada cromosoma en el cariotipo y también para la elaboración de idiogramas.

El análisis del cariotipo es fundamental para identificar y comparar especies, para estudiar variaciones dentro de una misma especie, asegurar el patrón de determinación sexual y/o para correlacionar determinadas patologías con alteraciones del cariotipo normal.

Mediciones

Las mediciones se realizan con regla milimétrica sobre cariotipos armados. Bender *et al.* (1967) han establecido que midiendo un mínimo de tres metafases se cubren las variabilidades intercelulares sin pérdida apreciable de la información.

Se establecen como límites de cada brazo el centro de la región centromérica y el final de cada cromátida. Las mediciones para cada cromosoma consisten entonces en una serie de cuatro longitudes, dos para el brazo largo y dos para el brazo corto.

La descripción de la morfología de los cromosomas a este nivel de análisis (coloración convencional de Giemsa) puede realizarse mediante el cálculo de:

La relación entre los brazos cromosómicos: **$r-r$: longitud del brazo largo (q)/ longitud del brazo corto (p)** - y el índice centromérico: **$i-i$: $100p/(p+q)$** -.

La nomenclatura que se presenta a continuación es una modificación de Levan *et al.*, 1964 (Aiassa *et al.*, 1998; Aiassa, 2004):

Morfología metacéntrica (M) para valores de r entre 1-1,50 e i entre 50-40.

Morfología submetacéntrica (SM) para valores de r entre 1,51-7 e i entre 39,90-12,50.

Morfología acrocéntrica (A) para valores de: $r > 7,10$ e $i < 12,49$.

Morfología telocéntrica (T) para valores de: $r = \infty$ e $i = 0$.

Idiograma

El diagrama de un cariotipo, basado en las mediciones cromosómicas de varias metafases, se denomina "idiograma" (Therman y Susman, 1993).

Para la producción de un idiograma es necesario dibujar o fotografiar los cromosomas para poder medirlos y determinar los índices centroméricos, las relaciones entre brazos y las longitudes relativas.

En la construcción del idiograma cada cromosoma es representado como una barra vertical gruesa donde se ubican la posición del centrómero y cualquier otra característica que se observe claramente. Las barras verticales también se presentan en orden de longitud descendente (MacGregor y Barley, 1983).

Índice mitótico (IM)

Se denomina índice mitótico, en una población de células, al coeficiente entre el número de células que experimentan mitosis (multiplicación de células) y el número total de células contadas.

Figuras meióticas

Las preparaciones de cromosomas meióticos son realizadas en animales a partir de células que ocupan los túbulos testiculares. Contienen una mezcla de células intersticiales (células de Sertoli y células de Leydig) y las células del epitelio germinal (células espermatogoniales premeióticas, espermátocitos primarios y secundarios, espermátides y espermatozoides).

Los fenómenos esenciales de la meiosis son tres (sinapsis, recombinación y disyunción o segregación) y todos ocurren en la primera división, por lo cual ésta es la más importante. La segunda división meiótica es similar a una mitosis común excepto que no está precedida de una interfase y sólo contiene el conjunto haploide de cromosomas.

En la profase de la primera división meiótica se distinguen 5 estadios: leptotene, cigotene, paquitene, diplotene y diacinesis. Estos estadios han sido bien caracterizados a través de microscopia óptica y electrónica. Los cromosomas homólogos se encuentran apareados (sinapsis) durante el paquitene. Los fenómenos de recombinación que se visualizan con el microscopio óptico ocurren durante el diplotene y en los estadios posteriores hasta la metafase, en forma de “quiasmas” (cruz). Cada una de estos pares de cromosomas homólogos, a partir del diplotene, se denomina bivalente. Los quiasmas visibles al principio del diplotene cambian de apariencia durante el avance de este período y hasta la metafase.

El diplotene es raramente observado en las preparaciones de testículo. La mayoría de estas preparaciones permiten observar los cromosomas en diacinesis de la primera división. Los bivalentes han atravesado una contracción continua desde el paquitene al diplotene. La morfología de los bivalentes autosómicos está dictaminada por el número y localización de los quiasmas. Todos los brazos de cromosomas autosómicos con la excepción de los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos tienen regularmente al menos un quiasma. Los cromosomas más pequeños van a formar una cruz o bastón dependiendo de si la localización del quiasma es en la mitad o en el extremo final del cromosoma. Los bivalentes con dos quiasmas se observan como anillos. Los que presentan tres quiasmas dan lugar a figuras en forma de ocho y números mayores de quiasmas dan lugar a configuraciones más complejas (Hulten *et al.*, 1986).

En 1937, Mather demostró que la frecuencia de quiasmas por bivalente está directamente relacionada con la longitud cromosómica (Clark y Wall, 1996). Los cromosomas grandes pueden tener varios quiasmas y todos los bivalentes deben tener al menos un quiasma para asegurar una segregación apropiada en la anafase de la primera división. Por lo tanto, la localización de los quiasmas y el número de quiasmas a lo largo de un bivalente no es totalmente al azar, existe preferencia por ciertas zonas de acuerdo con la especie que se considere (Therman y Susman, 1993; Solari, 2000). Un cambio en el número y posición de los quiasmas puede resultar en un cambio en el genotipo, por lo tanto es un aspecto de particular relevancia en la diferenciación de razas cromosómicas y puede potencialmente jugar un rol importante en los procesos de especiación (Lamborot, 1993).

Las divisiones celulares mitóticas que se observan en suspensiones de testículo son de espermatogonias. Las metafases premeióticas de espermatogonias son normalmente menos frecuentes que los estadios meióticos, diacinesis- metafases I y II.

ACTIVIDADES DE COMPRENSIÓN

Para construir comprensión sobre los contenidos desarrollados en este capítulo se presentan actividades que permiten:

- Aplicar técnicas para elaborar, observar y analizar preparaciones cromosómicas de material directo (tejidos vegetal y animal)
- Calcular el índice mitótico (IM) e índice de fases (IF) en preparados cromosómicos
- Efectuar mediciones cromosómicas y armar un cariotipo
- Interpretar cariotipos y figuras meióticas
- Recabar información y elaborar producciones escritas

1. Obtención de preparados

a) Tejido vegetal: *Allium cepa*

- Llenar un vaso de precipitados con agua y colocar un bulbo de cebolla (*Allium cepa*) sujeto con dos o tres palillos de manera que la parte inferior quede inmersa en el agua. Al cabo de 3 a 4 días aparecerán numerosas raicillas en crecimiento de unos 3 o 4 cm. de longitud.

- Cortar con las tijeras unos 2-3 mm del extremo de las raicillas y depositarlo en un vidrio de reloj en el que se han vertido 2-3 ml de orceína A.
- Calentar suavemente el vidrio de reloj a la llama del mechero durante unos 8 minutos, evitando la ebullición, hasta la emisión de vapores tenues.
- Con pinzas tomar uno de los ápices o extremos de las raicillas y colocarla sobre un portaobjetos, añadir una gota de orceína B y dejar actuar durante 1 minuto.
- Colocar el cubreobjetos con mucho cuidado sobre la raíz. Con el mango de una aguja enmangada dar unos golpecitos sobre el cubre sin romperlo de modo que la raíz quede extendida.
- Sobre la preparación colocar unas tiras de papel de filtro, 5 o 6. Poner el dedo pulgar sobre el papel de filtro en la zona del cubreobjetos y hacer una suave presión, evitando que el cubre resbale. Si la preparación está bien asentada no hay peligro de rotura por mucha presión que se realice.

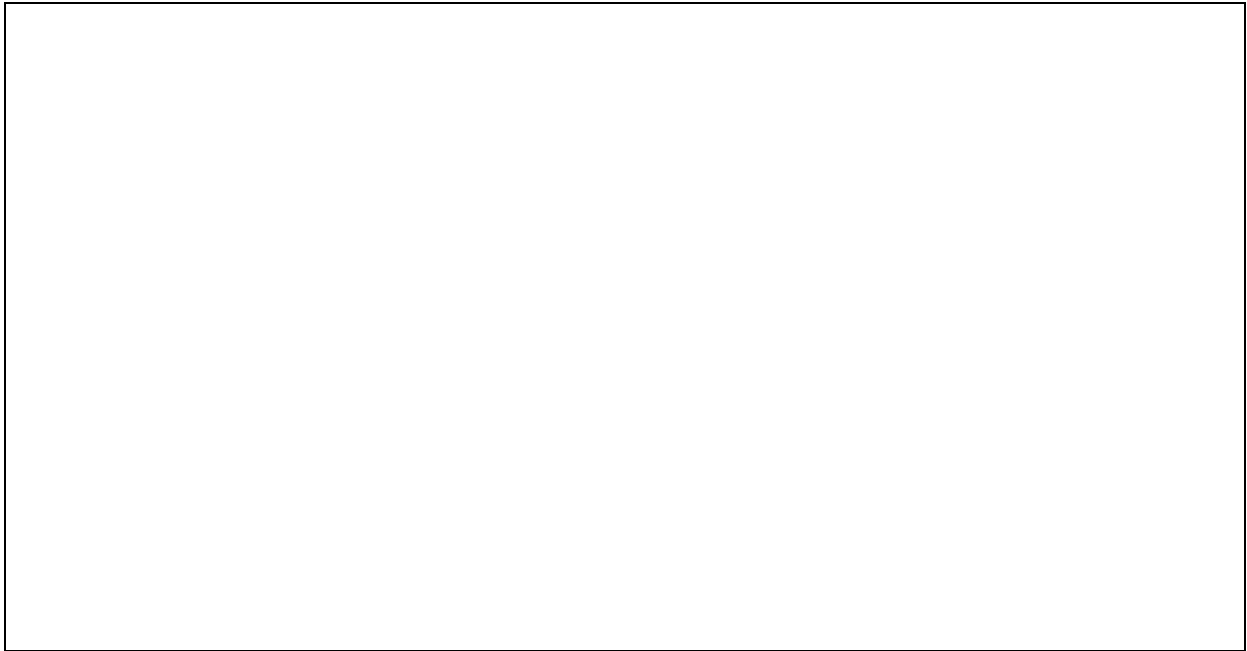
b) Tejido animal: *Orthoptera*

- Tomar un ejemplar de langosta. Cortar en forma transversal la parte inferior del abdomen con una tijera de disección. Después cortar perpendicularmente al primer corte hasta encontrar los testículos. Extraerlos y colocarlos en alcohol absoluto-ácido acético 3:1 ó 2:1 durante 0,5-2 horas como mínimo. El material fijado puede conservarse en un refrigerador.
- Pasar los testículos fijados a alcohol 70%. Con cada testículo se pueden obtener unos 10 preparados
- Colocar en un portaobjetos una pequeña porción de tejido y, sobre éste, una gota de hematoxilina acética o propiónica 2% en ácido acético o propiónico 45% (al preparar esta solución hay que agregar acetato férrico hasta obtener color negro). Disgregar el material con una lanceta.
- Colocar un cubreobjetos (eventualmente untado con albúmina de Mayer). Flamear suave e intermitentemente hasta el desprendimiento de vapor. De esta forma se elimina la humedad del medio de montaje, pero hay que tener cuidado de no calentar demasiado.
- Aplastar.
- Sellar el preparado con cera, parafina o esmalte para uñas. Después de dos horas puede hacerse permanente.

2. Observación al microscopio, cálculo de IM e IF

a) *Allium cepa*

- Recorre en 40X el extendido cromosómico e identifica las metafases
- Dibuja una metafase en 100X ocupando todo el espacio siguiente



- Calcula el índice mitótico (**IM**) del tejido de *Allium cepa* a partir de la observación de 50 células barriendo el campo y de acuerdo con la fórmula:

$$\text{IM} = \frac{\text{Número de células en división}}{\text{Número total de células observadas}} \times 100$$

- Calcula la duración relativa de cada etapa de la mitosis (**índice de fases**). Usa la fórmula:

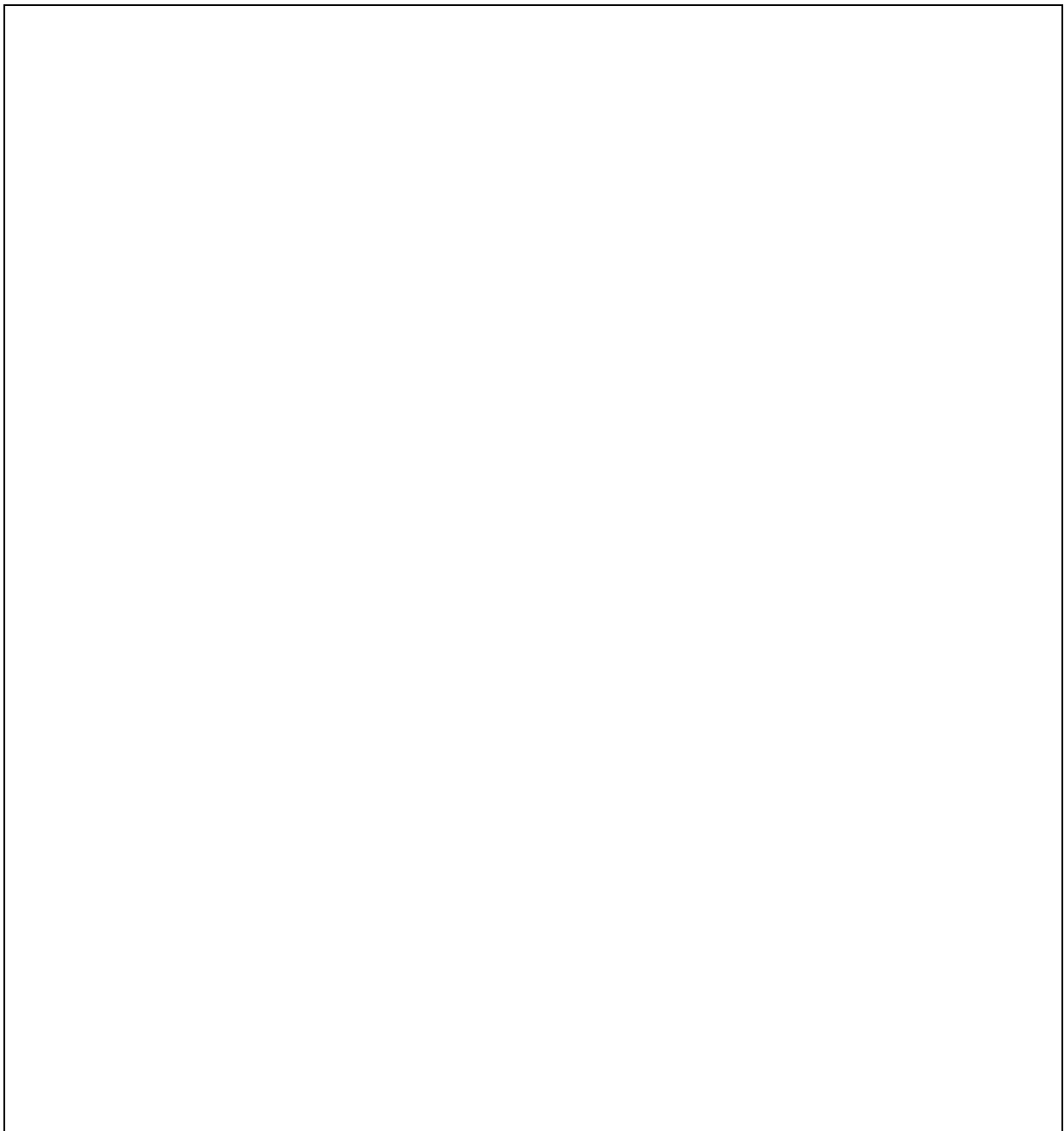
$$\text{IF} = \frac{\text{Número de células en la fase}}{\text{Número total de células en mitosis}} \times 100$$

Debes observar 50 células de *Allium cepa* en división y anotar la etapa en que se encuentran. Luego calcular el IF de cada una de las etapas.

- ¿Cuál es la interpretación de los valores calculados de IM e IF? Escribe un texto explicativo.

b) Orthoptera

- Recorre en 40X el extendido cromosómico e identifica las metafases- distingue entre mitosis y meiosis-
- Dibuja una mitosis en 100X ocupando todo el espacio siguiente



3. Observación al microscopio de figuras meióticas

a) Dibuja una meiosis en 100X ocupando todo el espacio siguiente



b) Análisis de esquemas y fotografías de meiosis

- Observa atentamente las fotos (Fig. 1) –en la página siguiente– de las diferentes fases de la meiosis en machos de dos especies de *Schistocerca* (langosta).

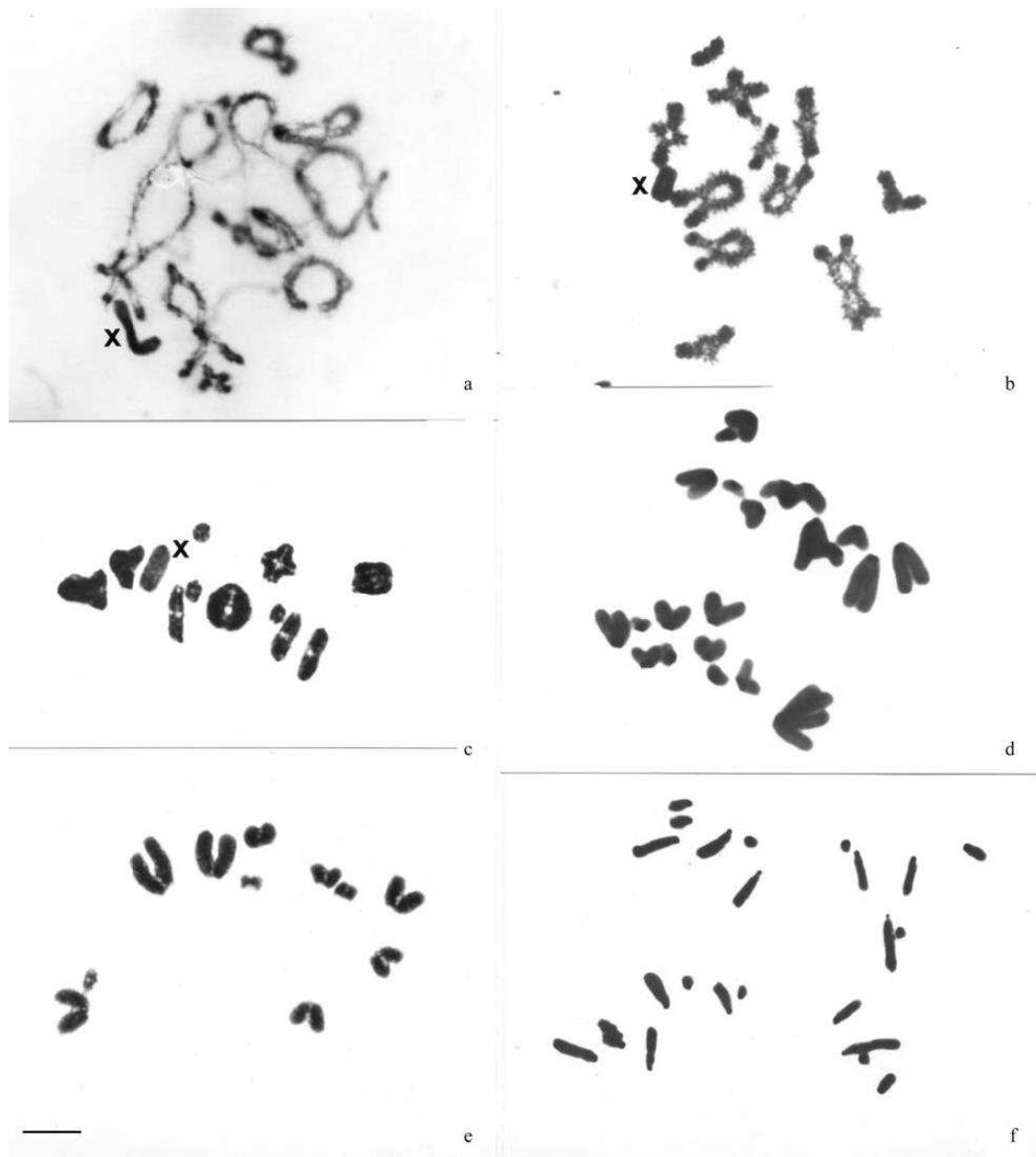


Fig. 1. Meiosis de *Schistocerca flavofasciata* (a,d) and *Schistocerca pallens* (b,c,e,f) con coloración de orceína: (a) paquitene, (b) diplotene, (c) metafase I, (d) anafase I, (e) metafase II, (f) anafase II. Bar = 10 μm
FOTOS TOMADAS DE de Souza y de Melo (2007).

- Indica para la foto que corresponda:

- ¿Cuántas cromátidas tiene cada una de las estructuras alargadas que observa en la foto a?
- ¿Cuántos quiasmas son visibles en cada estructura cromosómica de las que observa en diplotene?
- ¿Cuál es el número diploide de la especie *Schistocerca pallens*?

- Observa la Fig. 2 que muestra mitosis y meiosis de dos especies vegetales pertenecientes a la familia Liliaceae.

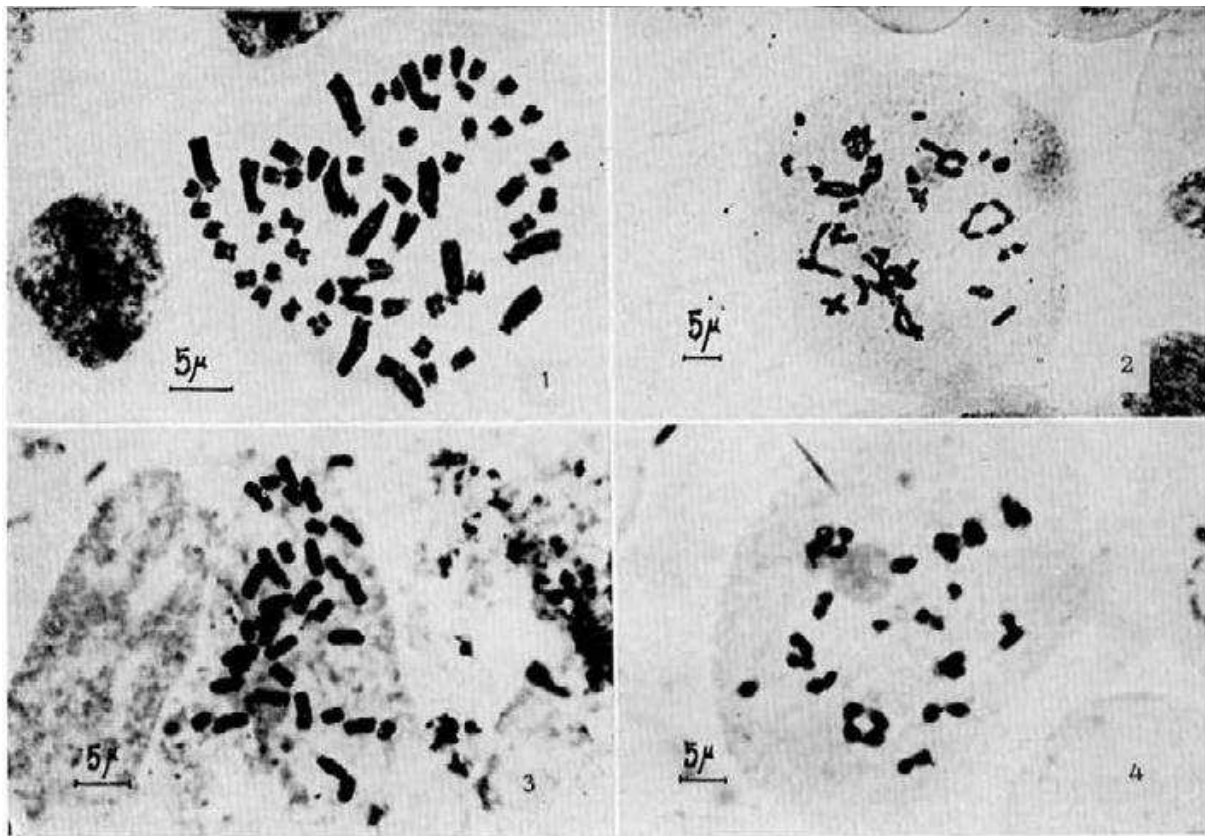


Fig. 2. Mitosis y meiosis de *Urginia marítima* (1 y 2) *Muscari racemosum* (3 y 4)
FOTOS TOMADAS DE Sañudo y Ruiz Rejón (1975)

- Indica para la foto que corresponda:
 - a) ¿Cuántos quiasmas son visibles en cada estructura cromosómica de las que observa en las fotos 2 y 4?
 - b) ¿Cuál es el número diploide de cada especie?
- Esquematiza los cromosomas de una hembra de *Muntiacus muntaj* ($2n=6$; morfología cromosómica que se observa: un par metacéntrico grande, un par submetacéntrico mediano y otro par submetacéntrico de brazos p muy pequeños), en:
 - a) Una metafase I y una anafase I.
 - b) Una metafase II y una anafase II
 - c) Un óvulo.
 - d) Indica en cada una de las figuras el nivel de ploidía ($2n$ o n).
 - e) Indica el valor C de cada una de las figuras.

- La siguiente fotografía muestra los complejos sinaptonémicos de una célula meiótica en macho de *Allouatta caraya*. Obsérvala y responde los interrogantes que se presentan a continuación de la misma.

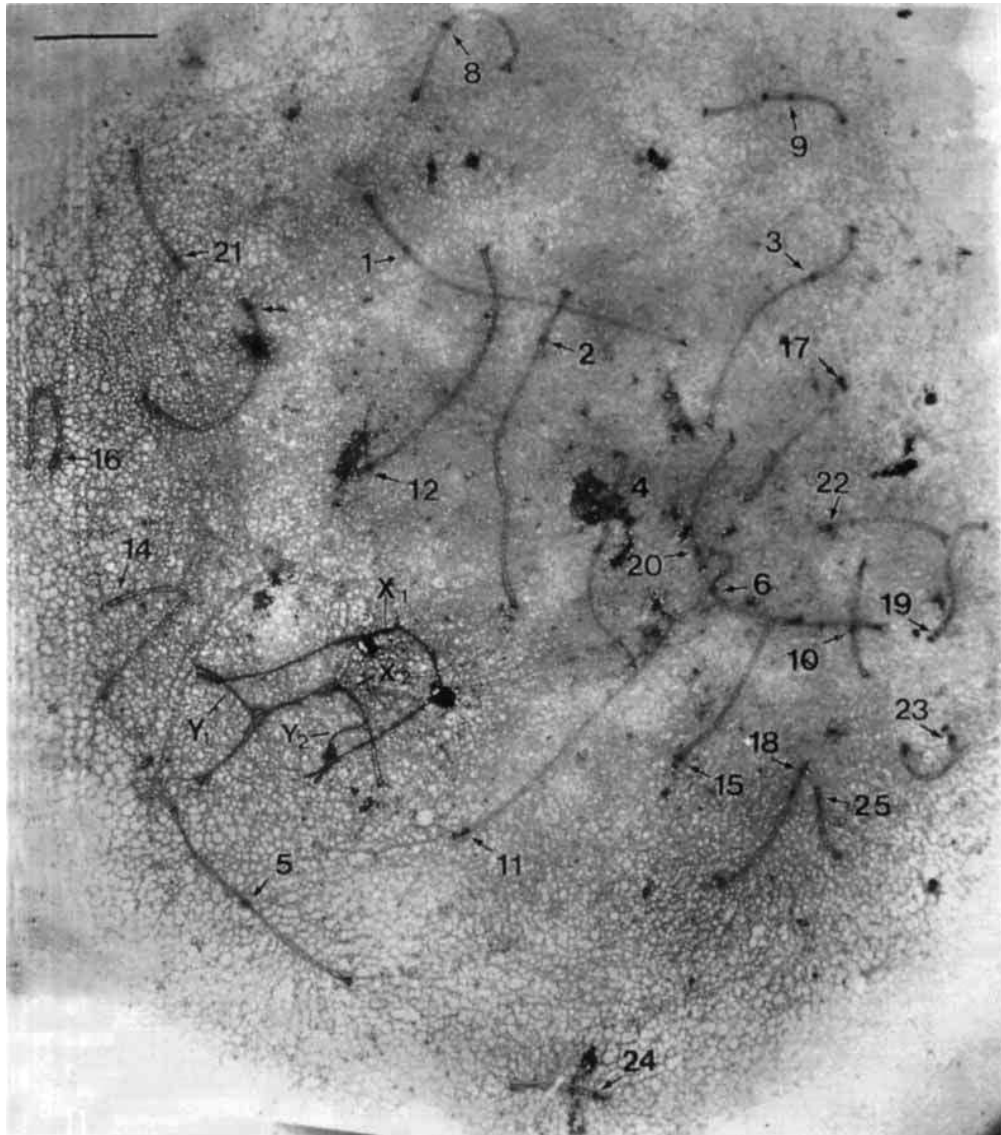


Fig. 3. Meiosis de *Allouatta caraya*
3.500 X. Barra= 5 μ
 FOTO TOMADA de Mudry *et al.*, (2008)

- Indica con una flecha los cromosomas sexuales apareados entre sí
- ¿Cuál es la fase de la meiosis en que ha tomado esta fotografía?
- ¿Cuál es la coloración utilizada que permite revelar el complejo sinaptonémico?
- ¿Esta fotografía se tomó desde un microscopio óptico o electrónico? Fundamenta tu respuesta.

- Busca bibliografía sobre Hollidays Junctions. Las Hollidays Junctions ¿son cruciales para la recombinación intracromosómica? ¿Por qué?

c) Armado de cariotipos a partir de mediciones cromosómicas

Utiliza nuevamente la fotomicrografía de la metafase de linfocitos humanos de la página 23 para realizar mediciones cromosómicas

Procede de la siguiente manera:

- Recorta los cromosomas
- Realiza las mediciones cromosómicas y obtiene r e i – ubícalos en el esquema que se presenta al final de las actividades—.
- Asígnale la morfología cromosómica a partir de las mediciones y escríbela arriba de cada par cromosómico
- Dibuja un idiograma del cariotipo armado.
- Compara el cariotipo armado con el armado en la página 22 y escribe una conclusión

1	2	3				4	5
6-12							
13	14	15	16	17	18	19	20
22	23			X	Y		

Este procedimiento para el armado del cariotipo de una célula, en la actualidad y en la mayoría de los laboratorios se realiza con programas de computación con los que se puede recortar y ordenar cromosomas en forma digital.

Bibliografía citada y de consulta

1. Aiassa, D., R Martori y N Gorla. 2006. Análisis de bandas c y de figuras meióticas en lagartos del género *Liolaemus*, Journal of Basic and Applied Genetics, 17: 2, 3-9, 2006.
2. Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y J. D. Watson. 1994. Molecular Biology of the Cell (3ed) Garland Publishers London.
3. Clark, M., W. Wall. 1996. Chromosomes the Complex Code. Chapman & May Eds. Londres.
4. De Robertis, E., J. Hib y R. Ponzio. 2001. Biología Celular y Molecular. Editorial El Ateneo
5. de Souza, M.J. y N. F. de Melo. 2007. Chromosome study in *Schistocerca* (Orthoptera-Acrididae- Cyrtacanthacridinae): Karyotypes and distribution patterns of constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions (NORs). Genetics and Molecular Biology 30(1): 54-59.
6. Heslop-Harrison, J. S. y R. B. Flavel. 1993. The Chromosome. Bios Scientific Publishers. London.
7. Hulten M., N. Saadallah, B. Wallace y M. Creasy. 1986. Meiotic studies in man. In Rooney, D. E. y B. H. Czepulkowski Eds. Human Cytogenetics, a practical approach Chap. 6. Oxford IRL Press.
8. Lacadena, J. R .1996. Citogenética. Ed. Complutense SA. Madrid.
9. Lamborot, M. 1993. Chromosomal evolution and speciation in some chilean lizards. ASIBE: 133-151.
10. Lodish, H., A. Berk, L. S. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore y J. Darnell. 2000. Molecular Cell Biology (4 ed) W. H. Freeman and Company New York.
11. Macgregor, H. C. 1993. An introduction to Animal Cytogenetics. Chapman and Hall London
12. Mudry M. D, I. M. Rahn y A. J. Solari. 2001. Meiosis and Chromosome Painting of Sex Chromosome Systems in Ceboidea. American Journal of Primatology 54: 65-78.
13. Pimentel, E., A. Ortiz Muñiz, y M. Breña Valle (coordinadores). 2006. Tópicos de Genética. Publicaciones UAEM.
14. Poggio L y C Naranjo. 2004. Citogenética. En: Biotecnología y mejoramiento vegetal. Consejo argentino para la información y el desarrollo de la biotecnología. Parte II herramientas básicas; INTA, 69-79.
15. Puertas, M. J. 1999. Genética: Fundamentos y Perpectivas. McGraw-Hill. Interamerica

16. Rahn M. I., M. Mudry, M. S. Merani y A. J. Solari. 1996. Meiotic behavior of the $X_1X_2Y_1Y_2$ quadrivalent of the primate *Alouatta caraya*. Chromosome Research 4: 350-356.
17. Sañudo, A. y M. Ruiz Rejón. 1975. Sobre la naturaleza autoploide de algunas plantas silvestres. Anal. Inst. Bot. Cavanilles 32 (2): 633-648.
18. Solari, A. 2000. Genética Humana. Fundamentos y aplicaciones en medicina. 2da. edición. Editorial Médica Panamericana.
19. Therman, E. y M. Susman. 1993. Human Chromosomes. Structure, Behavior, and Effects. Third Edition. Springer-Verlang Eds.
20. Video: <http://www.youtube.com/watch?v=7NqOKCFQEvU>
21. Yilun Liu y Stephen C. West. 2004. Happy Hollidays: 40th anniversary of the joliday junction. *Nature reviews* 5:937-946.

3 CROMOSOMAS A PARTIR DE CULTIVOS CELULARES

Cultivo celular

El cultivo de células y tejidos comenzó en 1907 cuando el investigador Ross Harrison publicó el trabajo “Observaciones de la fibra nerviosa viva en desarrollo”. En el mismo se describía una nueva técnica, el cultivo de tejidos para demostrar experimentalmente cómo se originan las fibras nerviosas. Las experiencias originales con fibras nerviosas se basaron en el cultivo de pequeños fragmentos de tejidos llamados “explanaos”. Utilizando técnicas asépticas, Harrison tomó fragmentos del tubo neural de un embrión de rana, y lo depositó en una gota de líquido linfático fresco (“medio de cultivo”) de rana colocado sobre un cubreobjetos estéril. Una vez que la linfa coaguló, invirtió el cubre objeto sobre un portaobjeto de vidrio que poseía una depresión, creando así un cultivo en gota suspendida, técnica utilizada por los microbiólogos para estudiar las bacterias. Luego de numerosas y periódicas observaciones al microscopio pudo describir el desarrollo de fibras nerviosas in Vitro a partir de las neuronas presentes en el tejido extirpado. Así además de argumentar el proceso ocurrido, resolvió los problemas del cultivo celular, como el medio, la observación y la contaminación.

Se podría hablar de tres tipos de cultivos:

- * Cultivos primarios. Son cultivos preparados directamente de fragmentos de tejidos o de órganos que se adhieren a una superficie y en la que proliferan las células.
- * Cultivos secundarios. Supone una disgregación celular ya sea por medios enzimáticos o mecánicos. La suspensión celular se puede cultivar como una monocapa adherente o en suspensión en el medio de cultivo. Este tipo de cultivo permite su propagación, aumentando notablemente la masa celular del cultivo a lo largo de las generaciones. Como característica negativa se pierde la heterogeneidad celular de partida, la población se hace uniforme y homogénea al predominar en el cultivo aquellos tipos celulares que tienen superior tasa de crecimiento.
- * Cultivo de líneas celulares. Implica forzar a dividirse indefinidamente determinadas células. Entre los cultivos de células más promisorios de interés en medicina humana se encuentran las líneas de células madre embrionarias humanas.

En la actualidad los cultivos celulares son los más empleados fundamentalmente por la posibilidad de propagación, así como por las ventajas en la cuantificación, caracterización y repetibilidad de las muestras.

Las ventajas de los cultivos celulares son:

- * Permiten un control preciso y fino del medio ambiente.
- * Caracterización y homogeneidad de la muestra.
- * Economía en el uso de reactivos o drogas ya que se utilizan volúmenes pequeños
- * Motivaciones éticas.

En cuanto a las desventajas del cultivo celular:

- * Técnica sensible. Esto requiere el mantenimiento de las condiciones de asepsia en todo momento, lo cual es limitante a nivel tanto del instrumental requerido como del personal cualificado para su manipulación.
- * Cantidad y costo. El costo de producción de 1 g de tejido en cultivo es más de 10 veces superior al obtenido en el animal. Asimismo existe una limitación de producción, que es del orden de 10 g de células en un laboratorio normal, y que para ser superior a 100 g requiere instalaciones de tipo industrial.
- * Inestabilidad.
- * Validez del modelo 'in vitro'.

En 1960 Moorhead describió que los linfocitos se diferenciaban de la sangre periférica pero que podían entrar en mitosis en condiciones in Vitro. Con este descubrimiento se pudo realizar el cariotipo a partir de sangre periférica, lo que tiene varias ventajas: es un tejido fácil de obtener, permite la obtención de gran número de metafases.

Normalmente, los linfocitos son células inactivas, por lo tanto tienen que ser estimuladas para dividirse. El agente estimulante más comúnmente utilizados es la fitohemaglutinina (PHA), que es una lecitina que se une a la membrana plasmática de los linfocitos y hace que se conviertan en linfoblastos, es decir se desdiferencian en el lapso de 24h.

Los linfocitos de sangre periférica, como sistema celular de ensayo, presentan una serie de características que los hacen especialmente apropiados para su utilización en estas técnicas:

- a. Disponibilidad fácil y en gran número (1 ml de sangre contiene de 1 a 3 millones de linfocitos).
- b. Crecimiento en cultivo fácil tras ser estimulados con un mitógeno (normalmente fitohemaglutinina). Los linfocitos T son los primeros en ser estimulados a entrar en mitosis.
- c. Poseen una amplia distribución en el organismo. Los linfocitos T no están permanentemente circulando, sino que hay una recirculación entre la sangre y los tejidos extravasculares. Esta característica los hace ser apropiados para reflejar los efectos de una exposición en cualquier área del cuerpo.
- d. Los linfocitos circulantes, normalmente, se encuentran en fase de no división (G0). Al cultivarlos en presencia del mitógeno se estimula la división mitótica, lo que permite el estudio de los cromosomas en metafase.
- e. Los linfocitos tienen una vida media de unos cuatro años, aunque se pueden encontrar linfocitos que pueden sobrevivir durante varias décadas. Esta propiedad es interesante, junto con el hecho de hallarse en fase de no división en el torrente circulatorio, porque permite detectar efectos clastogénicos transcurrido algún tiempo desde la exposición, ya que las lesiones en el ADN persisten.

Otros materiales para la obtención de cromosomas en cultivo (método indirecto) también pueden ser fibroblastos, que pueden ser extraídos a partir de tejido muscular o epitelial. Después de una autopsia los tejidos de los pulmones o los riñones también pueden utilizarse para cultivo de células primarias.

En humanos son utilizados piel, líquido amniótico (amniocitos), células de testículo, tumores sólidos (linfoma) y material de concepción.

El siguiente es un **procedimiento convencional utilizado para obtener cromosomas a partir de cultivo primario en suspensión de sangre periférica:**

- La sangre que se utiliza debe estar en condiciones de máxima esterilidad con heparina (anticoagulante), que puede ser almacenada a temperatura ambiente ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$) hasta cinco días antes del inicio el cultivo.
- 0,3-0,5 ml de sangre en total de 10 ml de medio de cultivo (RPMI), con suero fetal bovino y PHA, se cultiva durante 72 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Transcurridas las $72\text{hs} \pm 2\text{hs}$ se añade de Colcemid que inhibe las anafases por desintegración del huso mitótico, y se centrifuga
- Se elimina el sobrenadante y las células son tratadas en una solución salina de ClK 0,075 M por 20-30 minutos
- Se centrifuga, se descarta el sobrenadante y las células son fijadas con metanol- ácido acético (3:1) que se añade rápidamente mientras se agita vigorosamente.
- Se centrifuga y se lavan en fijador nuevo tres veces, cada vez manteniendo las células en suspensión En este último paso las células pueden ser almacenados durante años a menos $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ antes de realizar los extendidos celulares.
- La suspensión de células es goteada en portaobjetos y se dejada a temperatura ambiente para el secado. Finalmente se colorean con Giemsa u otro colorante.
- Se observan al microscopio y se fotografían para armar los cariotipos.

Contenedores y composición de los medios más utilizados para cultivos celulares

A continuación se muestran en las tablas los tipos de contenedores, sus características y la composición de los medios de cultivo más utilizados para cultivos celulares.

Tipo de contenedores para cultivo de células y sus capacidades

Contenedor	Máx Vol (ml)	Máx células (suspensión)	Máx células (adhesión)
Frasco T	150	1.5×10^8	$\sim 10^7$
Frasco triple	150	1.5×10^8	3×10^7
Biorreactor	8000	-----	1.5×10^{10}
Botellas rodantes	1000	1×10^9	1×10^8
Fascos para agitación (Erlenmeyer)	1000	1×10^9	-----
Fascos con paletas	1000	1×10^9	-----

Composición de medios de cultivo para células de mamífero

Aminoácidos	Vitaminas	Sales	Otros compuestos*	Proteínas requeridas en los medios definidos libres de suero
Arginina	Biotina	NaCl	Glucosa	Insulina
Cisteína	Colina	KCl	Penicilina	Transferrina
Glutamina	Folato	NaH_2PO_4	Estreptomicina	Factores de crecimiento específicos
Histidina	Nicotinamida	NaHCO_3	Anfotericina	
Isoleucina	Pantotenato	CaCl_2	Rojo fenol	
Leucina	Piridoxal	MgCl_2	Suero fetal bovino	
Lisina	Tiamina			
Metionina	Riboflavina			
Fenilalanina				
Treonina				
Triptofano				
Tirosina				
Valina				

TABLAS TOMADAS de
<http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20I%20Euge.pdf>

Sitios frágiles y cromosomas prometafásicos

Los cultivos de linfocitos de sangre periférica de individuos donde se sospecha la presencia de síndromes que responden a sitios frágiles en los cromosomas tienen algunas variaciones en relación a los cultivos estándares. Los sitios frágiles son lugares en el cromosoma proclives a romperse. Casi todos los sitios frágiles se expresan como una respuesta a condiciones externas de cultivo, medios pobres en ácido fólico o con inhibidores de la timidil sintetasa.

Para el diagnóstico de síndromes de inestabilidad cromosómicas, se realizan estudios de fragilidad cromosómica inducidas por agentes clastógenos como el diepoxibutano (DEB), cafeína entre otros, que generan enlaces cruzados en las cadenas de ADN. Para realizar este estudio, los linfocitos de la sangre se ponen en cultivo en presencia del clastógeno, exponiéndose posteriormente a colchicina, siguiendo los métodos citogenéticos convencionales. En estos cultivos se tiene en cuenta el número, tipo de rupturas cromosómicas detectadas en cada célula y la localización de estas, efectuándose el cálculo del porcentaje de células con rupturas, el número medio de ruptura por célula y presencia de figuras radiales, lo que permite confirmar el diagnóstico y detectar mosaicismos, es decir, la presencia de 2 poblaciones celulares en los cultivos tratados con DEB, una sin roturas cromosómicas y otra con muchas roturas por célula.

Algunas alteraciones que no son detectables por el estudio de cromosomas en metafases pueden observarse en cromosomas prometafásicos. En estos casos se agrega al cultivo diferentes sustancias como ametofterina, timidina, bromodesoxiuridina (BrdU).

ACTIVIDADES DE COMPRENSIÓN

Para construir comprensión sobre los contenidos desarrollados en este capítulo se presentan actividades que permiten:

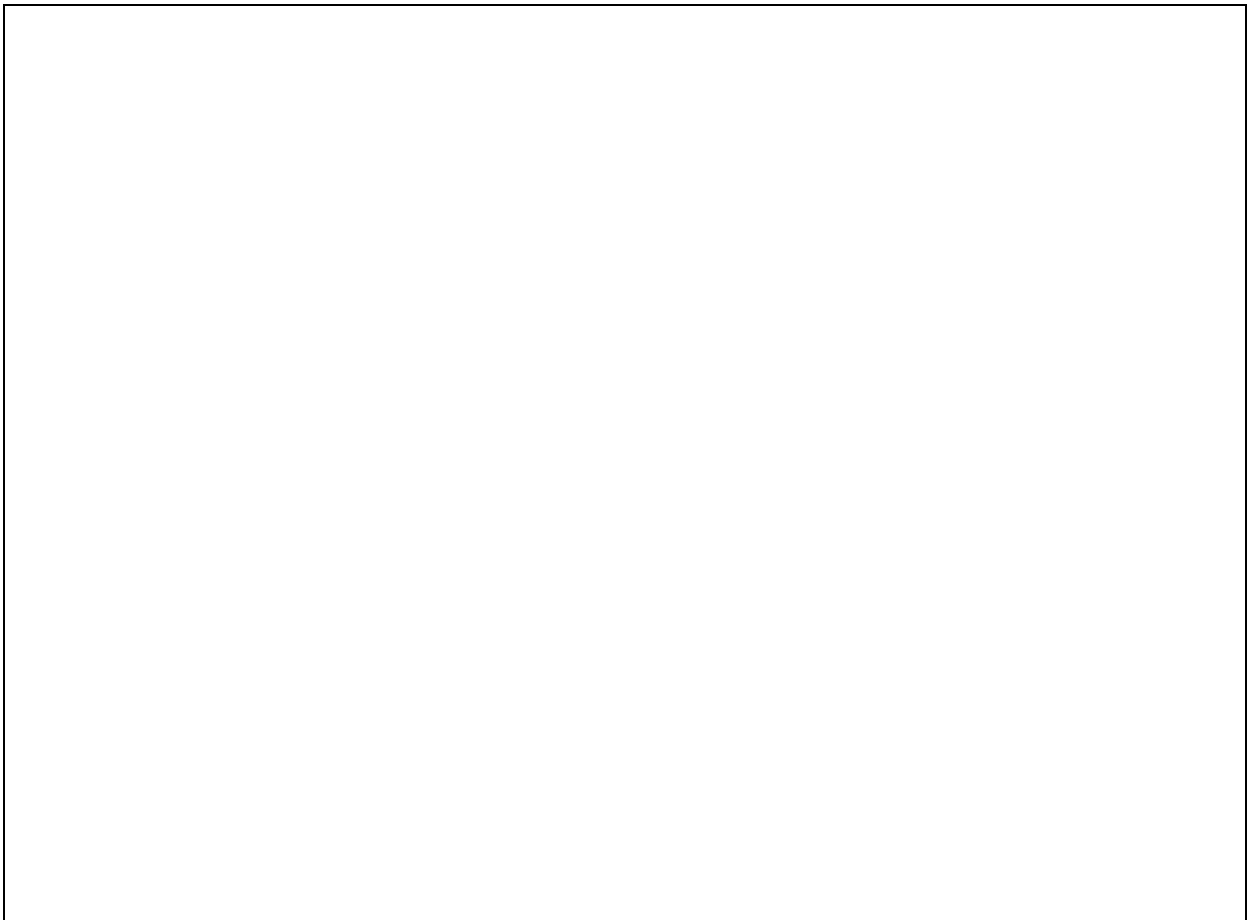
- Aplicar técnicas citogenéticas para realizar un cultivo de sangre periférica humana y obtener preparados cromosómicos
- Fundamentar e interpretar el protocolo de trabajo utilizado en el cultivo celular
- Analizar preparados cromosómicos y reconocer las diferentes morfologías cromosómicas
- Calcular el IM

1. Cultivo de linfocitos

- Preparar el medio de cultivo y sembrar la sangre; levantar el cultivo, extender, colorear con Giemsa y observar al microscopio, según el protocolo que figura al comienzo de este capítulo.
- Elabora un texto explicativo con los fundamentos de cada paso del procedimiento aplicado

2. Observación al microscopio

- a) Observar al microscopio óptico a un aumento de 10X para localizar las zonas que contienen células en mitosis. Cuantificar el número de células en división (IM).
- b) Recorre en 40X el extendido cromosómico
- c) Analiza en 100X una metafase al microscopio
- d) Dibuja lo observado ocupando todo el espacio siguiente



e) Interpretación

- Si se agrega en un cultivo celular suero anti-laminina, ¿qué ocurriría?
 - a) las células no se dividen
 - b) se aumenta el IM
 - c) las células luego de la mitosis no pueden organizar su envoltura nuclear
 - d) los complejos laminina/antilamina se acumulan dentro del núcleo
 - e) la envoltura nuclear formada resulta frágil e inestable

- ¿Cuáles son los fundamentos del cultivo de células con medios deficientes en ácido fólico?

- ¿Cuál es la función de la enzima timidil sintetasa y cuál el fundamento del agregado de BrdU y 5-FdU (FUdR) en cultivos celulares?

Bibliografía citada y de consulta

1. Fundia, A., N. Gorla, M. Gutierrez, I. Larripa, M. Mudry, I. Slavutsky, I. 1991. Citogenética, En: Manual de Técnicas, Instituto de Investigaciones Hematológicas "Mariano R. Castex" Academia Nacional de Medicina. Capítulo VII, pp. 2-23, Editores L.J. Bergna, M.A. Lazzari, Gráfica Yanina, Buenos Aires.
2. Fusenig, N .E. 1986. Mammalian epidermal cells in culture. En Biology of the ingument. Edit. J. Bereiter.hahn, A.G. Matolsky y K.S. Richards, Springer-Verlag, pp- 409-442.
3. Holbrock, K. A. y H. Hennings. 1983. Phenotypic expression of epidermal cells 'in vitro: a review. J. Invest. Dermatol. 81: 11s-24s.
4. Moorhead R., P Howell, W Mellman, W Batteps y D Hundgerford. 1960. Chromosomes preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. Experim Cell Res 2, 613-616.

4 METODOS PARA EL ESTUDIO DE LOS CROMOSOMAS.

BANDAS Q, G, C, NOR, R.

Material de estudio y métodos utilizados en Citogenética

Las primeras técnicas para estudiar los cromosomas producían una coloración uniforme en los mismos. Los procedimientos de coloración con Giemsa proporcionan una apariencia uniforme de los cromosomas y se conocen como coloración convencional. Desafortunadamente con esta técnica sólo se pueden identificar inequívocamente pocos cromosomas de un tamaño o de una forma distintiva y si el cromosoma identificado es metacéntrico no es posible distinguir entre los brazos p y q. El colorante Giemsa es el más utilizado luego de una fijación adecuada, para colorear los cromosomas en coloración convencional. Es un colorante tipo Romanowsky que contiene Azur B y Eosina que se unen al ADN.

Los cromosomas de muy pocas especies, a excepción de los cromosomas politénicos de dípteros, tienen un patrón de bandas propio. Para los cromosomas de la gran mayoría de las especies el cariotipo de bandas debe ser inducido artificialmente. La coloración convencional de cromosomas ha evolucionado con el paso del tiempo en las técnicas de bandas.

Mediante ciertas técnicas de coloración, es posible detectar a lo largo de cada cromosoma bandas alternantes de mayor y menor coloración (o fluorescencia), que forman un patrón de bandas estable y característico para cada cromosoma. Este patrón de bandas es de gran utilidad práctica porque permite la identificación precisa de cada cromosoma y además permite la caracterización de regiones particulares dentro de cada brazo cromosómico.

Las técnicas modernas de bandas fueron desarrolladas inicialmente para cromosomas humanos y luego aplicadas, a un gran número de otros mamíferos, con un amplio éxito. Si se compara el número de trabajos científicos que obtienen cromosomas con bandas en mamíferos con los reportes presentados para otros vertebrados (peces, anfibios y reptiles) sólo unos pocos se han completado para estos últimos. El primer tipo de bandas fue el llamado Q, por la sustancia fluorescente empleada: quinacrina.

Otro tipo de bandas son G (Sumner *et al.*, 1971), C, NOR, R y las obtenidas con colorantes fluorescentes.

Colorantes Fluorescentes

Entre los colorantes fluorescentes más usados podemos citar DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), cromomicina A3, Hoechst 33258, Bromuro de Etidio, Para que una molécula tenga fluorescencia tiene que tener anillos aromáticos en su estructura química de manera que los electrones circundantes. Según la cantidad de electrones fluorescen en un color o en otro. Esto es así porque cuando la molécula recibe luz los electrones absorben energía y se excitan, y en estas moléculas al volver a su orbital normal emiten la energía en forma de luz.

Los colorantes fluorescentes pueden utilizarse para evidenciar telómeros (Figura 1) y centrómeros (Figura 2).

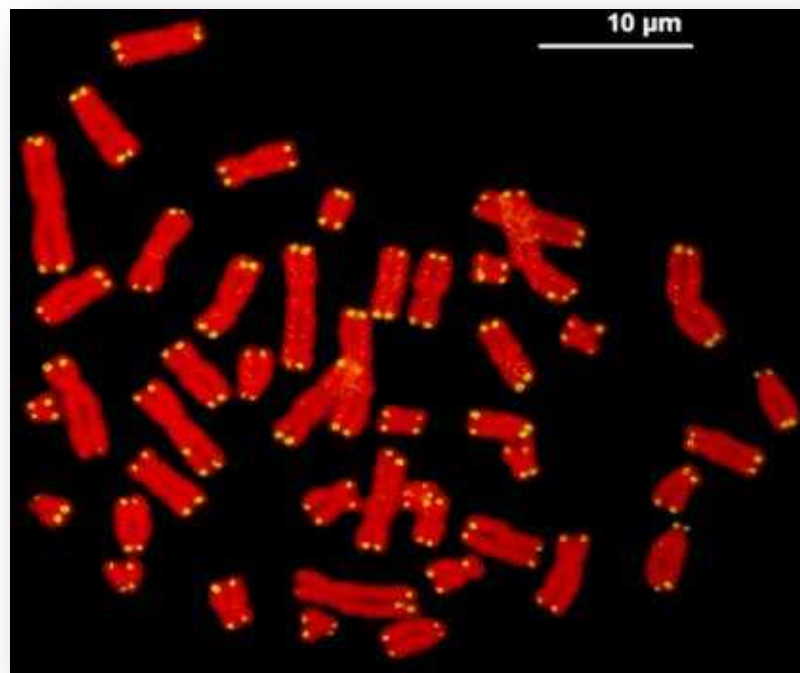


Fig. 1.: Metafase de linfocitos humanos con los telómeros marcados con fluorescencia.

FOTO TOMADA de De Meyer *et al.*, 2008.

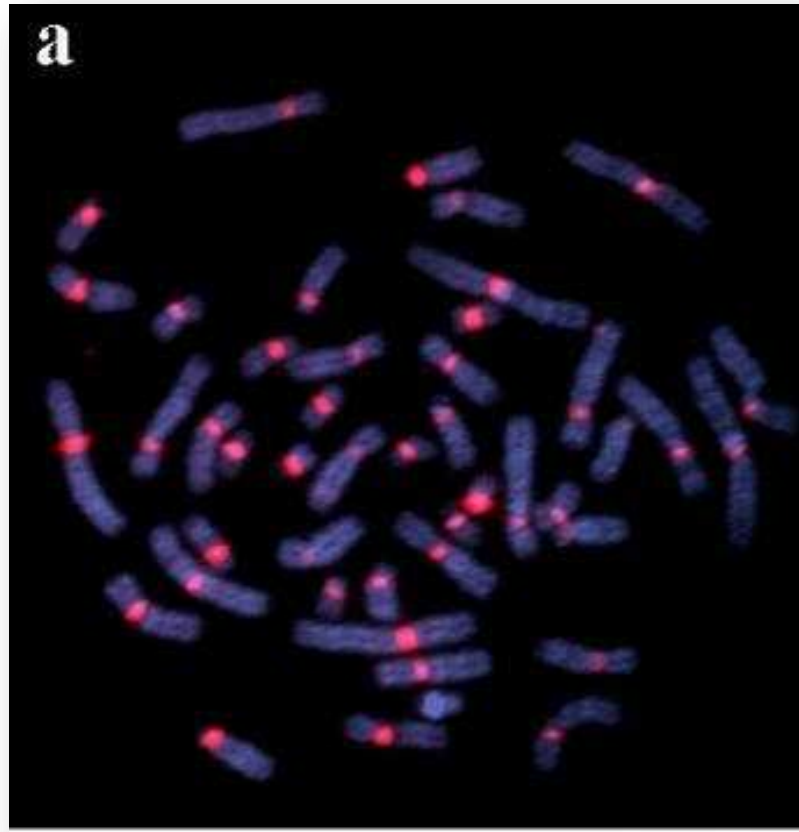


Fig. 2. Metafase de linfocitos humanos con los centrómeros marcados con fluorescencia.
FOTO TOMADA de <http://www.chrombios.com/cms/website.php?id=/en/index/aboutfish/probes/>

La tabla siguiente muestra los métodos y el material más utilizados en Citogenética Clínica.

Tabla 1

METODOS DE CULTIVO CELULAR MAS USADOS EN CITOGENETICA CLINICA

DIAGNOSTICO	MUESTRA	CELULAS	TIPO DE CULTIVO
Descartar aberraciones cromosómicas congénitas	SANGRE PERIFERICA Y DE CORDÓN UMBILICAL	LINFOCITOS	Cultivo corto: 72 hrs Células en suspensión Metodología según indicación diagnóstica (Ver Tabla 2)
Descartar mosaicismos	a) PIEL	FIBROBLASTOS	Cultivo largo: 15 días Células adheridas Prevía digestión con tripsina (0.1%) Medio: RPMI 1640 + 20% SBF 37°C, 5% CO ²
Descartar aberraciones cromosómicas en abortos espontáneos y mortineonatos	b) RESTOS DE ABORTO		
Diagnóstico prenatal cromosómico (15 a 17 semanas de gestación)	LIQUIDO AMNIOTICO	AMNIOCITOS	Cultivo largo: > 15 días Células adheridas Medio: HAM F10, RPMI 1640 Amnio Max (Gibco) + 20% SBF Subcultivos según crecimiento 37°C 5% CO ²
Diagnóstico prenatal precoz (9 a 11 semanas de gestación)	VELLOCIDADES CORIALES	TROFOBlastOS	a) Análisis directo: 1.5-2 hrs de Concemid; Cultivos: Tripsina (0.25%) 30 min. Medio RPMI1640 + 20% SBF por 72-96 hrs. 37°C, 5% CO ²
Leucemias, S. Mieloproliferativos Desórdenes Linf y Mielodisplásico Transplantes de médula	MEDULA OSEA	CLON NEOPLÁSICO	a) Directo: 25 min Medio: RPMI + 10% SBF + Colcemid 10% Temperatura ambiente b) Cultivo 24 hrs: RPMI + 20% SBF + Medio condicionado Colcemid (10ug/ml) por 3hrs.
Neuroblastoma, Sarcoma de Ewing, Linfomas, Meningiomas, otros.	TUMORES SOLIDOS	CELULAS TUMORALES	a) Directo: 2 hrs b) Cultivo corto: 5-8 días Digestión con Tripsina (0.1%) y Colagenasa (0.4%) Células adheridas y/o suspensión celular en Medio RPMI, TC 199, MEM, L15 + 10% SBF 37°C, 5% CO ²

SBF: Suero Bovino Fetal.

TABLA TOMADA de Treulén, 2008.

Nomenclatura de las bandas y sub-bandas

La designación de regiones, bandas y sub-bandas es numerada consecutivamente desde el centrómero hacia los telómeros a lo largo de cada brazo cromosómico. El centrómero es designado 10: p10 y q10 según hacia qué brazo se encuentre. Las dos regiones adyacentes al centrómero se designan región 1. Le sigue la 2 y continúa. Y luego el número de bandas. Para designar una banda particular se requiere en este orden: el número cromosómico, el símbolo del brazo, el número de la región, el número de banda dentro de la región. Luego se coloca un punto y se numeran las sub-bandas.

Resolución de bandas

La cantidad de bandas que se informa cuando se estudian los cromosomas, puede tomar como referencia los cromosomas 11 y 10 y según las bandas que se observan en el brazo corto (cromosoma 11) o la totalidad de bandas (cromosoma 10) se infiere la resolución. Los cromosomas con mayor número de bandas o de alta resolución se observan en prometafases.

CROMOSOMA 11:

Si en el brazo corto se observan **2** bandas: **400 bandas**

Si en el brazo corto se observan **4** bandas: **550 bandas**

Si en el brazo corto se observan **5** bandas: **850 bandas**

CROMOSOMA 10:

Teniendo en cuenta las bandas claras y oscuras del cromosoma 10, y contando el centrómero y los telómeros como una banda cada uno, se puede determinar la resolución de una metafase dada. (Figura 3).

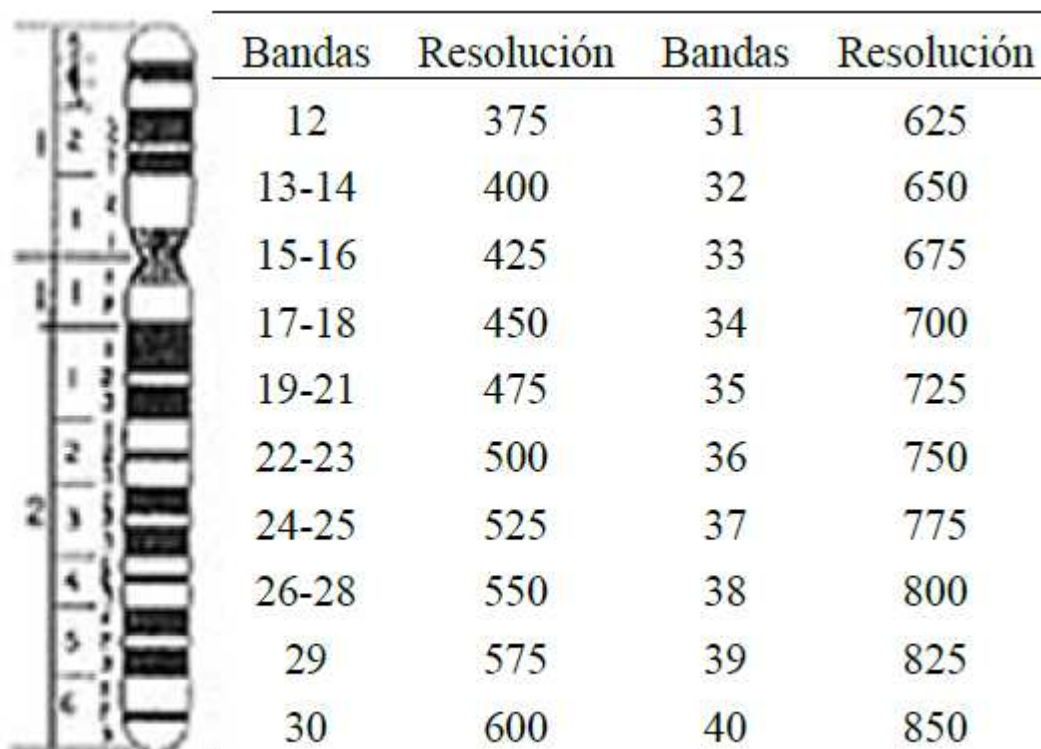


Fig.3: bandas y resolución del cromosoma 10.

La técnica de Alta Resolución o bandeo de Alta Resolución (AR) se obtiene sincronizando el cultivo de linfocitos para obtener cromosomas más elongados, en estadio de prometafase, con un incremento considerable en el número de bandas de 400-550 en la técnica estándar a 750-1000 en AR (Figura 4), lo que permite estudiarlos con mayor detalle. La guía de procedimientos del "American College of Medical Genetics" de los Estados Unidos recomienda realizar AR sólo en aquellos casos en que se sospeche un síndrome específico que requiera un grado de resolución por encima de 650 bandas.

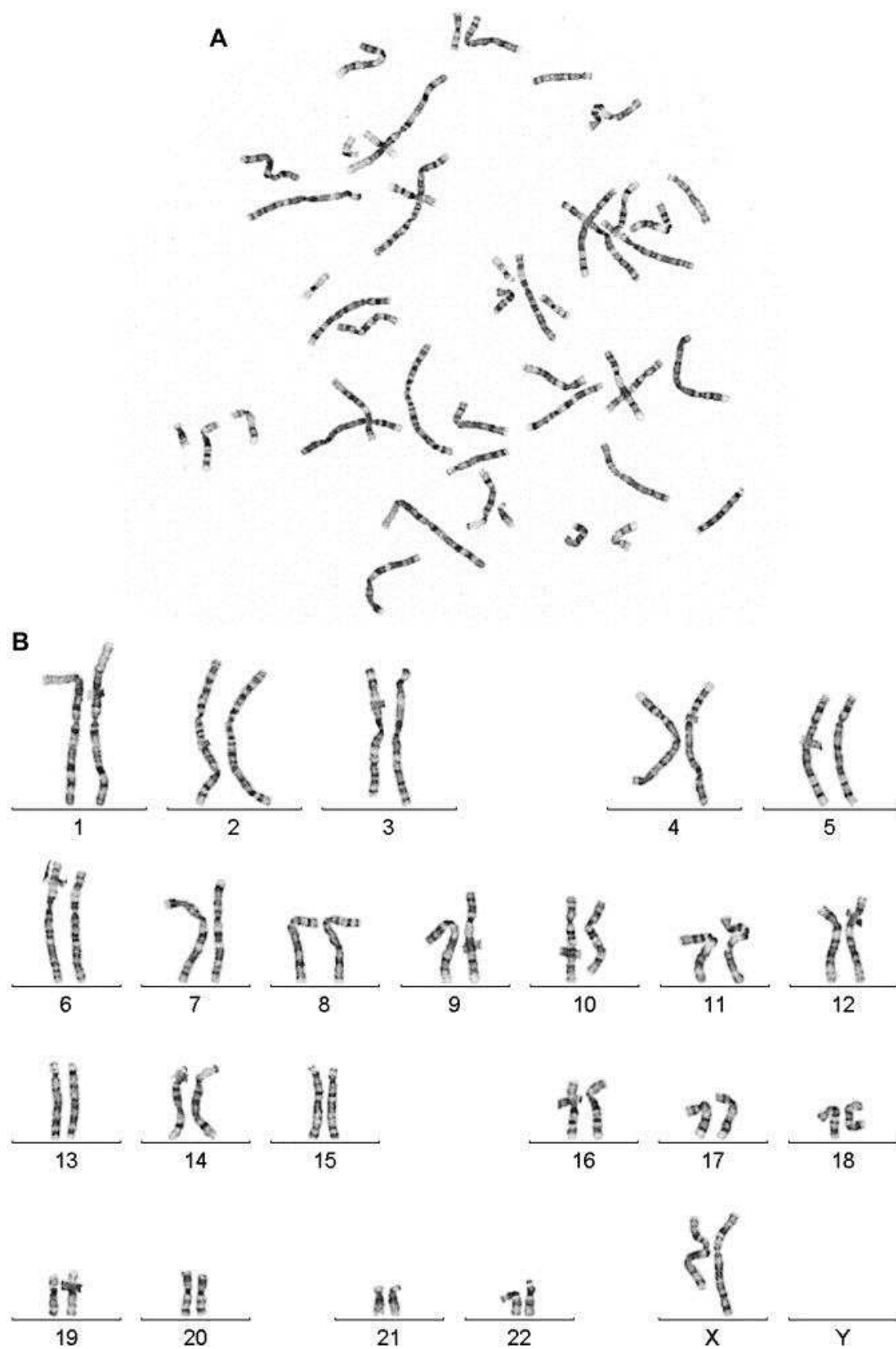


Fig. 4. Metafase y cariotipo de Alta Resolución.
TOMADAS DE Cancer Genetics and Cytogenetics (2010).

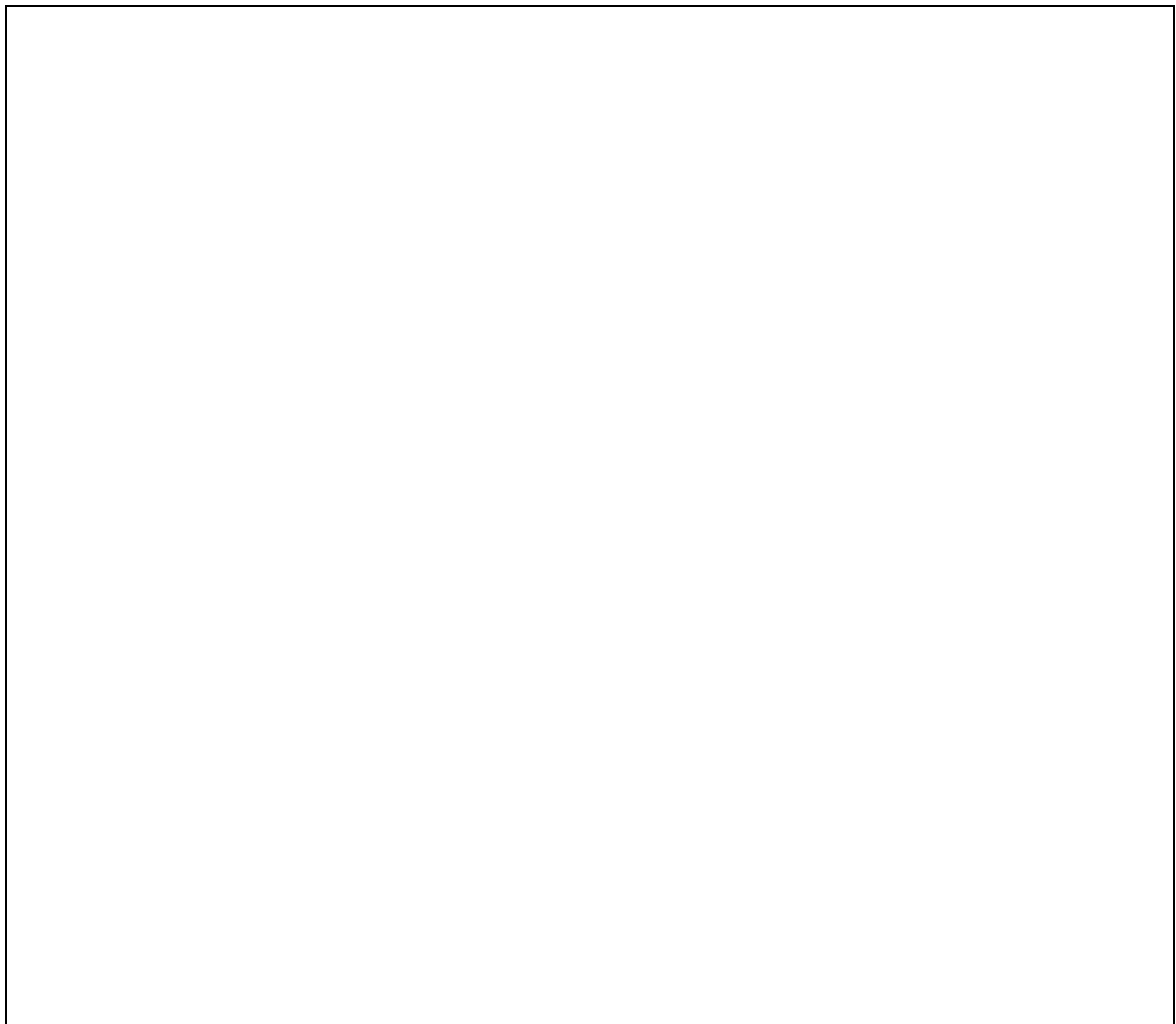
ACTIVIDADES DE COMPRENSIÓN

Para construir comprensión sobre los contenidos desarrollados en este capítulo se presentan actividades que permiten:

- Analizar metafases humanas con Bandas G al microscopio óptico (100x)
- Armar el cariotipo de una metafase
- Reconocer los diferentes métodos de bandas e interpretar su significado biológico.

1. Observación al microscopio óptico

- a) Recorre en 40X el extendido cromosómico
- b) Analiza en 100X las metafases al microscopio
- c) Dibuja lo observado ocupando todo el espacio siguiente



2. Armado de cariotipo humano con banda G

- Recorta los cromosomas (obtenidos a partir de cultivo de linfocitos) de la página siguiente y arma el cariotipo, ordenándolos según tamaño, posición del centrómero y patrón de bandas.

Esquema para armar un cariotipo humano

A horizontal number line with tick marks labeled 1, 2, 3, 4, and 5.

6	7	8	9	10	11	12
---	---	---	---	----	----	----

13	14	15	16	17	18	19	20
----	----	----	----	----	----	----	----

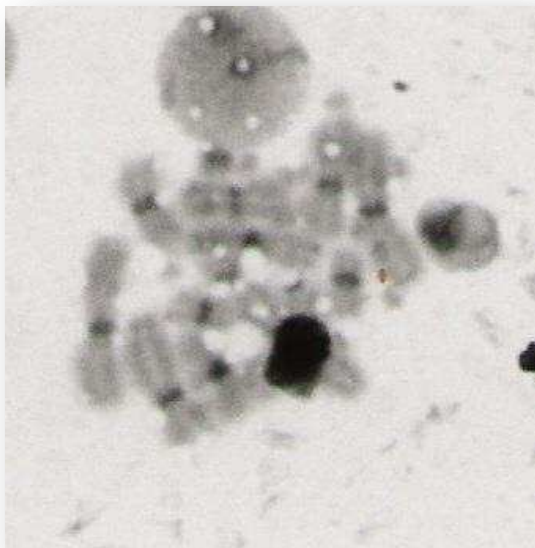
21	22	X	Y
----	----	---	---

Metafase de linfocitos humanos con Bandas G- (TOMADA y modificada de <http://biomodel.uah.es/citogene/horwitz/cytogen1.htm>)



Bandas cromosómicas en diferentes materiales y especies de animales

Metafasas con bandas C de células testiculares de lagartos de las especies *L. cuyanus* y *L. riojanus*



FOTOS de Aiassa y Gorla (2004)

Cariotipo con bandas R de linfocitos de *Homo sapiens*

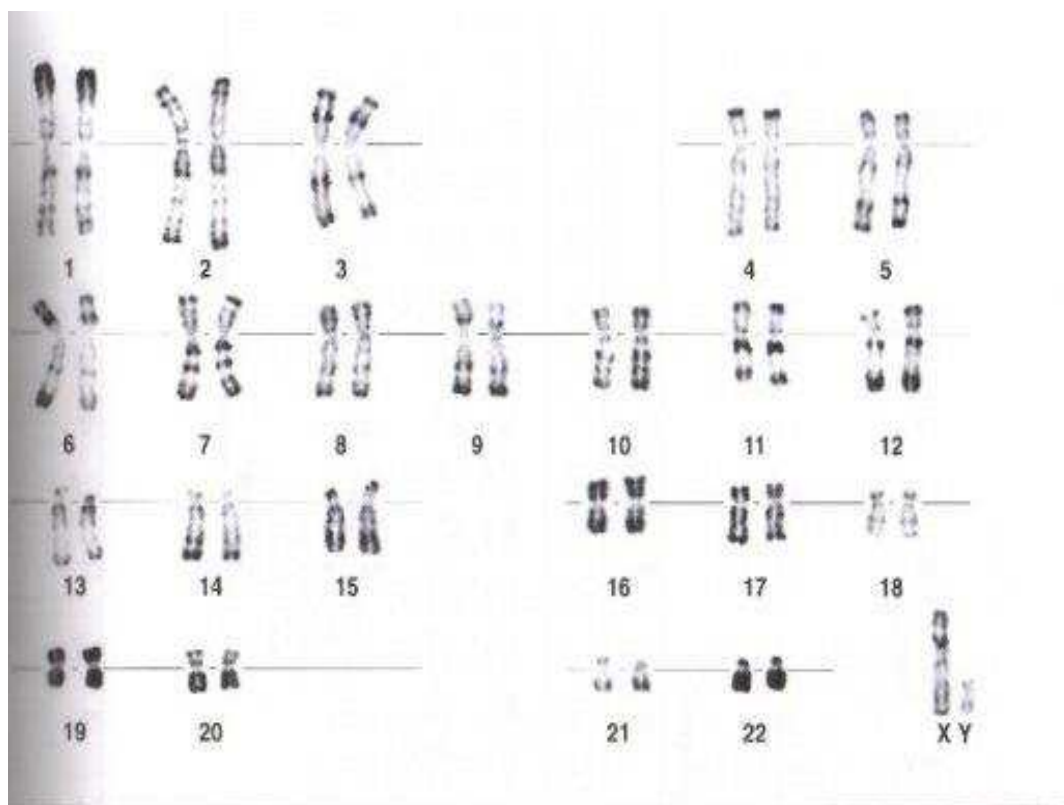


FOTO TOMADA de Treulén, 2008.

Cariotipo con bandas Q de linfocitos de *Homo sapiens*

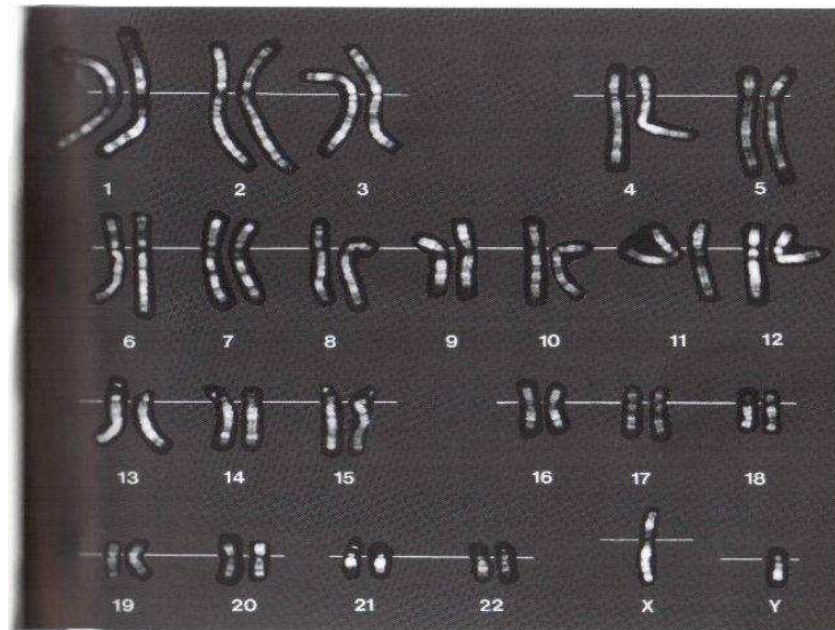
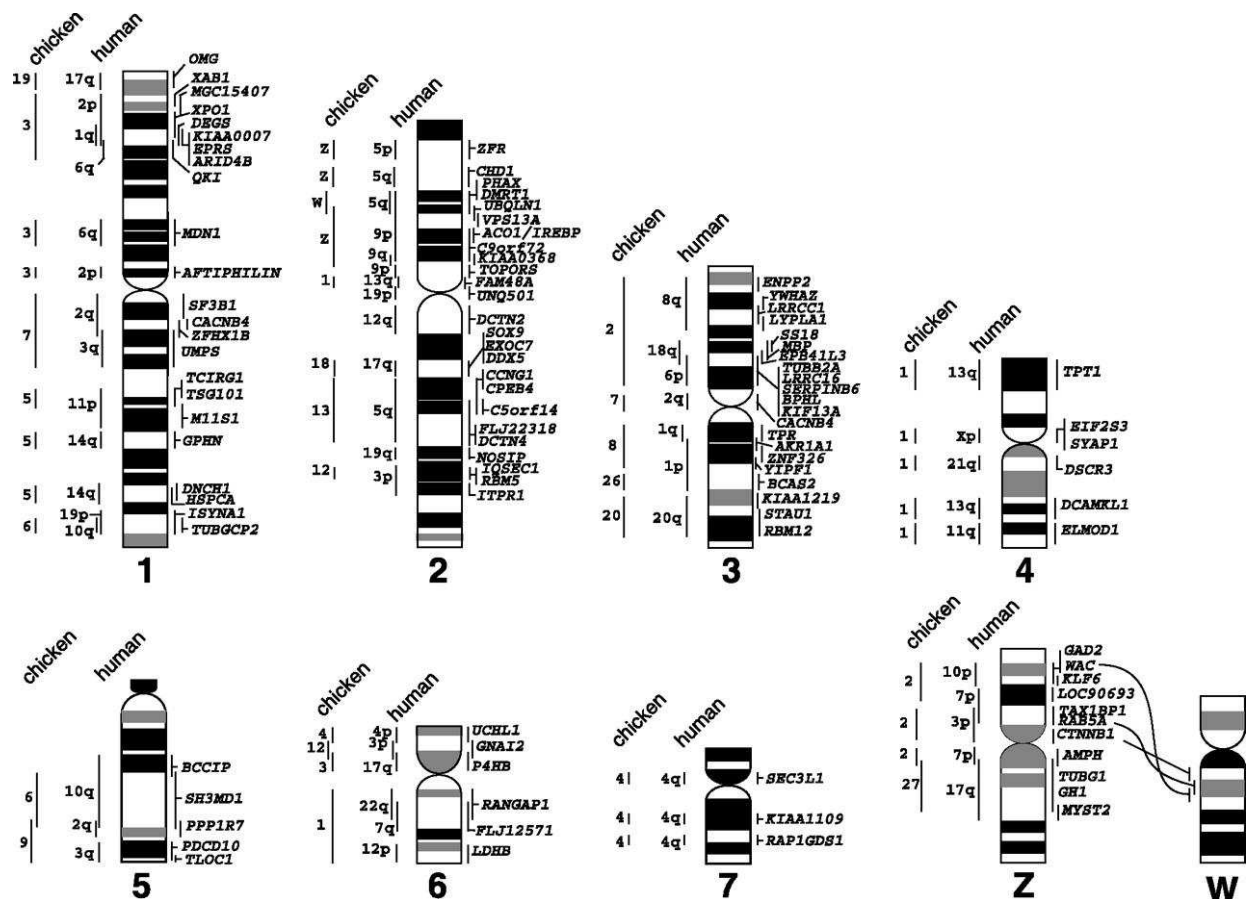


FOTO TOMADA de Treulén, 2008.

3. Interpretación

- ¿Qué ventajas y desventajas presentan los cultivos de células en relación al material directo para la obtención de cromosomas?
- ¿Cuál es el significado funcional y estructural de cada bandeo cromosómico que observas en los cariotipos y metafases de las páginas anteriores?
- Observa las bandas claras y oscuras en los cariotipos con Bandas C y NOR: ¿En qué situaciones es recomendable efectuar ambas coloraciones?
- Observa las bandas claras y oscuras en los cariotipos con Bandas G y Q: ¿Qué similitudes o diferencias, y ventajas o desventajas presentan una u otra coloración?
- Busca en la bibliografía/internet el idiograma del cromosoma X humano e indica para cada enfermedad mapeada la correspondiente región, banda y sub-banda

- En la figura que tienes a continuación se muestra un idiograma con Bandas G de los macrocromosomas de la serpiente *E. quadrivirgata* ($2n=36$). Obsérvalo detenidamente y luego responde los interrogantes que se presentan a continuación del mismo



- A la derecha de los cromosomas de *E. quadrivirgata* se presentan los genes que mapean en las diferentes regiones cromosómicas. A la izquierda se presentan los segmentos y números cromosómicos de “chicken” y de “human” homólogos a los cromosomas de *E. quadrivirgata*.

- Indica si los cromosomas Z y W de *E. quadrivirgata* tienen segmentos homólogos con cromosomas autosómicos y/o con cromosomas sexuales de “chicken” y de “human”.
- Elabora un texto explicativo respecto de la interpretación de los segmentos homólogos entre las tres especies representadas en el esquema.

Bibliografía citada y de consulta

1. De Meyer T, E R. Rietzschel, M L. De Buyzere, W Van Criekinge, S Bekaert. 2008. Studying telomeres in a longitudinal population based study, *Frontiers in Bioscience* 13, 2960-2970.
2. Drest, M. 2002. Una saga citogenética. El descubrimiento de los métodos de bandeo cromosómico. Significado y proyección biomédica. *Rev. Méd. Uruguay* 18(2): 107-121.
3. Gallego M S. 2011. Rol de la citogenética en pediatría, *Arch. argent. pediatr.* 109, 330-346.
4. Gorla, N., I. Slavutsky, J. Lisanti, E. Pedrazzini, L. Vanella e I. Larripa. 1998. Cytogenetic characterization of an extra structurally abnormal chromosome associated with severe mental retardation invdup (15) (q13), *Hereditas* 129: 1-5.
5. Mudry, M. D., M. Labal. 1988. Variabilidad en bandas C de dos poblaciones de *Cebus apella*. *Mendeliana* 8:79-86.
6. Mudry, M. D., I. M. Rahn y A. J. Solari. 2001. Meiosis and Chromosome Painting of Sex Chromosome Systems in Ceboidea, *American Journal of Primatology* 54: 65-78.
7. Shaffer, L. G. 2005. American College of Medical Genetics. Professional Practice and Guidelines Committee. American College of Medical Genetics guideline on the cytogenetic evaluation of the individual with developmental delay or mental retardation. *Genet Med* 7(9):650-4
8. Sumner, A.T., H. J. Evans y R. A. Buckland. 1971. New technique for distinguishing between human chromosomes. *Nat. New Biol.* 7:232:31-32.
9. Treulén, F. Citogenética clásica y citogenética molecular en: s3.amazonaws.com/ppt-download/citogenética3211.pps [Consulta: 01/04/2008]
10. Watt, J. y G. Stephen. 1986. Lymphocyte culture for chromosome analysis In Rooney, D. E. y B. H. Czepulkowski. Eds. *Human Cytogenetics, a practical approach*. Chap. 4. Oxford IRL Press.

5 CITOGENÉTICA MOLECULAR

Hibridación in situ

En los años ochenta la genética molecular empezó a jugar un papel importante en la mayoría de áreas de la biología. A partir de los años noventa, y gracias a importantísimos avances tecnológicos y metodológicos, el interés y la aplicación de la biología molecular en la mayoría de campos de la ciencia empezó a crecer de forma exponencial.

El desarrollo y la implementación de una variedad de técnicas de hibridación in situ para detectar (Lichter *et al.*, 1990; Track, 1991) y en algunos casos cuantificar (Kallioniemi *et al.*, 1992) secuencias específicas de ADN y localizarlas en sitios cromosómicos específicos fue el principal avance en el área de la citogenética molecular. La disponibilidad en aumento de sondas de ADN y su amplificación a través de la PCR y la disponibilidad de moléculas marcadas con fluorescencia unidas a las sondas de ADN han contribuido a hacer un verdadero puente entre el microscopio y la molécula.

Entre los principales avances tecnológicos y metodológicos destacan el desarrollo de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, polymerase chain reaction) (1987). Inicialmente puesta a punto para la amplificación de fragmentos de ADN in vitro, enseguida se utilizó para la amplificación de marcadores moleculares tanto nucleares como mitocondriales y de otras organelas. La capacidad de esta técnica de amplificar segmentos concretos de ADN a partir de cantidades ínfimas de tejido fresco, conservado en diversas sustancias (alcohol, DMSO, etc.), seco, congelado e incluso a partir de material subfósil, ha contribuido en gran medida a que esta técnica sea ampliamente utilizada. Paralelamente al auge de la técnica de la PCR, también se realizaron avances importantes en otras áreas muy relacionadas como son el diseño y síntesis de cebadores (*primers*) universales tanto para genes nucleares como mitocondriales.

Una de las partes más importantes de cualquier proyecto en genética molecular es la elección de los marcadores moleculares adecuados. Dicha elección se basa principalmente en el tipo de datos necesarios para el estudio (cuantitativo o cualitativo), tipo de herencia y tasa de evolución del marcador. En cuanto al tipo de datos, actualmente se utilizan las secuencias de ADN como método predilecto para inferir relaciones filogenéticas a todos los niveles

taxonómicos, y los análisis de microsatélites y minisatélites (*ADN fingerprinting*) para estudios más precisos sobre la estructura de poblaciones naturales, de determinación de parentesco, selección sexual, comportamiento reproductor y ecología de poblaciones. Los distintos marcadores moleculares se pueden diferenciar según su origen (nuclear o mitocondrial) y según si codifican proteínas o no. Reconociendo esos fragmentos a través de la utilización de técnicas moleculares como la hibridación *in situ* (ISH) e hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) para identificar de una forma más precisa los diversos cromosomas y regiones cromosómicas. Gracias a su precisión, esta última técnica se utiliza satisfactoriamente en sistemática para verificar las homologías y homeologías hipotetizadas previamente en base a la morfología cromosómica y técnicas de bandeo.

Esta técnica ha establecido un puente entre los niveles de resolución microscópico y molecular, permitiendo detectar secuencias específicas de ADN y localizarlas en un sitio cromosómico preciso mediante sondas de secuencias complementarias de ADN marcadas con fluorocromos.

La variación estructural detectada por esta técnica se expresa mediante la sigla ish seguida por el símbolo de la anomalía estructural seguida de paréntesis separados por el número del/ de los cromosoma/s, puntos de quiebre, y locus/loci para la/s sonda/s usada/s designada de acuerdo a GDB (Genomic Data Base) ordenada de pter a qter. El signo + - que sigue al locus indica presencia o ausencia respectivamente.

Ejemplos

Si se ha hecho un estudio citogenético estándar, se agrega el resultado de ish a continuación, separándolos por un punto:

46,XY,ish del (22)(q11.2q11.2)(D22S75-)

Se lee cariotipo masculino normal por citogenética, que por fish muestra una delección en el cromosoma 22 identificada mediante una sonda para el locus D22S75

Si no se ha hecho un estudio citogenético estándar, pero se localizó mediante fish esa aberración se escribe simplemente el resultado del fish

ish del (22)(q11.2q11.2)(D22S75-)

Hibridación in situ en interfase nuclear (ish nuc)

La ish también permite localizar secuencias específicas en núcleos en interfase. En este caso lo que se expresa es el número de señales observadas de la sonda utilizada de la siguiente manera; la abreviatura nuc ish es seguida por la banda cromosómica donde está el locus, seguida entre paréntesis por la designación del locus según GDB, luego un signo de multiplicación y finalmente el número de señales.

Ejemplos

nuc ish 21q22(D21S65x2) Dos copias del locus D21S65

nuc ish 21q22(D21S65x3) Dos copias del locus D21S65

nuc ish Xcen(DXZ1x3) Tres copias del locus DXZ1

Para interpretar fórmulas complejas debe consultarse ISCN

FISH Multicolor

El "FISH Multicolor", "M-FISH" o "SKY" (Spectral Karyotyping) es una adaptación del FISH que permite la visualización de los 23 pares de cromosomas humanos a la vez, teñidos con diferentes sondas fluorescentes.

SKY de linfocitos humanos

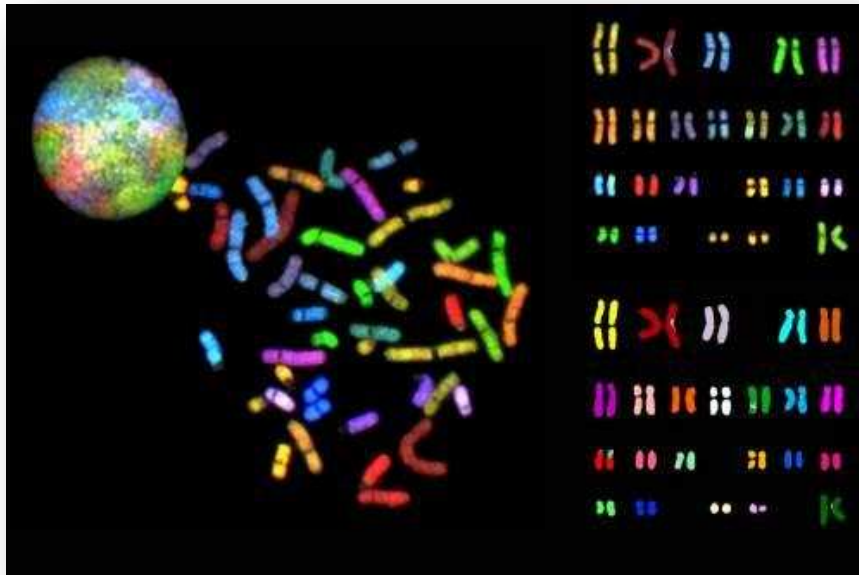


IMAGEN TOMADA de: http://www.cyto.purdue.edu/cdroms/micro1/7_spon/chroma/image4.htm

ACTIVIDADES DE COMPRENSIÓN

Para construir comprensión sobre los contenidos desarrollados en este capítulo se presentan actividades que permiten:

- Analizar casos presentados donde se utilizan técnicas de citogenética molecular.
- Valorar las aplicaciones de estas técnicas en el área de la Biología Celular y de la Biomedicina.

Resolución de casos

FISH en metafases de linfocitos humanos

Caso 1.

Un paciente es sometido a una prueba para conocer si presenta o no síndrome DiGeorge/Velo-Cardio-Facial/CATCH 22/Shprintzen.

La Fig. 1 muestra una célula en metafase que se ha hibridado con la sonda para la microdelección en el cromosoma 22.

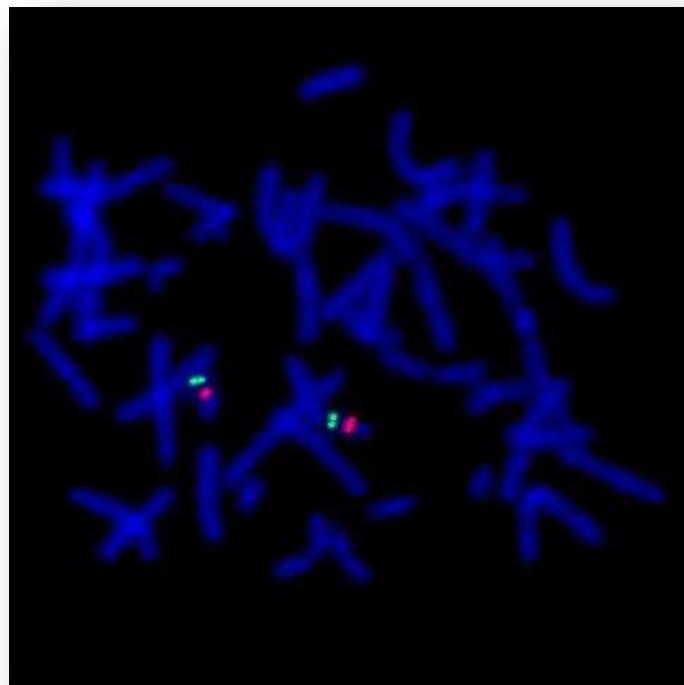


Fig. 1. Metafase hibridada con la sonda para la microdelección en el cromosoma 22.
(FOTO TOMADA de:<http://biomodel.uah.es/citogene/dynacare/fishinfo.htm>)

En este caso particular, la sonda es una mezcla bicolor de dos sondas distintas para el cromosoma 22.

La señal verde es un control interno situado en 22q13. La señal roja está situada en la región DiGeorge, en 22q11.2.

a) ¿Por qué se utiliza el control interno?

b) El resultado de la prueba muestra que ambos cromosomas 22 tienen la señal roja, en esta célula, ¿hay microdelección en la región DiGeorge? y por lo tanto ¿Este paciente tendría el síndrome?

Caso 2.

Un paciente es sometido a una prueba para precisar una alteración que muestra un cromosoma 4 en la porción terminal, observada en la coloración convencional de Giemsa.

En la Fig. 2 se muestra una metafase que se ha hibridado con una sonda "de pintado" para el cromosoma 4.

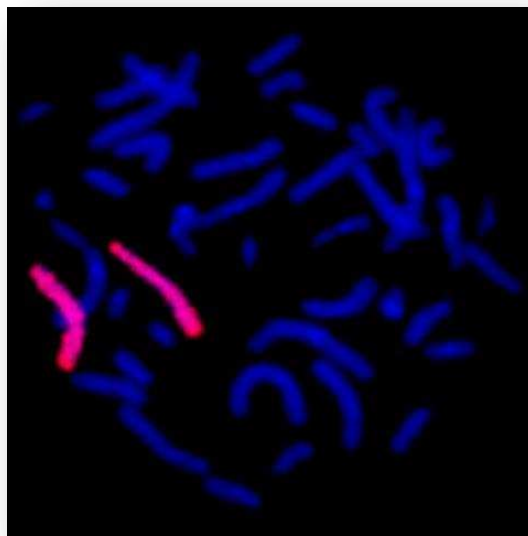


Fig. 2. Metafase hibridada con sonda del cromosoma 4 humano

(FOTO TOMADA de: <http://biomodel.uah.es/citogene/dynacare/fishinfo.htm>)

Uno de los cromosomas 4 de este paciente era anormal, pero era difícil determinar con la citogenética de rutina si tenía una pequeña delección terminal en 4q o si era el resultado de una reordenación más compleja.

Como ambos cromosomas 4 son fluorescentes en toda su longitud y no hay material fluorescente en ningún otro cromosoma ¿qué sugiere el resultado de la prueba?

La metafase de la Fig. 3 corresponde al mismo paciente anterior pero en este caso se ha hibridado con una sonda para la parte terminal del cromosoma 4q. Como sólo hay una señal verde, se confirma que en uno de los cromosomas 4 falta material del extremo terminal del brazo q. Este caso es un buen ejemplo de cómo la citogenética de rutina y la FISH pueden usarse conjuntamente para diagnosticar con exactitud anomalías cromosómicas.

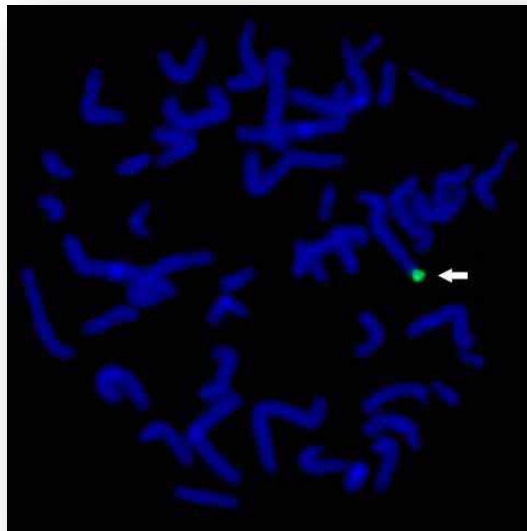


Fig. 3 Metafase hibridada con sonda 4qterminal
(FOTO TOMADA de: <http://biomodel.uah.es/citogene/dynacare/fishinfo.htm>)

- ¿Cuál de las observaciones podría arrojar un resultado falso positivo? Elabora un texto argumentativo.

FISH en interfase de linfocitos humanos

Caso 1.

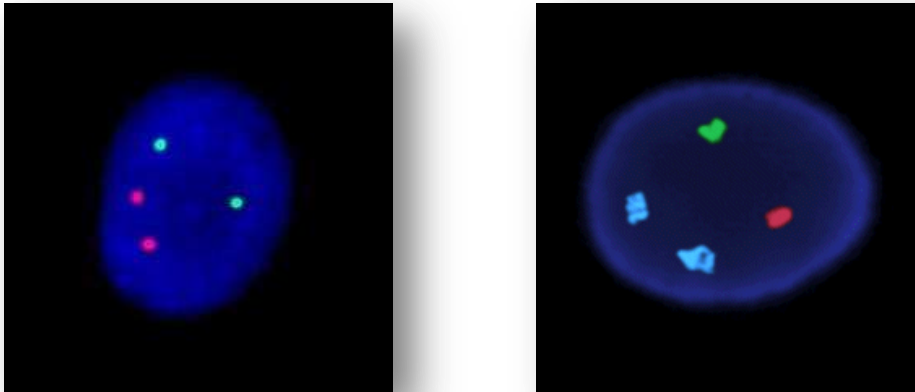


Fig. 4. Núcleos de amniocitos hibridados con sondas de cromosomas humanos
(FOTO TOMADA de: <http://biomodel.uah.es/citogene/dynacare/fishinfo.htm>)

La Fig. 4 muestra fotografías de núcleos en interfase para el estudio de aneuploidía. Se han combinado núcleos en interfase procedentes de células de fluido amniótico con sondas de ADN para los cromosomas 13, 18, 21, X e Y.

El núcleo de la izquierda se ha hibridado con sondas para los cromosomas 13 (verde) y 21 (rojo).

El núcleo de la derecha se ha hibridado con sondas para los cromosomas 18 (azul claro), X (verde) e Y (rojo).

Al observar que hay dos señales correspondientes a las sondas de 13, 18 y 21, y una sola señal de cromosomas X e Y.

- a) ¿Qué información brindan estas fotografías, en cuanto al número de cromosomas que se evidencian con las sondas utilizadas?
- b) ¿Cuál es el sexo de este feto?

Caso 2.

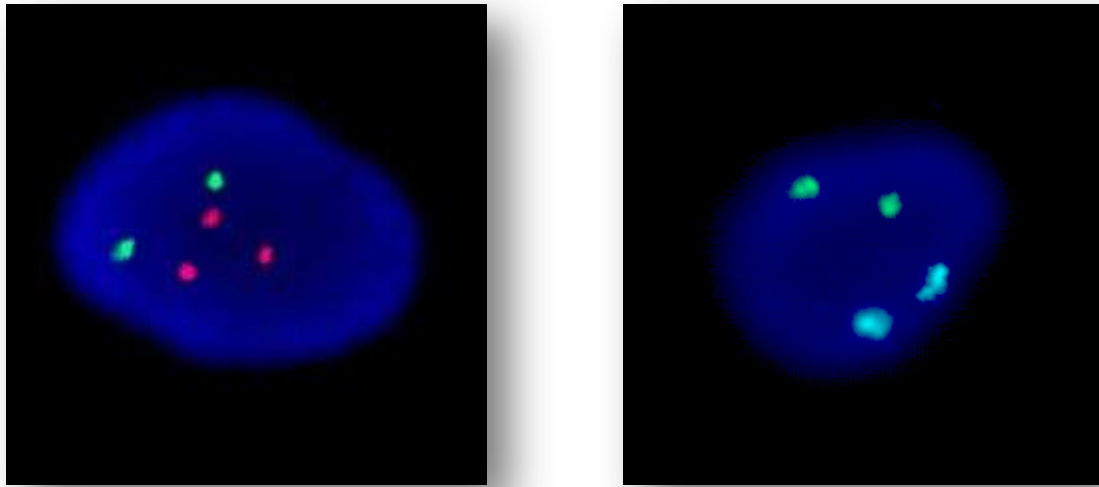


Fig. 5. Núcleos hibridados con sondas de ADN
(FOTO TOMADA de:<http://biomodel.uah.es/citogene/dynacare/fishinfo.htm>).

En la Fig. 5 se han combinado núcleos en interfase procedentes de células de fluido amniótico con sondas de ADN. El núcleo de la izquierda se ha hibridado con sondas para los cromosomas 13 (verde) y 21 (rojo). El núcleo de la derecha se ha hibridado con sondas para los cromosomas 18 (azul claro), X (verde) e Y (rojo).

Según los resultados que se observan en los núcleos interfásicos de la Fig. 5 realiza el diagnóstico de sexo y aneuploidía de este feto.

Caso 3

Un animal de raza Weimaraner llega a una consulta por presentar fenotípicamente ciertos rasgos de macho: hiperplasia de clítoris, una estructura similar a un pene en la Rx y aplomos característicos del macho. Se extrajo una muestra de sangre, la cual fue cultivada para obtención de metafases, se extendió el material en un portaobjetos, que se lo sometió finalmente a una prueba de FISH.

Núcleos de linfocitos caninos hibridados. En este ensayo se utilizó un complejo de sondas llamada X/Y, en donde la sonda que hibrida con el centrómero del cromosoma X es ROJA y la que hibrida con el centrómero del cromosoma Y es VERDE. Las metafases analizadas son como la foto de la derecha, con dos marcas ROJAS.

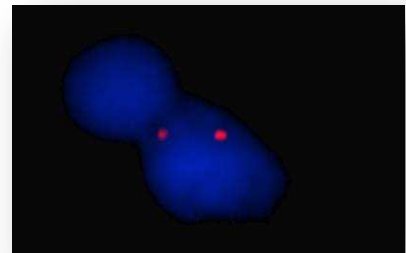


IMAGEN TOMADA de Quero *et al.*, 2010

a. ¿Qué sexo cromosómico presenta el animal?

Bibliografía de consulta

1. Immunocytochemistry and in situ hybridization in the biomedical sciences. 2001. Julian E. Beesley, editor. Boston: Birkhäuser, cop.
2. In situ hybridization: a practical approach. 1992. D.G. Wilkinson, editor. Oxford: IRL Press.
3. In situ hybridization: a practical guide. 1994. A.R. Leitch. Oxford: BIOS Scientific.
4. In situ hybridization: principles and practice. 1990. Julia M. Polak and James O'D. McGee, editores. Oxford: Oxford University Press
5. Introduction to fluorescence in situ hybridization: principles and clinical applications. 1999. Michael Andreeff, Daniel Pinkel, editores. New York: Wiley-Liss.
6. Nonradioactive In Situ Hybridization Application Manual". © 2002/2003 Roche Diagnostics Corporation. En http://www.roche-applied-science.com/frames/frame_publications.htm
7. -Quero AAM, Ferre D, Albarracín L, Hynes V, Larripa I, Gorla N, Un caso de hermafroditismo verdadero 78, XX en una perra Weimaraner, Archivos de Medicina Veterinaria ,vol 43,3, Valdivia, 2011. ISI 0301-732X.
8. Xiang Qian, M.D; R. V. Lloyd, M.D. 2003. Diagnostic Molecular Pathology 12(1):1-13 en <http://www.lwwonline.com/article.asp?ISSN=1052-9551&VOL=12&ISS=1&PAGE=1>

6 CITOGENÉTICA DE PLANTAS

Cromosomas de las plantas

Los trabajos citogenéticos realizados en los últimos veinticinco años se han concentrado principalmente en el estudio de la estructura y evolución del genoma de diferentes especies vegetales, tanto silvestres como cultivadas. En 1930 ya se contaba con mapas detallados de los cromosomas paquiténicos del maíz, donde cada cromosoma podía ser diferenciado sobre la base de su tamaño, la posición del centrómero, el largo de sus cromátidas y los patrones de coloración de la cromatina. Como resultado de esto, diferentes mapas citogénéticos estuvieron rápidamente a disposición de los genetistas, cada vez más interesados en el estudio detallado del genoma.

Los cromosomas de las plantas contrariamente a lo que se observa en los cromosomas animales, poseen un ADN con una proporción muy importante de secuencias repetitivas que se caracterizan por un equilibrio entre los nucleótidos adenina (A) y timina (T) respecto de la guanina (G) y la citocina (C), es decir, en la relación AT:GC. Tal equilibrio posiblemente explica la extensa homogenización que han sufrido los cromosomas en los genomas vegetales como resultado de una frecuencia elevada de eventos de transposición y/o conversión (Schwarzacher *et al.*, 1997).

Arabidopsis es un “sistema modelo” conveniente y adecuado para el análisis de meiosis, y la coloca en el mismo plano de estudio que otros modelos animales tales como *Drosophila sp* y *C. elegans*, extendiendo el rango de organismos modelo para las plantas.

A continuación se muestra en la Figura 1, una foto e idiograma de un ejemplar de *Arabidopsis thaliana* ($2n = 10$).

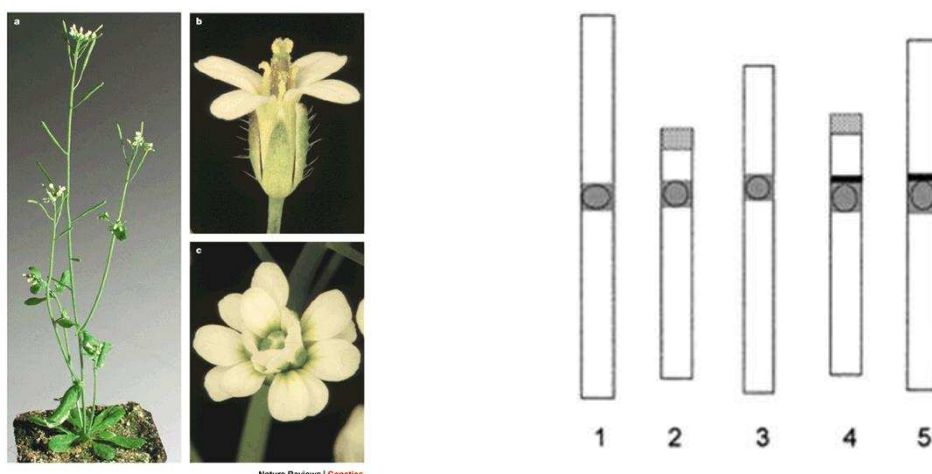


IMAGEN TOMADA DE http://www.nature.com/nrg/journal/v3/n2/fig_tab/nrg730_F1.html

Fig. 1. Ejemplar y flor de *Arabidopsis thaliana* (izquierda) y el idiograma de la especie (derecha). En gris heterocromatina pericentromerica, en gris claro NORs (45S rDNA) y en negro 5SrDNA.

El número de cromosomas ($2n$) en las plantas varía mucho de unas especies a otras como se observa en la Tabla I.

Tabla I. Números cromosómicos de algunas plantas

Planta- nombre vulgar, nombre científico	Nº de Cromosomas ($2n$)
Roble blanco, <i>Quercus alba</i>	24
Cerezo ácido, <i>Prunus cerasus</i>	32
Repollo, <i>Brassica oleracea</i>	18
Guisante de jardín, <i>Pisum sativum</i>	14
Guisante, <i>Lathyrus odoratus</i>	14
Frijol, <i>Phaseolus vulgaris</i>	22
Pepino, <i>Cucumis sativus</i>	14
Algodón, <i>Gossypium hirsutum</i>	52
Papa, <i>Solanum tuberosum</i>	48
Tomate, <i>Solanum lycopersicum</i>	24
Tabaco, <i>Nicotiana tabacum</i>	48
Trigo candeal, <i>Triticum aestivum</i>	42
Trigo duro, <i>Triticum durum</i>	28
Cebada, <i>Hordeum vulgare</i>	14
Centeno, <i>Secale cereale</i>	14
Arroz, <i>Oryza sativa</i>	24

TABLA TOMADA y MODIFICADA de Ayala y Kiger (1984).

La poliploidía es un suceso más frecuente en las plantas que en los animales. En los vegetales la poliploidía se encuentra muy extendida dentro de las plantas vasculares (aproximadamente un 30% de las especies son alopoliploides) y parece estar relacionada con la latitud geográfica. Generalmente en las plantas poliploides se da el fenómeno *gigas*, es decir se produce un aumento de tamaño en los individuos poliploides ya que sus células son más grandes que las de los diploides.

Las duplicaciones cromosómicas en algunas especies (Ej: maíz) aumentan la producción en grano respecto de los genotipos parentales. Así también las translocaciones pueden ser utilizadas para construir genomas nuevos de un cultivo con características deseables.

En la mejora de plantas se busca la homocigosis tanto para obtener líneas puras en especies alógamas (fecundadas mediante la transferencia del polen de la flor de una planta a otra por medio de insectos, el viento u otros agentes), como para recuperar formas homocigotas después de realizar un cruzamiento en plantas autógamas (aquellas que se autofecundan).

Citogenética molecular en plantas

La citogenética molecular añade una nueva dimensión al estudio de la genómica de las plantas. Las diferencias en las secuencias repetitivas entre las diferentes especies se han utilizado para desarrollar técnicas de hibridación fluorescente in situ que pueden definir los componentes de alopoliploides en detalles y revelar introgresión entre especies. Por otro lado sondas de cromosomas artificiales y arrays de secuencia repetitivas se han utilizado para distinguir cada uno de los cromosomas somáticos no homólogos dentro de una especie. Tal análisis del cariotipo abre nuevas vías para el estudio de la variación cromosómica y comportamiento, así como para la localización de genes.

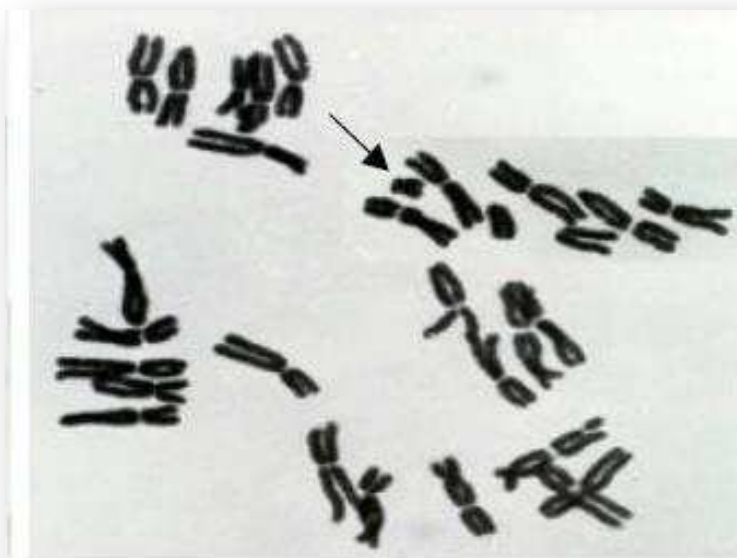
La adaptación de protocolos de FISH en un número cada vez más creciente de especies vegetales ha abierto nuevas posibilidades para el estudio de los genomas vegetales permitiendo, entre otras cosas, los siguientes desarrollos a) identificar cromosomas específicos, b) estudiar el origen y la estructura de los genomas híbridos, c) comparar regiones genómicas homologas, d) estudiar el comportamiento cromosómico, y e) localizar secuencias específicas de ADN (como por ejemplo, transposones y otros fragmentos cromosómicos).

Debido a la naturaleza alopoliploide del trigo y otros miembros de la tribu Triticeae, sus genomas han sido ampliamente estudiado por Citogenética molecular. La técnica GISH tiene un aplicación práctica en la identificación de cromatina proveniente de diferentes especies, así como para estudiar el apareamiento cromosómico y recombinación entre los genomas divergentes. La hibridación genómica in situ (GISH, por genomic in situ hybridization) es una modificación de la FISH que permite colorear diferencialmente los cromosomas de distintos ancestros (en el caso de una especie) o de genomas parentales (en el caso de un híbrido). Esta técnica utiliza el ADN genómico total de uno de los ancestros (o especies parentales) como sonda, la cual se híbrida sobre los cromosomas metafásicos del individuo estudiado (ya sea una especie o un híbrido).

Hace algunos años discriminar con GISH, entre dos genomas de géneros diferentes era más sencillo que entre genomas de especies del mismo género. Así, la identificación de tres genomas estrechamente relacionados en el trigo alohexaploide (*Triticum aestivum* L.) era complejo. Han *et al.* (2003, 2004) desarrollaron una modificación de la técnica para superar este problema. Antes de este trabajo, la identificación de los genomas A, B y D había sido reportado por otros autores aunque mostraba dificultades ya que no era posible distinguir fácilmente los genomas A y D. Han *et al.* (2003, 2004) superan los problemas pudiendo discriminar los tres genomas del trigo.

Cromosomas B en los vegetales

Los cromosomas B (supernumerarios o accesorios) corresponden a cromosomas adicionales a los del complemento normal (cromosomas A), que no recombinan con éstos y que muestran modos de herencia irregulares y no Mendelianos.



En la fotografía se observa una metafase de *Agropyron*. La flecha indica un cromosoma B en *Agropyron*, del numeroso género de la tribu Triticale, con más de 100 especies.

A pesar de la existencia de algunos ejemplos de cromosomas B beneficiosos, los datos apoyan, en su mayoría, la naturaleza parásita de los cromosomas B.

Los cromosomas B se han hallado en unas 10 especies de hongos, 1300 especies de plantas y 500 de animales. Son frecuentes sobre todo en ciertos grupos animales (langostas) y vegetales (Compuestas, Gramíneas y Liliáceas).

ACTIVIDADES DE COMPRENSIÓN

Para construir comprensión sobre los contenidos desarrollados en este capítulo se presentan actividades que permiten:

- Analizar metafases de diferentes especies de plantas (*Allium sp.*, *Secale sp.*, *Lactuca sp.*) al microscopio óptico (100x)
- Reconocer diferentes morfologías cromosómicas y escribir el cariotipo
- Identificar el nivel de ploidía en especies vegetales comunes

1. Observación al microscopio

- a) Recorre en 40X el extendido cromosómico
- b) Analiza en 100X las metafases al microscopio
- c) Dibuja lo observado ocupando todo el espacio siguiente



2. Armado de cariotipos

Cariotipo de un vegetal con coloración convencional de Giemsa

Arma todos los cariotipos siguiendo las mismas indicaciones que para el cariotipo humano:

- a) Recorta los cromosomas de *Allium cepa* y ordénalos por tamaños de manera decreciente en el esquema.
- b) Realiza las mediciones cromosómicas y obtiene *r* e *i* – reubícalos en el esquema si es necesario-
- c) Asigna a cada par cromosómico la morfología cromosómica a partir de las mediciones realizadas
- d) Elabora un idiograma del cariotipo armado.

Metafase de *Aloe vera*. Las flechas señalan las constricciones secundarias en los brazos largos de los cromosomas

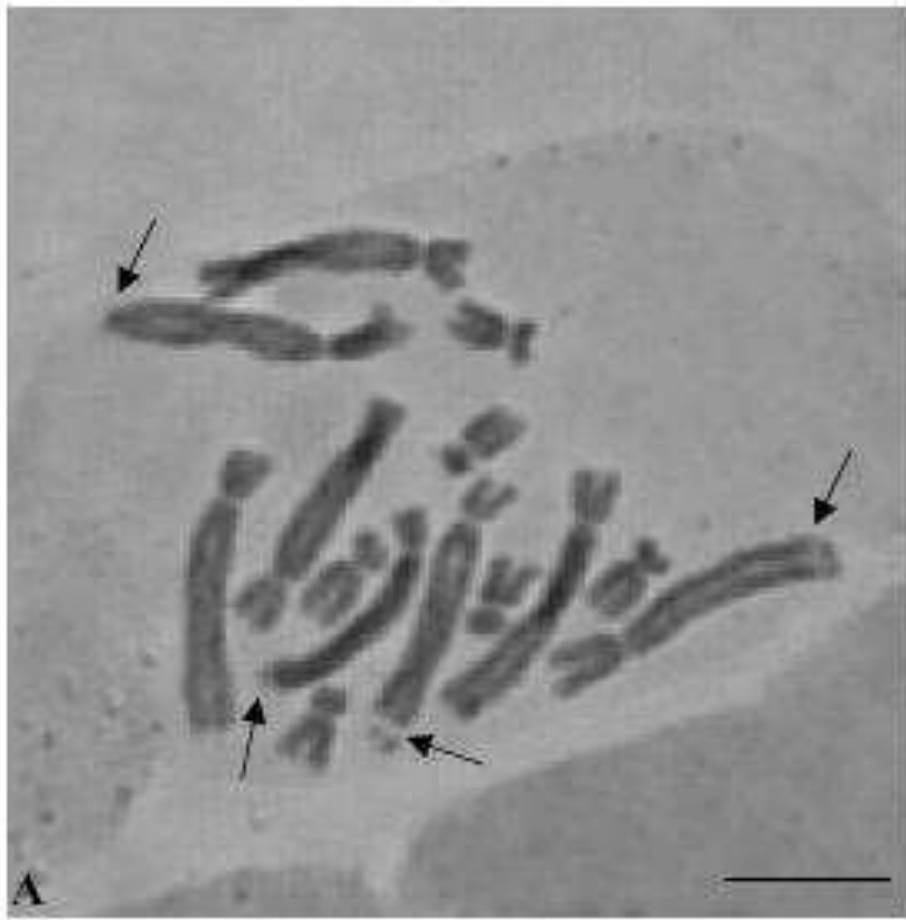
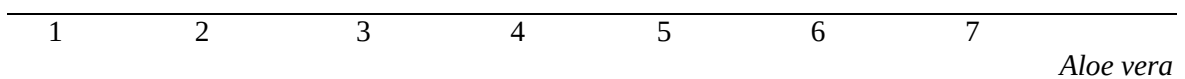


FOTO TOMADA de Albornoz e Imeriy 2003

Esquema para armar el cariotipo de *Aloe vera*



3.-Interpretación

- ¿Qué información brindan las constricciones secundarias observadas en los cromosomas de *Aloe vera*?
- Completa la columna correspondiente al nivel de ploidía

<i>Vegetal</i>	<i>Nº cromosómico básico (x)</i>	<i>Número cromosómico</i>	<i>Nivel de ploidía.</i>
<i>avena</i>	<i>7</i>	<i>42</i>	<i>6x</i>
<i>maní</i>	<i>10</i>	<i>40</i>	<i>4x</i>
<i>caña de azúcar</i>	<i>10</i>	<i>80</i>	
<i>banana</i>	<i>11</i>	<i>22,33</i>	
<i>papa</i>	<i>12</i>	<i>48</i>	
<i>tabaco</i>	<i>12</i>	<i>48</i>	
<i>algodón</i>	<i>13</i>	<i>52</i>	
<i>manzana</i>	<i>17</i>	<i>34,51</i>	

- En la imagen se muestran los cromosomas de un ejemplar de trigo-*Thinopyrum intermedium* con el patrón que revela la técnica Multicolor GISH.

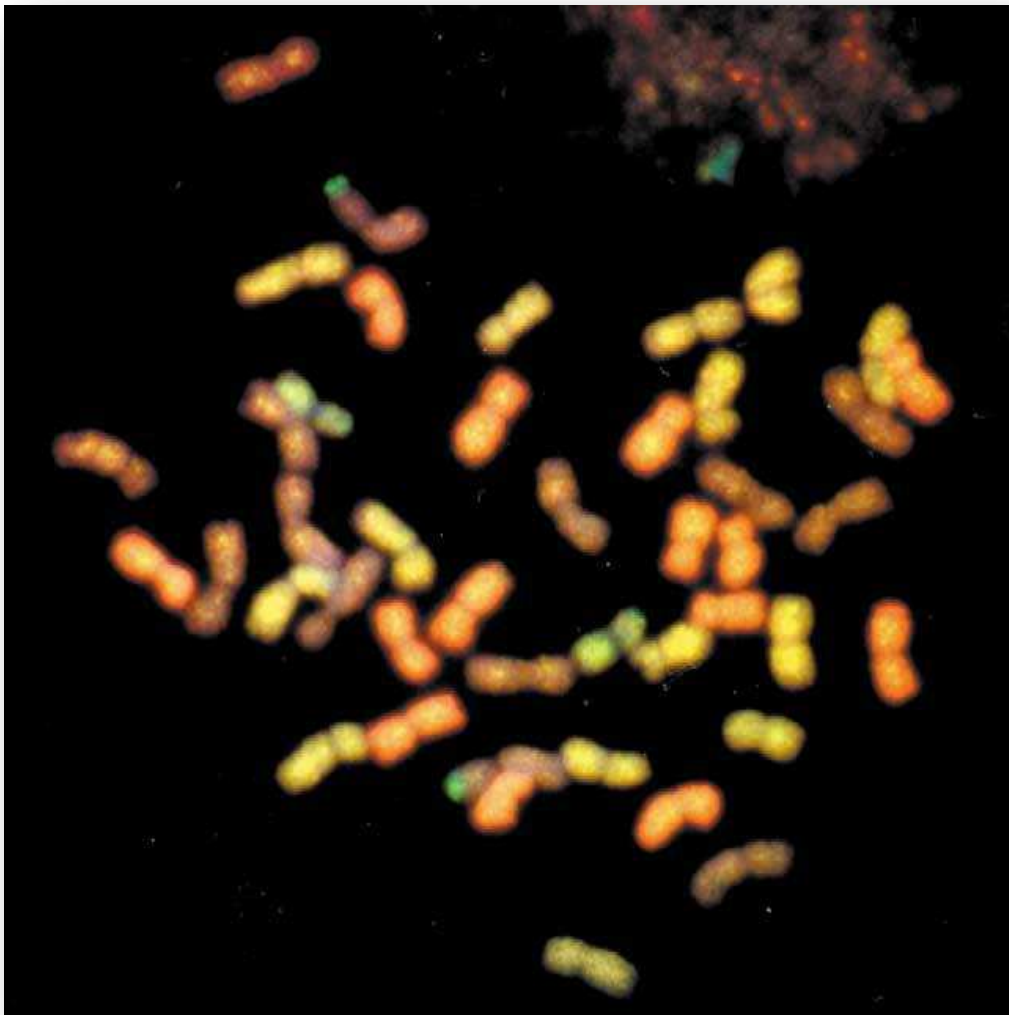


IMAGEN TOMADA de Kato *et al.* (2005).

Los cromosomas del genoma A-fueron detectados como fluorescencia de color amarillo, los cromosomas del genoma D-fueron revelados por fluorescencia de color rojo, y los cromosomas del genoma B-aparecen de color marrón como resultado de hibridación cruzada de diferentes sondas genómicas.

- a) ¿Con qué color se identifica la cromatina de *Th intermedium*? Indica con flechas sobre la fotografía la ubicación de la misma.
- b) Se observan cromosomas traslocados. Indica entre qué genomas (A, B, D o *Th intermedium*) ocurrió la traslocación.

- En la fotografía siguiente se muestran los cromosomas somáticos de la línea endogámica de maíz B37.

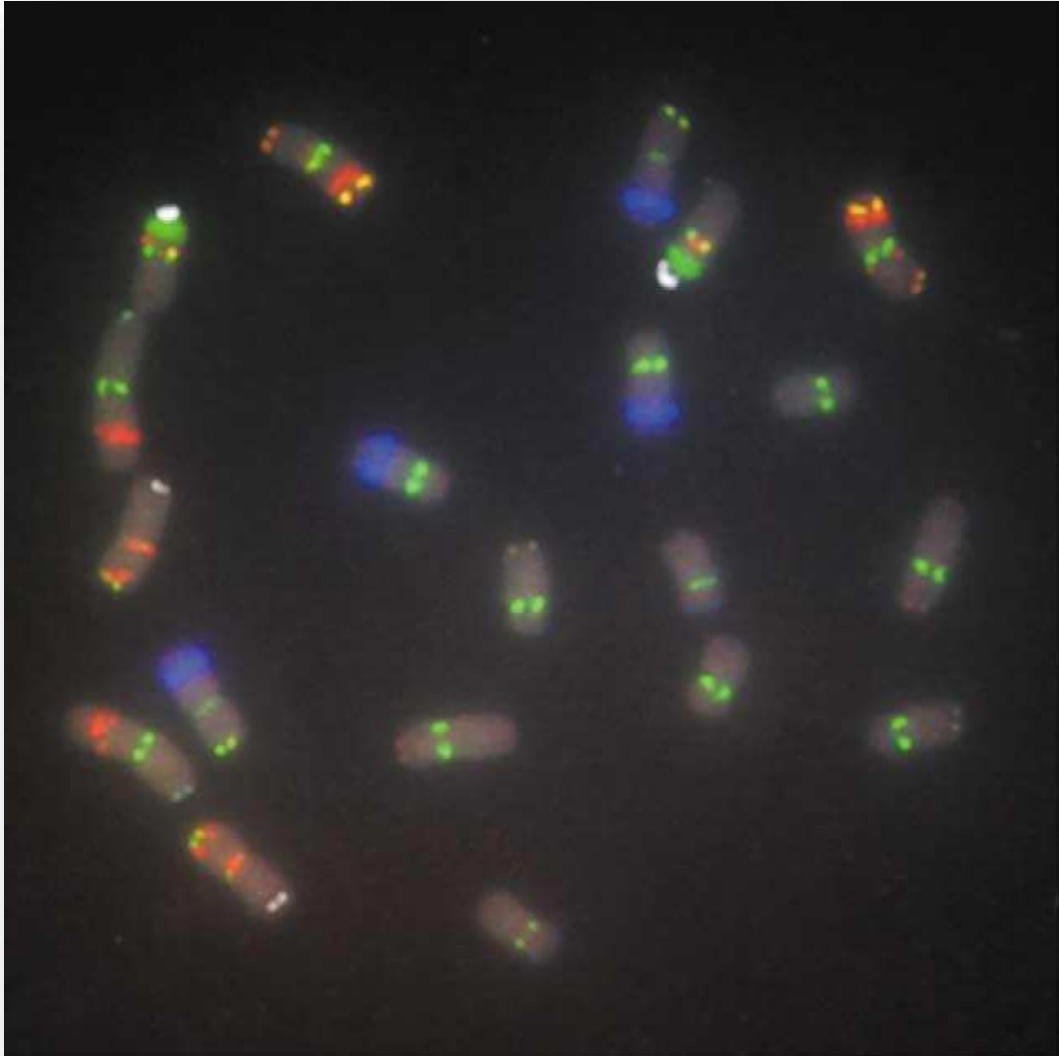


IMAGEN TOMADA de Kato *et al.* (2005).

- a) ¿Cuál es el número cromosómico de esta especie?
- b) ¿Qué técnica se aplicó para la identificación de estos cromosomas?
- c) Reconoce e indica los pares cromosómicos homólogos. Escribe con números sobre la fotografía, los cromosomas homólogos

Bibliografía de consulta

1. Asghari A, Y. Agayev y S. A. Fathi, 2007. Karyological Study of Four Species of Wheat Grass (*Agropyron sp.*). Pakistan Journal of Biological Sciences, 10: 1093-1097.
2. Alborno Aguilera, A. y J. Imery Buiza. 2003. Evaluación citogenética de ocho poblaciones de *Aloe vera* L. de la Península de Araya-Venezuela. Ciencia 11(1), 5-13.
3. Gauna, M.C. y E. Parodi 2005. Morfología y ciclo de vida de *Batrachospermum atrum* var. *puiggarianum* (batrachospermales, rhodophyta). Darwiniana 43(1-4): 57-63.
4. Jones R. N. y A. Houben B chromosomes in plants: escapes from the a chromosome genome? en Trends in Plant Science, vol. 8, págs. 417-423; 2003
5. Poggio L y C Naranjo. 2004. Citogenética. En: Biotecnología y mejoramiento vegetal. Consejo argentino para la información y el desarrollo de la biotecnología. Parte II herramientas básicas; I Inta<INTA, 69-79.
6. Han F, Fedak G, Benabdelmouna A, Armstrong K, Ouellet T:2003.Characterization of six wheat x *Thinopyrum intermedium* derivatives by GISH, RFLP and multicolor GISH. Genome 46:490-495.
7. Han F, Liu B, Fedak G, Liu Z: 2004. Genomic constitution and variation in five partial amphiploids of wheat–*Thinopyrum intermedium* as revealed by GISH, multicolor GISH and seed storage protein analysis. Theor Appl Genet 109:1070-1076.
8. Kato A., J. M. Vega, F. Han, J. C Lamb y J. A. Birchler. 2005. Advances in plant chromosome identification and cytogenetic techniques. Current Opinion in Plant Biology 8:148–154.
9. Schwarzacher, T., M.L. Wang, A.R. Leitch, N. Miller, G. Moore y J.S. Heslop-Harrison. 1997. Flow cytometric analysis of the chromosomes and stability of a wheat cell culture line. Theor. Appl. Genet. 94, 91-97.

7 CITOGENÉTICA ANIMAL

Estudios cromosómicos en animales

La Citogenética Animal ha tenido un notable desarrollo desde el año 1970. Los estudios citogenéticos hasta esa década se habían realizado preferentemente en *Drosophila melanogaster*, las causas del auge de los estudios en esta especie se debió al gran tamaño de sus cromosomas politénicos y al número reducido de ellos. En cambio los estudios en mamíferos y en particular en el hombre presentaban dificultades, debido especialmente a que las técnicas empleadas no permitían obtener imágenes precisas.

El avance de la Citogenética humana estimuló los estudios de otras especies de mamíferos. Fue en la década del 60 que se iniciaron los estudios de animales de interés zootécnico, porque se observaron anomalías cromosómicas en bovinos, que eran perjudiciales para la producción del ganado. Esto trajo como consecuencia un interés por la Citogenética en los Programas de Mejoramiento de la Producción. Este interés se desarrolló especialmente en Europa. Fue así como en 1970 el Profesor Fiiieck organizó el Primer Coloquio Europeo de Citogenética de Animales Domésticos. En 1977 se realizó en Francia el Coloquio Internacional, que reunió a Citogenetistas de Estados Unidos, Canadá y Europa. Desde entonces cada dos años se realizan reuniones internacionales que se alternan en Europa y en Estados Unidos, sobre la citogenetica de Animales Domésticos.

La verdadera revolución en el campo de la citogenética se dio en los últimos 15 años, particularmente en el área humana y animal. Las innovaciones técnicas en la microscopía confocal y epifluorescente, así como el desarrollo de componentes ópticos de excelentes características (lentes, filtros, captores), mejoraron de manera decisiva el desempeño de los clásicos microscopios de luz transmitida. A estos cambios se sumó la implementación progresiva de una amplia gama de métodos de hibridación con sondas fluorescentes, basadas en la utilización de una gran variedad de fluorocromos que abarcaban prácticamente toda la gama del espectro luminoso, desde el infrarrojo hasta el ultravioleta. En síntesis, el desarrollo de métodos rápidos y precisos para la marcación y detección de sondas, así como la utilización de software especializado para el tratamiento de imágenes, darían un gran empuje a las técnicas modernas basadas en la llamada hibridación in situ fluorescente o FISH (por fluorescent in situ hybridization) utilizadas en la investigación médica y biológica actual.

En relación a los animales silvestres, los estudios citogenéticos han proporcionado conocimiento acerca de algunas especies, sin embargo, la gran diversidad existente contrasta con el bajo número de análisis realizados, conocimiento básico indispensable para instaurar programas de conservación y reintroducción de fauna silvestre. En el caso de especies en peligro de extinción en cautiverio, el análisis de su cariotipo se hace indispensable para prevenir la hibridación interespecífica (cruce entre individuos de especies diferentes), que puede conducir a la pérdida del genotipo original y a la extinción de subespecies y especies por el nacimiento de híbridos estériles.

Los estudios de cariotipo también son importantes tanto en los animales silvestres como en los domésticos destinados a la cría en cautiverio, para identificar animales portadores de alteraciones cromosómicas no deseables y evitar el nacimiento de individuos con malformaciones. Las alteraciones cromosómicas, producen un menor rendimiento reproductivo, ya que producen una disminución o ausencia total de la producción de gametos funcionales y/o mortalidad embrionaria.

En los animales domésticos se ha demostrado la utilidad del análisis cromosómico aplicado al diagnóstico de anomalías cromosómicas con el fin de mejorar la producción animal.

El número de cromosomas en animales es muy variable como puede observarse en la siguiente tabla (Tabla 1). Existen especies de hormigas con 1 cromosoma en los machos y dos cromosomas en las hembras y en el otro extremo lepidópteros con más de 400 cromosomas.

Tabla I. Algunos números cromosómicos de animales

Organismo	Nº Cromosomas (2n)
Hombre, <i>Homo sapiens</i>	46
Chimpancé, <i>Pan troglodytes</i>	48
Mono rhesus, <i>Macaca mulata</i>	48
Caballo, <i>Equus caballus</i>	64
Burro, <i>Equus asinus</i>	62
Perro, <i>Canis familiaris</i>	78
Gato, <i>Felis domesticus</i>	38
Cerdo, <i>Sus scrofa</i>	38
Ratón doméstico, <i>Mus musculus</i>	40
Rata, <i>Ratus norvegicus</i>	42
Pollo, <i>Gallus domesticus</i>	78
Pavo, <i>Meleagris gallopavo</i>	82
Rana, <i>Rana pipiens</i>	26
<i>Platypoecilus maculatus</i>	48
Estrella de mar, <i>Asterias forbesi</i>	36
Gusano de seda, <i>Bombix mori</i>	56
Mosca doméstica, <i>Musca domestica</i>	12
Mosca de la fruta, <i>Drosophila melanogaster</i>	8
Mosquito, <i>Culex pipiens</i>	6
Cucaracha, <i>Blatta germanica</i>	23, 24
Cangrejo ermitaño, <i>Eupagurus ochotensis</i>	254
Toro, <i>Bos taurus</i>	60

Animales domésticos y citogenética

Las características citogenéticas más relevantes de los animales domésticos son:

- La aneuploidía de cromosomas está generalmente asociada con anomalías sexuales
- Las aberraciones cromosómicas son una causa importante de mortalidad embrionaria y por lo tanto de pérdidas económicas en animales de producción. El 25% de las muertes embrionarias se producen por aberraciones cromosómicas

- La manipulación cromosómica se realiza en peces y pollos para producir animales poliploides (Figura 1) que alcanzan mayor masa muscular antes de la pubertad (Figura 2).

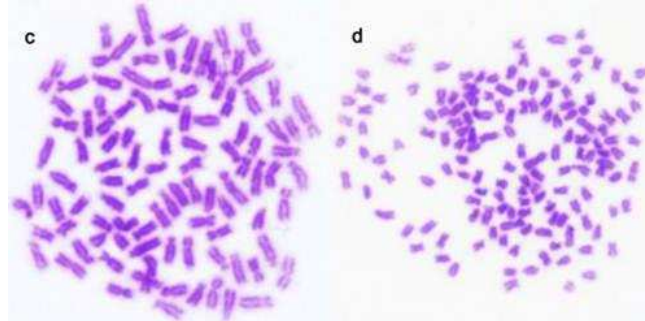


Figura 1 (c) Carpa cruciana hembra diploide $2n = 100$. (d) Carpa triploide $3n = 150$.
TOMADA DE Int J Biol Sci 2011; 7(4):487-495. doi:10.7150/ijbs.7.487



Fig. 2. Trucha triploide y estéril
IMAGEN TOMADA de Int J Biol Sci 2011; 7(4):487-495. doi:10.7150/ijbs.7.487

La dependencia de la humanidad en relación a la diversidad biológica ha situado a la **Citogenética Animal** en una posición de privilegio frente a la necesidad de **caracterizar a nivel cromosómico y molecular la biodiversidad animal**, con la finalidad fundamental de permitir:

- La conservación,
- El uso sostenible y
- La selección de genes para aplicaciones biotécnicas

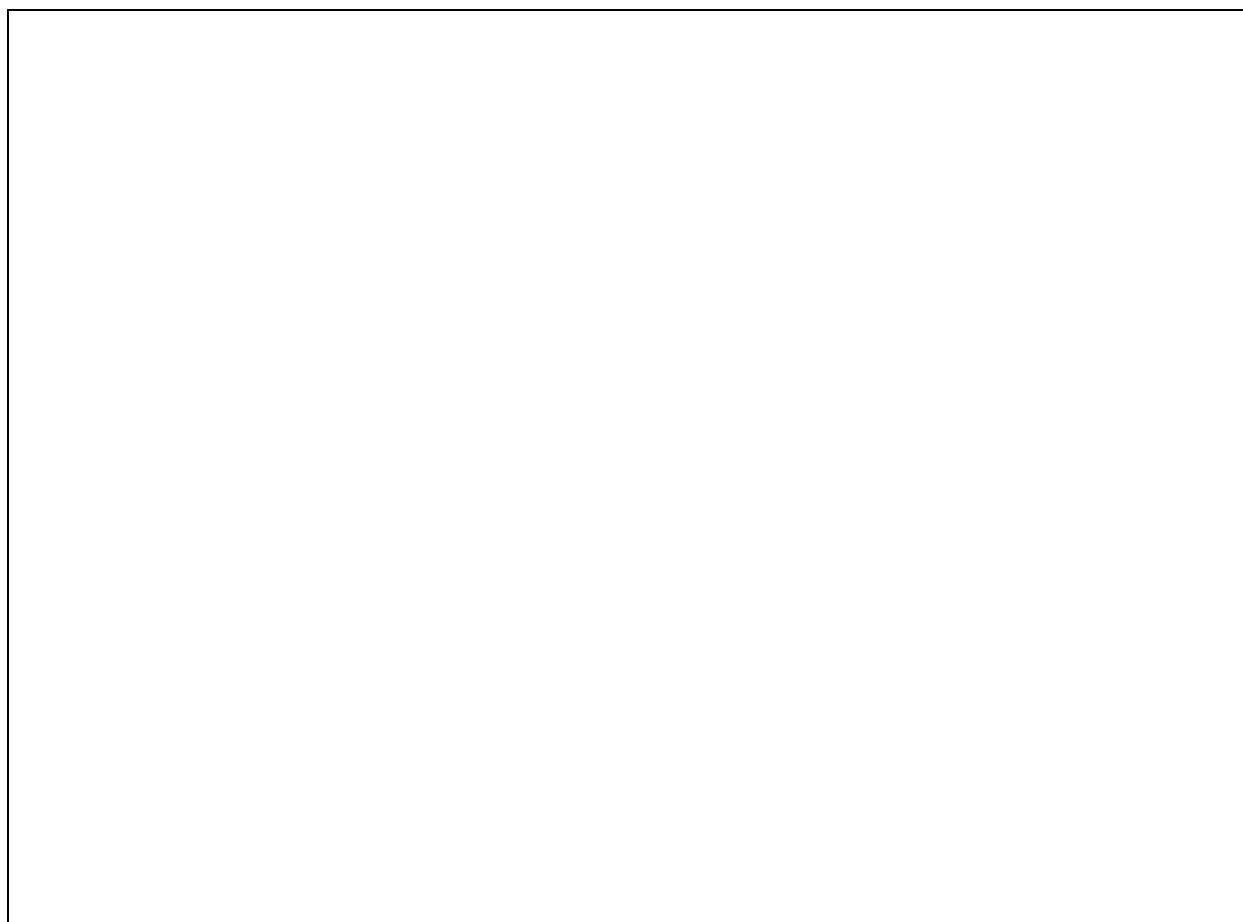
ACTIVIDADES DE COMPRENSIÓN

Para construir comprensión sobre los contenidos desarrollados en este capítulo se presentan actividades que permiten:

- Analizar metafases de diferentes especies animales (*Dicroplus sp.*, *Akodon sp.*, *Liolaemus sp.*, *Drosophila melanogaster*) al microscopio óptico (100x)
- Reconocer diferentes morfologías cromosómicas y escribir el cariotipo
- Reconocer anomalías cromosómicas que afectan la salud y la reproducción animal.

1. Observación al microscopio óptico

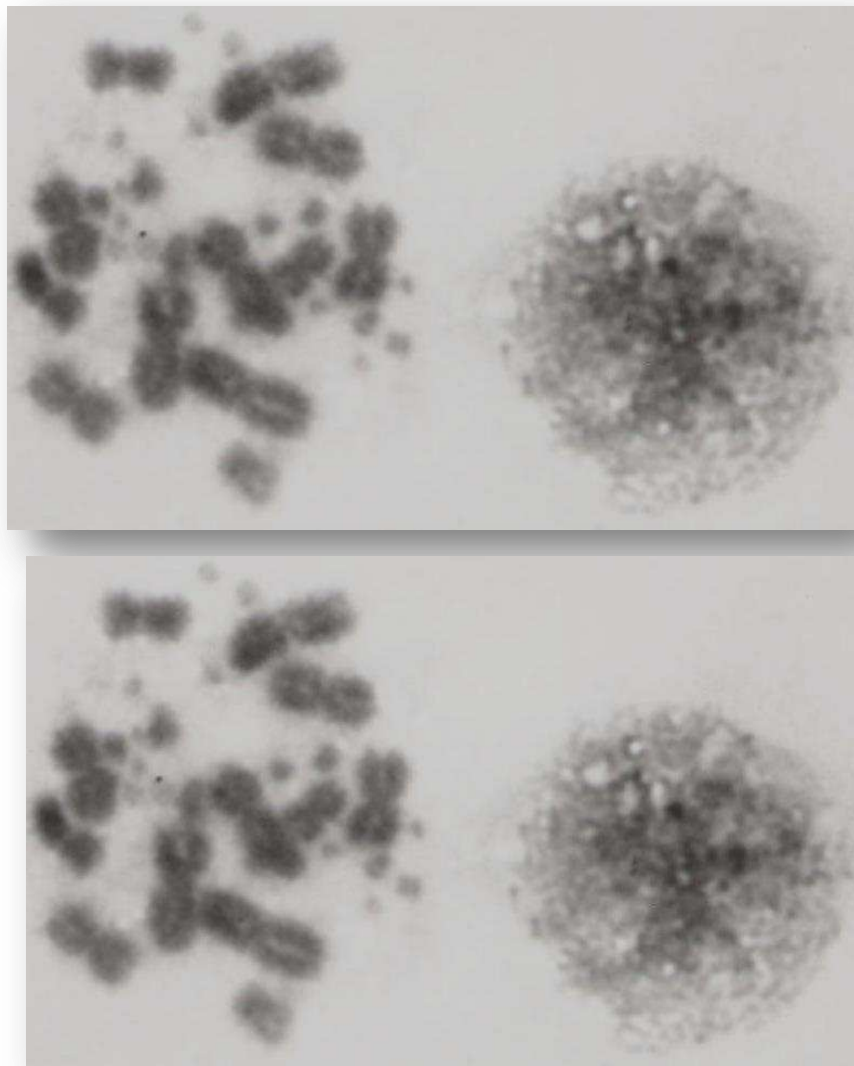
- a) Recorre en 40X el extendido cromosómico
- b) Analiza en 100X las metafases al microscopio
- c) Dibuja una metafase ocupando todo el espacio siguiente



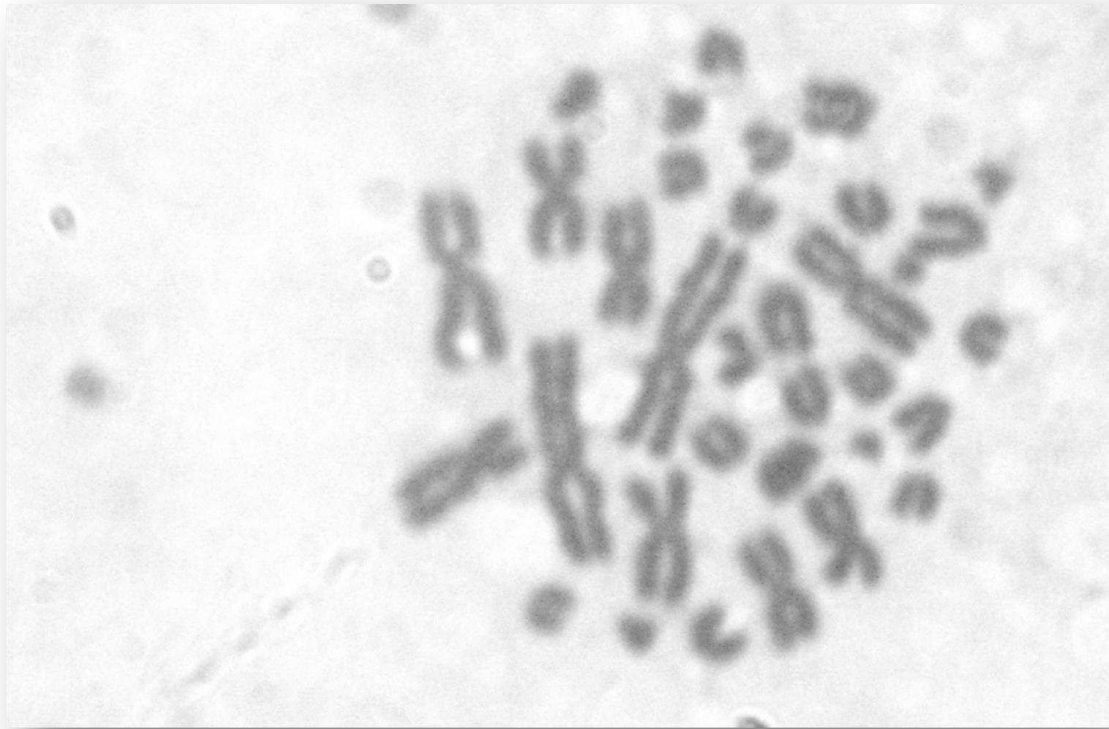
2. Armado de cariotipos

Cariotipo de dos vertebrados y un insecto con coloración convencional de Giemsa

- Arma todos los cariotipos siguiendo las siguientes indicaciones:
 - a) Recorta los cromosomas de cada metafase que se presentan en las fotos, a continuación, y ordénalos por tamaños de manera decreciente en el esquema que encuentras para cada género.
 - b) Realiza las mediciones cromosómicas y obtiene r e i – reubícalos en el esquema si es necesario
 - c) Asígnale la morfología cromosómica a partir de las mediciones y escríbela arriba de cada par cromosómico



Metafases de un ejemplar de lagarto *Liolaemus quilmes* ($2n= 32$).
(Foto: D. Aiassa, 2004).



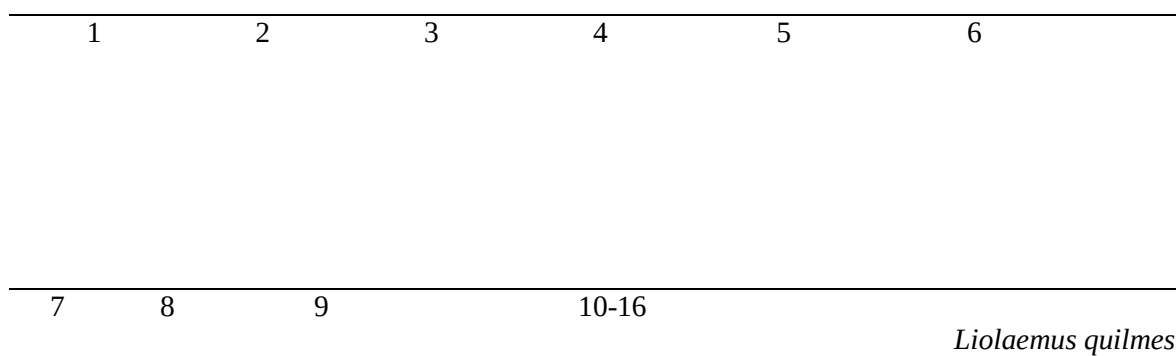
Metafase de un ejemplar de ratón *Akodon sp.*

Foto: Laura Peralta, 2009.

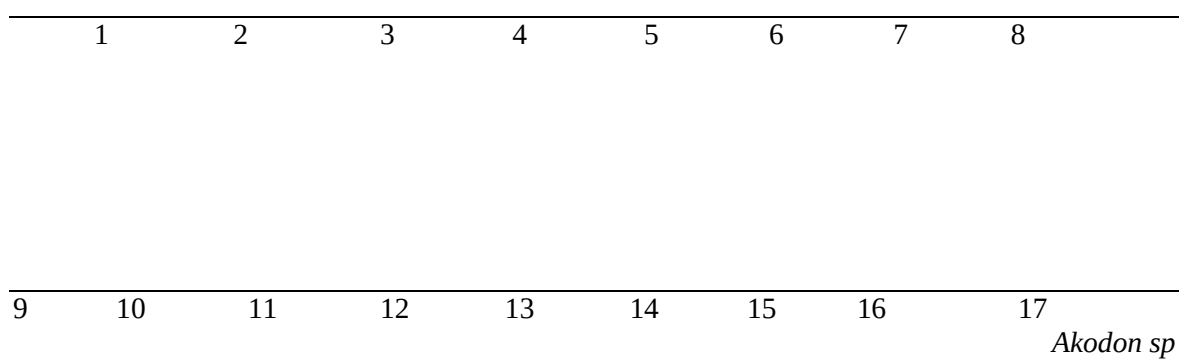


Metafase de *Drosophila*

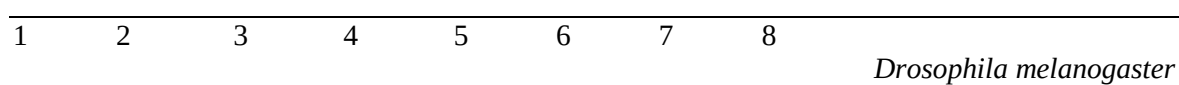
Esquema para armar un cariotipo de *Liolaemus sp.*



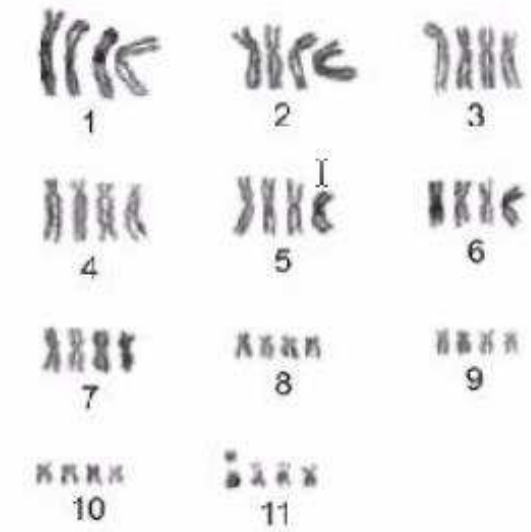
Esquema para armar un cariotipo de *Akodon sp.*



Esquema para armar un cariotipo de *Drosophila melanogaster*



3. Interpretación

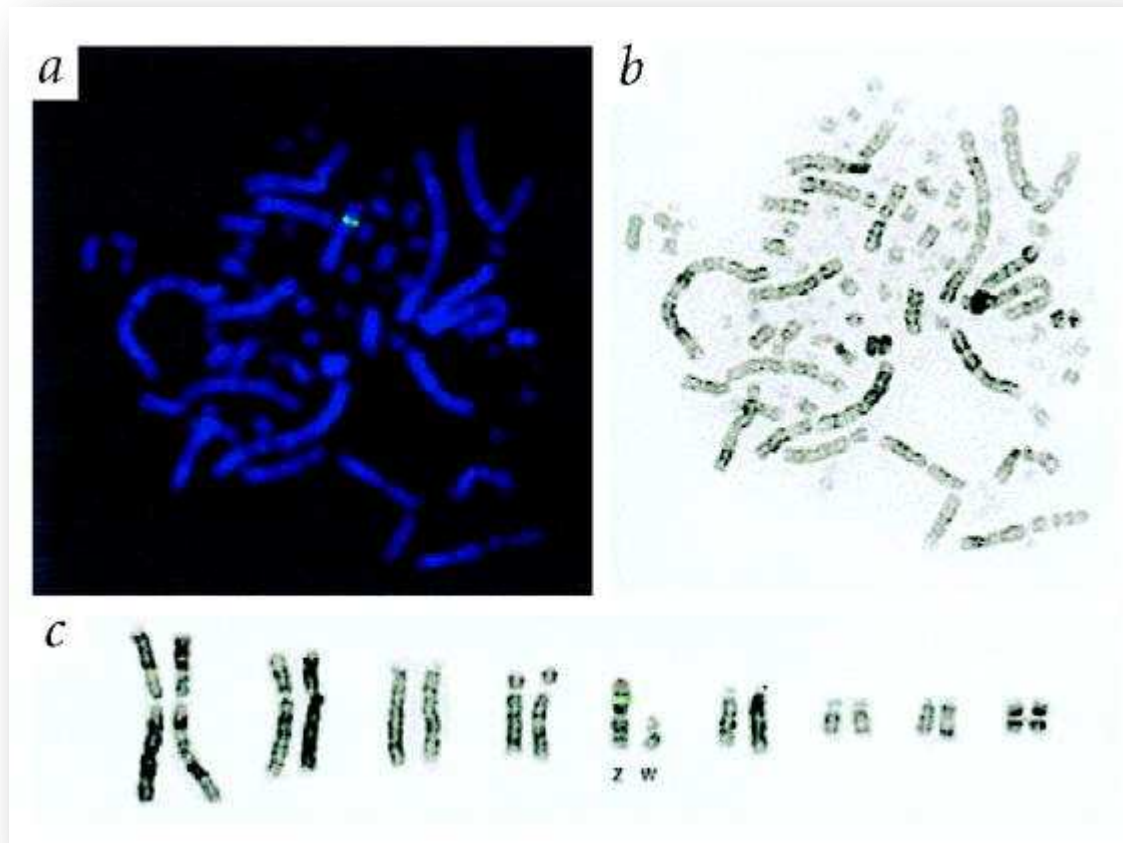


Cariotipo de Escuercito (*Odontophrynus americanus*)
especie tetraploide. Foto: Sergio Rosset

- Observa el cariotipo precedente: ¿Qué característica lo distingue de los observados hasta ahora? Escribe el cariotipo. Escribe el cariotipo de una gameta de este animal.
- Observa los cariotipos armados y el de *Odontophrynus americanus*:
 - a) Cuántos cromosomas en total aparecen en cada metafase cariotipada?
 - b) ¿Qué morfología presentan los cromosomas?
 - c) ¿Cuántos cromosomas se observan de cada homólogo?
 - d) ¿Cuántos cromosomas habrá en una gameta de cada especie?
 - e) ¿Qué sistema de determinación sexual se observa en las metafases de las especies animales en las que realizaste el cariotipo?
- Escribe en la tabla el cariotipo correspondiente a cada especie:

Organismo	CARIOTIPO
<i>Homo sapiens</i> (hombre)	
<i>Alouatta caraya</i> (mono aullador)	
<i>Drosophila melanogaster</i>	
<i>Gallus domesticus</i> (gallo)	
<i>Rhinella arenarum</i> (sapo común)	

- Las siguientes imágenes muestran fotografías de metafases y cariotipo de *Gallus domesticus*. En a y b se observan metafases de una gallina doméstica que consta de nueve pares de macrocromosomas y treinta pares de microcromosomas, a contratinción con DAPI, c: cariotipo, nueve pares de macrocromosomas con Bandas G. Observa las imágenes detenidamente y luego responde los interrogantes que tienes a continuación de las mismas.



CARIOTIPO TOMADO de Nanda *et al.*, 1999.

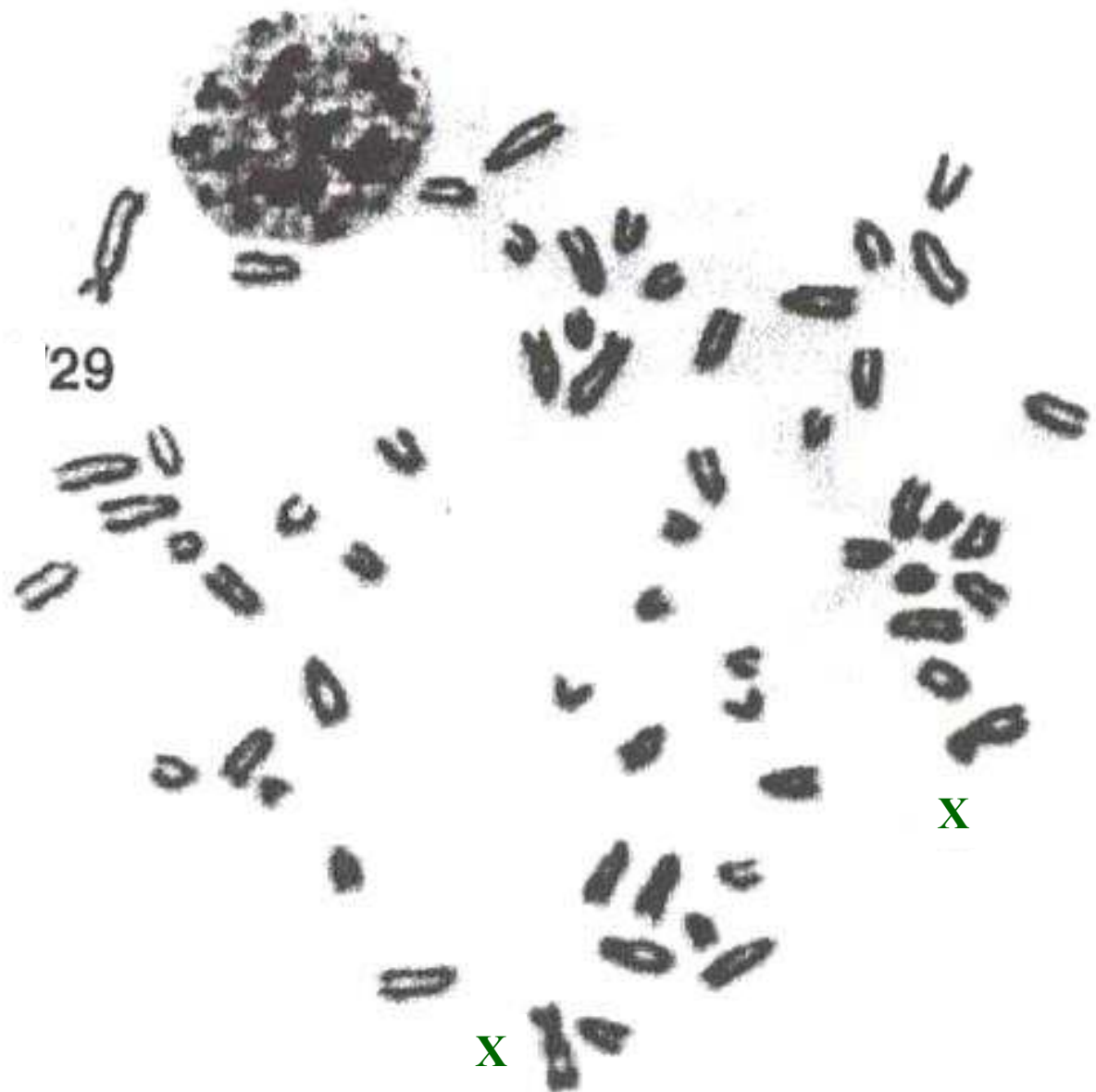
- Considerando que en las aves y algunos reptiles el sexo masculino es homogamético, indica si el cariotipo corresponde a un macho o de una hembra de la especie.
- En a) el Punto fluorescente corresponde al gen DMTR1 en el cromosoma Z. En mamíferos el producto génico DMTR1 es crítico en el camino de formación de testículos iniciados por el SRY. Dos copias de DMTR1 son necesarias para el desarrollo testicular, aun en presencia de SRY. De acuerdo a lo expuesto. ¿El gen DMTR1 en

mamíferos está en un cromosoma sexual o autosómico?, ¿Las aves macho tienen una o dos copias de DMTR1? Las aves hembra tienen una o dos copias de DMTR1?

- Las dos alteraciones cromosómicas principales que se detectan en bovinos y que están relacionadas con disminución de la capacidad reproductiva son: la traslocación 1/29 y freemartin.

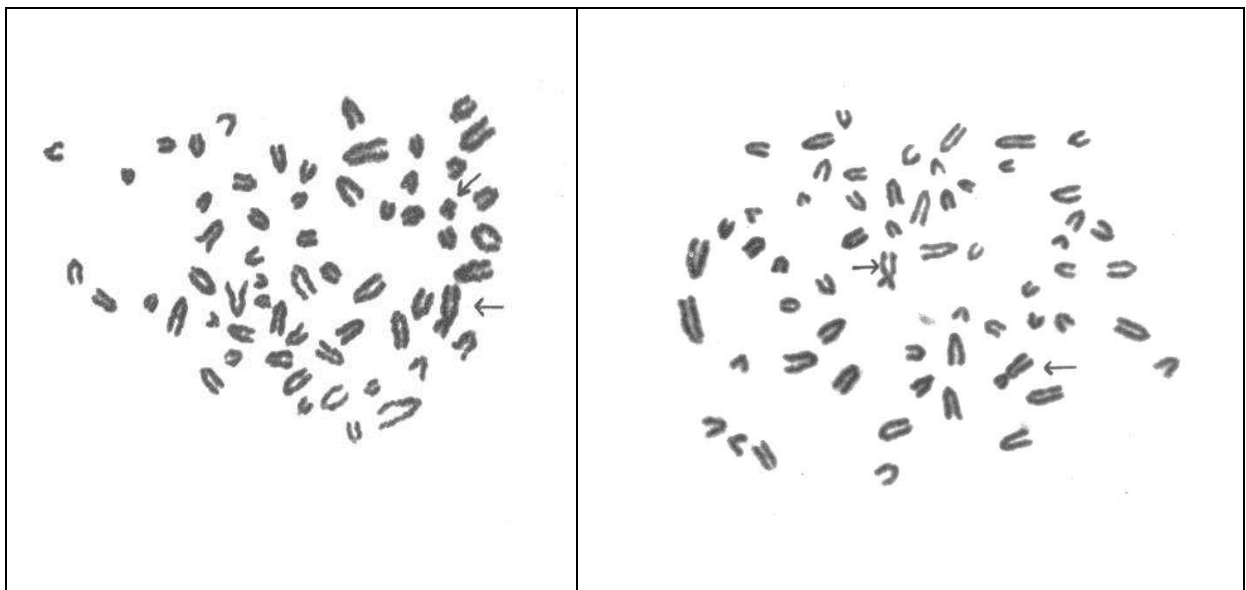
a) A continuación se presenta una imagen de una metafase de un bovino

- * identifica con una flecha la fusión robertsoniana entre los cromosomas 1 y 29
- * escribe el cariotipo de este animal
- * indica la morfología de cada par cromosómico



**Metafase
de un
bovino
con
traslocac
ión 1/29**
(IMAGEN
TOMADA
de
Nicholas
1996)

- Las imágenes que se muestran a continuación son metafases presentes en un mismo animal freemartin.
- a) ¿Cuál es el número total de cromosomas de cada metafase? ¿Qué señalan las flechas?
 - b) Escribe el cariotipo de este animal.
 - c) Escribe un texto argumentativo indicando si el freemartinismo es una quimera o un mosaico. Distingue ambos términos. Da ejemplos de ambas situaciones.



Metafases de un bovino con freemartinismo
(IMAGEN TOMADA de Nicholas 1996)

- De la siguiente Tabla 1. de Aberraciones Cromosómicas en Animales (Nicholas, 2011)
- a) Elije 2 especies animales de tu interés. Marca con un círculo las alteraciones cromosómicas que se han observado en la especie.
 - b) ¿Son aberraciones cromosómicas numéricas, estructurales o ambas?

c) ¿Qué manifestaciones clínicas presentan, a grandes rasgos, esas alteraciones?

d) Escribe el cariotipo de esos animales con alteraciones.

Tabla 1. Aberraciones cromosómicas estructurales y numéricas encontradas en animales domésticos (Tomada y modificada de Nicholas, 2011)

ANEUPLODIA DE CROMOSOMAS SEXUALES	Animales
XO	Búfalos, gatos, perros, cerdos, caballos, ovejas, zarigüeyas, llamas
XXX	Toros, perros, caballos, búfalos.
XXY	Gatos, toros, perros, cerdos, ovejas, caballos
XXXY	Caballos, cerdos
XXXXY	Caballos
ZZW	Pollos
ANEUPLODIA DE CROMOSOMAS AUTOSÓMICOS	
Trisomía 12, trisomía 16, trisomía 17, trisomía 18, trisomía 20, trisomía 22, trisomía 23 y trisomía 24	Toros
Trisomía 14	Cerdos
Trisomía 15	Pollos
Trisomía 23, trisomía 26, trisomía 28 y trisomía 30.	Caballos
Trisomía 15	Pollos
POLIPLOIDIA	
Triploidía	Pollos, truchas
Tetraploidía	Pollos, monos, truchas
TRASLOCACIONES RECÍPROCAS	
1/8/9, 8/13, 8/15, 10/11, 20/24, Y, 17, X/23,	Toro
1/4, Z/1, Z/microcromosoma	Pollo
1/3	Caballo
1/6, 1/7, 1/8, 1/11, 1/14, 1/15, 1/16, 1/17, 2/4, 2/4/15, 2/14, 3/7, 4/13, 4/14, 5/8, 5/14, 5/15, 6/14, 6/15, 7/11, 7/12, 7/13, 7/17, 8/14, 9/11, 11/15, 13/14, 13/17, 14/15, 15/16, 16/17, X/13, X/14	Cerdo
1/20, 13/20, 23/24	Oveja
TRASLOCACIONES EN TANDEM	
1/16, 1/18, X/23	Toro
X/15, 1/30	Caballo
TRASLOCACIONES por FUSIÓN CENTRICA	
23/24	Zorro azul
1/4, 1/21, 1/23, 1/26, 1/28, 1/29 , 2/4, 3/27, 4/4, 4/8, 5/18, 5/23, 5/26, 6/28, 7/12, 7/21, 8/9, 9/23, 11/21, 11/22, 13/21, 14/20, 14/21, 14/28, 15/25, 16/18, 21/27, 27/29	Toro
1/31, 13/23, 21/23	Perro
5/15, 6/15	Cabra
1/20, 6/26, 7/25, 8/11	Oveja
1/31, 13/23, 21/23	Perro
17/19	Oriz

FISIÓN CENTRICA	
3	Burro
DELECIÓN	
X	Caballo
INSERCIÓN	
16	Toro
19	Oveja
INVERSIÓN PARACENTRICA	
8	Cerdo
INVERSIÓN PERICENTRICA	
14, X	Toro
2	Pollo
ISOCROMOSOMA	
Y	Toro
X	Caballo
REVERSIÓN DEL SEXO	
Machos XX	Perro, cabra, caballo, llama, cerdo
Hembras XY	Gato, toro, caballo, oveja, lemming
SITIO FRÁGIL	
Sitio frágil	Búfalo, gato, toro, perro, cabra, caballo, cerdo, conejo, oveja

- La propagación artificial de truchas y otros salmónidos comenzó en Argentina a principios de este siglo. Actualmente pueden utilizarse peces triploides estériles que no dejan descendencia.

a) Abajo se presenta el idiograma de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*)

Indica el 2n de la especie, y el número de cromosomas de truchas triploides y tetraploides.

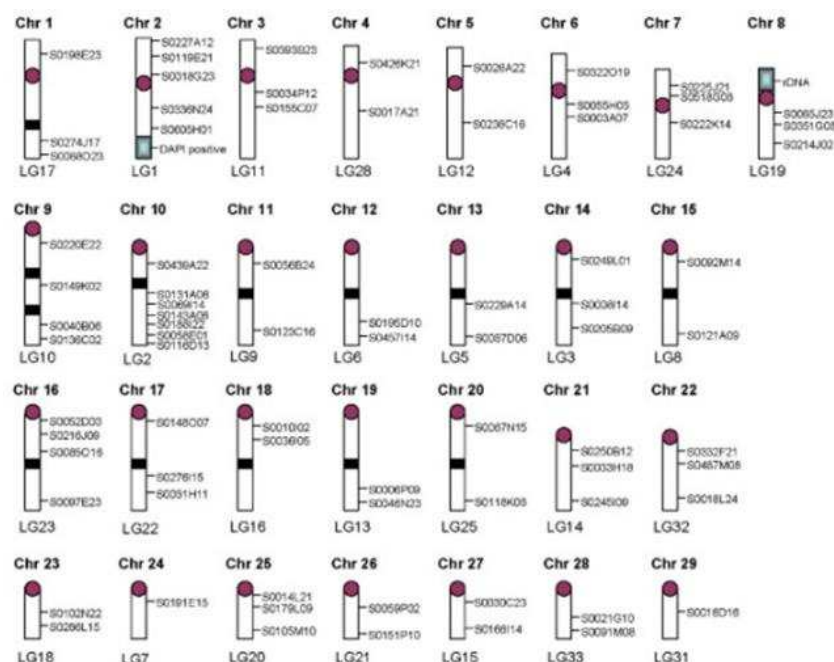


IMAGEN TOMADA de http://www.antibodyreview.com/protein_image_annot.php

- Observa detenidamente el siguiente gráfico donde AquAdvantage Salmon es el Salmón del Pacífico triploide y Standard Salmon es la especie diploide. Deduce y explica ¿cuál es la importancia de obtener peces poliploides?

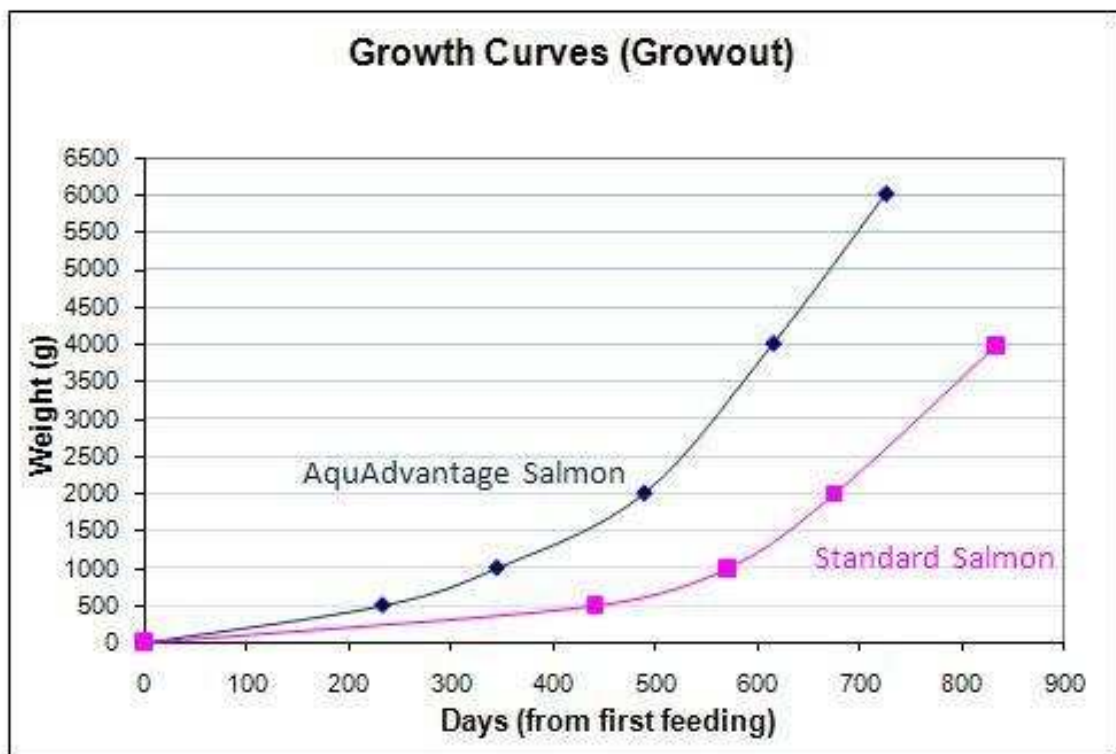


IMAGEN TOMADA de <http://www.aquabounty.com/products/products-295.aspx>

- Elige de Internet un trabajo científico de tu interés con los siguientes requisitos:
 - *realizado en animales domésticos, de compañía o de producción,
 - *que presente la figura de un cariotipo confeccionado para el animal o los animales en estudio
 - *desarrollado no más de cinco años atrás
 - *escrito en idioma inglés o español.

A continuación realiza las siguientes actividades:

- a) Escribe la cita completa del trabajo: autores, título, revista, volumen, páginas, copia y pega la URL del trabajo (para que los docentes podamos localizarlo fácilmente)
- b) Indica el problema que dio origen a este trabajo. ¿El trabajo aborda un tema local-regional de los autores, o tiene aplicación universal? ¿En la clínica animal? ¿En biodiversidad? ¿En salud pública? ¿En reproducción?
- c) Relata brevemente la metodología que los autores eligieron para abordar el problema, materiales usados, técnicas, equipos necesarios. ¿Son métodos citogenéticos o citomoleculares?
- d) Describe el cariotipo: número y morfología cromosómica, presencia o no de bandas, presencia o no de alteraciones. Indica si los hallazgos tendrán repercusión económica
- e) ¿Se han generado conocimientos nuevos? ¿Cuáles?
- f) Si formarás parte de ese equipo de investigadores ¿Que propondrías hacer a continuación de este trabajo? sea en el área de la citogenética o no.

Bibliografía de consulta

1. Aiassa, D., N. Gorla, L. Avila y R. Martori. 1999. Cariotipo de *Liolaemus darwini* (Squamata: Tropiduridae)., Facena 15, 137-144, 1999.
2. Aiassa, D., N. Gorla, L. Avila y R. Martori. 2001. Cariotipo de *Liolaemus koslowsky* Etheridge, 1993. Nuevo número cromosómico para el género ($2n= 36$). Revista Española de Herpetología 15:37-43, 2001.
3. Aiassa, D., N. Gorla, L. Avila y R. Martori. 1998. Cariotipo de *Liolaemus saxatilis* (Squamata: Tropiduridae) y comparacion con otros taxones del grupo chilensis, Revista Española de Herpetología 12: 63- 67, 1998.
4. Aiassa, D., N. Gorla, L. Avila y R. Martori. 2002. Karyotype of *Liolaemus uspallatensis* Macola and Castro, 1982: The smallest chromosome number of the genera and its comparison with other taxa. Amphibia- Reptilia 23: 353-358
5. Aiassa D; R Martori y N Gorla. 2005. Citogenética de los lagartos del género *Liolaemus* (Iguania: Liolaemidae) de América del sur. Cuadernos de Herpetología, 18(2):23-36.
6. Aiassa, D. y N. Gorla, Karyotypes of *Liolaemus quilmes* and *wiegmanni* (boulengeri group) and possible chromosome changes within the group, Multequina 19: 43-52, 2011.
7. Aiassa, D. 2004. Diversidad cromosómica en lagartos del género *Liolaemus* (Iguania, Liolaemidae). Tesis de doctorado, Fac. de Cs. Exactas, Físico-Químicas y Naturales. UNRC.
8. Ayala, F.J. y J. A. Kiger. 1984. Genética Moderna. Ed. Omega.
9. Bueno, M. L. y T. Defler. 2010. Aportes citogenéticos en el esclarecimiento de la taxonomía del género *Callicebus*. Orinoquia 14: 139-152.
10. Cuervo, P., M. Quero y N. Gorla. 2011. Conocimiento citogenético de las aves de Argentina, Ornitología Tropical, 22: 517-537.
11. Ferre D., E. R. Steinberg, L. Albarracín, A. Pedrosa, V. Hynes, A. Duarte, M. Mudry y N. Gorla. 2011. Utilización de variables citogenéticas y antropométricas para un eficiente manejo de primates neotropicales en cautiverio. InVet, 11. 99-103.

12. Giovambattista G, P. Peral García. 2010. Genética de animales domésticos, Intermédica, Buenos Aires.
13. Gozalo, A, E. Montoya y J. Descailleaux. 1993. Estudio cariotípico en el mono nocturno "*huri huri*" (*Aotus vociferans*) (Primates:Cebidae). Investigaciones pecuarias 6: 38-40.
14. Ianuzzi, L. y D. Di Bernardino. 2008. Tools of the trade: diagnostics and research in domestic animal cytogenetics. *Journal of Applied Genetics*,49: 357-366.
15. ISCND 1990, International System for Cytogenetic Nomenclature of Domestic Animals (1989), *Cytogenetics and cell Genetics* 53: 65-79.
16. Long, S. 2006. Veterinary genetics and reproductive physiology, Butterworth Heinemann. Elsevier, China.
17. Nicholas, F. W. 1996. Introducción a la Genética Veterinaria. Editorial Acribia S.A.
18. Nicholas, F. W. 2011. Introduction to Veterinary Genetics. Ed Wiley Blackwell, Singapore.
19. Nieves, M., G. Mendez, A. Ortiz, M. Mühlmann y M. D. Mudry. 2008. Karyological diagnosis of *Cebus* (Primates, Platyrrhini) in captivity: Detection of hybrids and management program applications. *Animal Reproduction Science* 108: 66-78.
20. Robinson, W. P. y D. E. McFadden. 2001. Chromosomal genetic disease: numerical aberrations. En: *Encyclopedia of life sciences*. (ed) eLs, Germany.
21. Rubes J, P Musilova y G. F. Mastromonaco. 2008. Cytogenetics of wild captive bred non domestic animals. *Cytogenetics Genome* 120:61-68.

8 CITOGENÉTICA HUMANA

Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética

Hay literalmente gran cantidad tipos de variaciones en los cromosomas. Si un individuo tiene una variación cromosómica a través del Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética se expresa exactamente cuál es. A continuación están varios de los códigos más frecuentemente usados en la nomenclatura estándar. En 1960 tuvo lugar el primer encuentro internacional donde se propuso un sistema estándar de nomenclatura para los cromosomas. Desde este momento este método de describir cromosomas y las anormalidades cromosómicas ha sido revisado e incrementado varias veces. Esto ha producido una Nomenclatura Citogenética Standard Internacional (ISCN, 2009). Esto permite a un laboratorio “escribir” el resultado de la observación de los cromosomas. Cualquier otro laboratorio reconocerá lo que ellos han encontrado sin buscar en el cariotipo.

Aquí hay algunos ejemplos:

► 46,XX – Cariotipo femenino.

► 46,XY – Cariotipo masculino.

Estas descripciones indican que hay 46 cromosomas y que es una mujer o un hombre.

► 46,XX,del(14)(q 23)

Mujer con 46 cromosomas con una delección del cromosoma 14 en el brazo largo (q) en la banda 23.

► 46,XY,dup(14)(q22 q25)

Hombre con 46 cromosomas con una duplicación del cromosoma 14 en el brazo largo (q) comprometiendo bandas de la 22 a la 25.

► 46,XX,r(7)(p22q36)

Mujer con 46 cromosomas con un “anillo”. El final del brazo corto (p22) se ha fusionado (unido) con el final del brazo largo (q36) formando un círculo o “anillo”.

47,XY,+21

Hombre con 47 cromosomas en lugar de 46 y el cromosoma extra es un 21 (Síndrome de Down).

- del = Delección
- de novo = Una anomalía cromosómica que no ha sido heredada.
- der = Cromosoma derivado.
- dup = Duplicación
- fra = Espacio Frágil
- ins = Inserción
- inv = Inversión
- M = Marcador cromosoma
- Mat = Origen materno
- signo menos (-) = Pérdida
- Mos = Mosaicismo
- p = Brazo corto del cromosoma
- Pat = Origen paterno
- signo más (+) = Ganancia
- q = Brazo largo del cromosoma
- r = Cromosoma circular
- rea = Reorganización
- rob = Translocación Robertsoniana
- t = Translocación
- tel = Telómero
- upd = Disomía Uniparental
- ¿? = Incierto
- [] Cantidad de células estudiadas

Los estudios genéticos que consisten en el estudio de los cromosomas (estudio citogenético) o de los genes (estudio molecular) se diferencian de los análisis clínicos habituales en que sus resultados son invariables en el tiempo, y por ello se realizan tan sólo una vez. Permiten la confirmación diagnóstica en personas con sospecha clínica de la enfermedad genética, predecir el riesgo de padecer enfermedades genéticas y los resultados son de gran valor para establecer asesoramiento genético al paciente o a sus familiares sobre forma de herencia, las implicaciones de la enfermedad, riesgo genético.

Especialidades médicas y diagnóstico citogenético

El diagnóstico genético asiste a todas las especialidades médicas: neonatología, pediatría, neurología, medicina interna, obstetricia, ginecología, urología, otorrinolaringología, endocrinología, oncología, clínica médica y otras.

Especialidad	La realización de estudios genéticos se recomienda en los siguientes casos
NEONATOLOGÍA	Malformaciones mayores aisladas Presencia de 3 o más defectos congénitos menores Recién nacido con rasgos dismórficos Recién nacido con microcefalia Recién nacido con genitales ambiguos Muerte neonatal de causa inexplicada Linfoedema Recién nacidos con trastornos respiratorios Cardiopatías congénitas
PEDIATRÍA	Niños con dificultades para el aprendizaje Rasgos dismórficos Retraso psicomotor Trastornos del crecimiento Anemia severa durante el primer año de vida Niños con trombosis arterial
NEUROLOGÍA	Retraso mental Trastornos en el desarrollo
MEDICINA INTERNA/ CARDIOVASCULAR	Cardiopatías congénitas Mujeres con menos de 50 años, fumadoras, con historia de infarto de miocardio o accidente vascular cerebral Evaluación de paciente que van a ser sometidos a cirugía mayor.
GASTROENTEROLOGÍA	Disfunciones hepáticas Trastornos gastrointestinales de causa desconocida
REPRODUCCIÓN (obstetricia, ginecología, urología)	Digenesia gonadal Azoospermia Amenorrea Preeclampsia, eclampsia Aborto espontáneo recurrente o de causa desconocida Padres de niños con anomalías cromosómicas Familiar con anomalías cromosómicas Infertilidad inexplicable

	Parto con producto muerto de causa inexplicable Varones que posean obstrucción epididimaria, idiopática o agenesia de los conductos deferentes Ginecomastia Falta de desarrollo puberal Evaluación de mujeres antes de iniciarse una terapéutica contraceptiva Amenorrea primaria o secundaria Muerte del neonato en las últimas etapas del embarazo Donadores de esperma y óvulos
OTORRINOLARINGOLOGÍA	Sorderas Labio leporino Paladar hendido
ENDOCRINOLOGÍA	Ginecomastia Falta de desarrollo puberal Amenorrea primaria o secundaria Hipogonadismo hipogonadotrópico
ONCOLOGÍA	Leucemias Neoplasias
CLÍNICA MÉDICA	Rasgos dismórficos Exposición a radiaciones y/o químicos genotóxicos Genotoxicidad ocupacional Historia de trombosis venosa profunda, embolismo pulmonar y trombosis de venas cerebrales. Evaluación de paciente que van a ser sometidos a cirugía mayor Pacientes con tiempo de sangría y coagulación prolongadas.

Anomalías cromosómicas humanas

El número de posibilidades de anomalías cromosómicas es casi infinito siendo los hallazgos más frecuentes encontrados en un laboratorio de citogenética los siguientes:

ANEUPLOIDIAS: cantidad de cromosomas superior o inferior a la normal:

- **Síndrome de Down:** En el 95% de casos, el Síndrome de Down se produce por una **trisomía del cromosoma 21** generalmente como consecuencia de una no disyunción meiótica en el óvulo. Aproximadamente un 4% se debe a una **translocación** entre el cromosoma 21 y otro cromosoma que normalmente es el 14 o el 22. Ocasionalmente puede encontrarse una translocación entre dos cromosomas 21. Por último un 1% de los pacientes presentan un mosaico, con cariotipo normal y trisomía 21. No existen diferencias fenotípicas entre los diferentes tipos citogenéticos de Síndrome de Down.

La realización del cariotipo es imprescindible para realizar un adecuado asesoramiento genético dado que el riesgo de recurrencia depende del cariotipo del paciente.

- **Síndrome de Patau:** El síndrome de Patau es originado por una trisomía del cromosoma 13. La supervivencia es escasa, pocos llegan a cumplir el año de vida y junto a las distintas malformaciones siempre hay un retraso psicomotor severo.

Es fundamental la realización del cariotipo, ya que en los casos en que no se debe a una trisomía regular, sino a una translocación, se dará consejo genético (para conocer los riesgos de que pueda volver a darse en embarazos futuros) se sugiere firmemente la realización del cariotipo a los padres para poder estimar el riesgo de recurrencia.

- **Síndrome de Edwards:** Este síndrome se debe a la trisomía de toda ó gran parte del cromosoma 18. El 95-96% de casos corresponden a trisomía completa, siendo el resto trisomía por translocación. La trisomía parcial y el mosaicismo para trisomía 18 suelen presentar un fenotipo incompleto, con ausencia de algunas de las anomalías típicas del S. de Edwards.

Es fundamental la realización del cariotipo, ya que en los casos en que no se debe a una trisomía regular, sino a una translocación, se dará consejo genético (para evitar que pueda volver a darse en embarazos futuros). se sugiere firmemente la realización del cariotipo a los padres para poder estimar el riesgo de recurrencia.

- **Síndrome de Turner (45,X)** Este síndrome se debe a la ausencia total o parcial de un cromosoma X. El 50-60% de los pacientes con Síndrome de Turner tienen un cariotipo 45,X. El resto, presentan cambios estructurales de uno de los cromosomas X o, más frecuentemente, un mosaicismo. El 10-25 % de los recién nacidos presentan en el período neonatal, linfodema de manos y pies con pliegues cutáneos laxos en parte lateral y posterior del cuello (pterygium colli). Los lactantes pueden presentar soplo cardíaco y de coartación o estenosis aórtica. En la infancia, el signo principal es la talla baja y teniendo en cuenta la variabilidad fenotípica del síndrome, éste debe ser evocado ante cualquier niña con talla baja inexplicable. El diagnóstico ante toda niña con pubertad retrasada (falta de inicio de desarrollo de las mamas para la edad de 13 años) es fundamental.

Cuanto antes se diagnostique la alteración, antes podrá la niña ser tratada por su médico especialista. Implicará que podrá ser tratada con hormona de crecimiento y con hormonas sexuales cuando el médico lo crea oportuno.

El síndrome de Klinefelter (47,XXY) lo padecen aproximadamente la tercera parte de los hombres con una producción espermática baja o ausente. Éste puede presentarse en mosaicismo, siendo asintomático hasta que aparecen problemas de infertilidad, falta de libido sexual.

- **Condición 47,XXY** puede presentar azoospermia u oligospermia severa.
- **Varones XX/ Mujeres XY:** los varones si bien presentan cariotipo 46,XX tienen fenotipo masculino y las mujeres XY tienen fenotipo femenino. El gen SRY (implicado en la diferenciación testicular) está ausente o no es funcional.

DELECIONES: falta parte de un cromosoma o de ADN, de forma terminal o intersticial, puede ser una cantidad casi imperceptible hasta una proporción importante del brazo cromosómico.

En nacidos vivos la deleción más frecuente y estudiada, es la conocida como Síndrome de Cri du Chat "Grito de gato", consiste en una pérdida de ADN del brazo corto del cromosoma 5.

Las principales características son: microcefalia, raíz nasal plana, paladar hendido, orejas bajas, pliegues simiescos, y los rasgos comunes a todos los casos van desde la peculiar forma de la cara al llanto característico de la primera infancia. Los niños se desarrollan lentamente y permanecen muy retrasados en cuanto a su psicomotricidad. Esta deleción cursa con un retraso mental severo. La semejanza del llanto del niño con el maullido del gato es debido a que en la deleción está involucrada una proteína de la estructura de la laringe.

INVERSIONES: un cromosoma se rompe y la parte del cromosoma que se desprende se invierte y se vuelve a insertar. Las inversiones pueden causar defectos congénitos o no, según su estructura exacta. Las consecuencias de su presencia pueden ser diferentes según involucre o no el centrómero.

TRANSLOCACIONES: o rearrreglo del segmento de un cromosoma de una ubicación a otra, ya sea dentro del mismo cromosoma o en otro. Se calcula que en el 5% de las parejas con 2 ó más pérdidas fetales tempranas uno de los miembros de la pareja tiene una **translocación**

balanceada en alguno de sus cromosomas. Las personas con este tipo de translocaciones son asintomáticas, pero tienen un alto riesgo de transmitir una anomalía cromosómica a su descendencia. Una translocación frecuente en nacidos vivos es el Síndrome de Down “familiar”. En esta variante el cromosoma 21 extra (o un fragmento del mismo) se encuentra “pegado” a otro cromosoma (frecuentemente a uno de los dos cromosomas del par 14), por lo que a pesar de tener un cromosoma extra o trisomía el número total de cromosomas es 46.

MOSAICISMOS: presencia de dos o más patrones cromosómicos en las células de un individuo, que origina dos o más líneas celulares (por ejemplo, algunas con 46 cromosomas y otras con 47). Existen **síndromes cromosómicos** que cursan sin síntomas aparentes cuando se encuentran en mosaicismo. Esta condición deriva en la falta de diagnóstico hasta (que la pareja consulta por infertilidad). Ejemplos de estos casos son el mosaico de **síndrome de Turner** (45,X/46,XX) o la condición **de triple X** (47,XXX/46,XX), **Disgenesia gonadal:** (45,X/46,XY y otros) donde el 16% de los casos presentan un fenotipo masculino normal. Es importante detectarlos, ya que están asociados a un alto riesgo de tener hijos con anomalías cromosómicas.

Normatizaciones para los laboratorios de Citogenética

La Sociedad Argentina de Genética Médica (Miembro de International Federation of Human Genetics Societies) ha establecido **Normatizaciones en Citogenética Clínica para los laboratorios de Argentina**, las que se presentan a continuación:

Normatización en los Laboratorios de Genética en la Argentina. (parte general) 1997.

I. Consideraciones generales

- 1) Finalidades
- 2) Requerimientos mínimos
- 3) Variaciones
- 4) Vigencia de esta norma
- 5) Autores

Finalidades. Estas normas se dictan para promover estudios citogenéticos correctos, precisos y confiables en el marco de las técnicas citogenéticas habitualmente disponibles en nuestro medio. Se entiende que están dirigidos a los citogenetistas clínicos y son de adhesión voluntaria.

Requerimientos mínimos. Se trata de criterios mínimos considerados aceptables.

Variaciones. Se reconocen variantes aceptables. En estos casos la exactitud y seriedad de estas variantes deben estar debidamente documentadas mediante validaciones internas y por la literatura pertinente.

Vigencia de estas normas. Estas normas sufrirán actualizaciones a intervalos de 1 año para mantener su vigencia en un campo de desarrollo acelerado como lo es la genética clínica. La Comisión de Citogenética Clínica compuesta por:

Dr. Isaac Aranda; Dra. Irene Larripa; Dra Graciela Del Rey; Dr. Roberto Coco; Dra. Marta Gallego; Dr. Tetsuji Matayoshi

Realizó la redacción de estas normas a pedido de Ministerio de Salud Pública canalizado a través de la Sociedad Argentina de Genética Médica de AMA.

I. Condiciones generales:

Recursos físicos.

Equipamiento temperatura dependiente.

Gabinete de cultivo celular.

Reactivos.

Libro de protocolo.

Terminología.

Nomenclatura.

Subcontratación.

Control y garantía de calidad.

Informe final.

Recursos Físicos. Superficie y equipamiento: cada laboratorio debe contar con espacio y equipamiento que aseguren un nivel aceptable de performance.

Equipamiento Temperatura Dependiente. Heladeras, freezers e incubadoras deben ser mantenidas a la temperatura óptima requerida para cada caso.

Dichas temperaturas deben ser monitoreadas a intervalos a determinar por el responsable del Laboratorio.

En incubadoras de atmósfera modificada se debe controlar:

- temperatura
- gases, semanalmente
- humedad, según criterio del responsable

Deben establecerse dentro del protocolo los procedimientos a seguir en caso de detectarse alguna anomalía

Gabinete de Cultivo Celular. Los gabinetes de bioseguridad *CLASE IIA* o *CLASE IIB* son las recomendadas para la manipulación de células, tejidos o fluídos. Flujo laminar de tipo horizontal es adecuado sólo para la preparación de reactivos.

- Células analizadas: son aquellas donde se evaluó individualmente cada cromosoma bandeado sea al microscopio, imagen digitalizada, o fotografía.

- Células cariotipadas: son aquellas donde se han recortado y apareado cada homólogo a partir de una fotografía o imagen impresa.

- Células contadas: son aquellas donde se ha constatado el número modal

- Colonia: es un foco de células que se cosecha y se tiñe *in situ*

- Clon: se considera como tal cuando existen como mínimo dos células con idéntica anomalía (hiperdiploide o con alteración estructural), o tres células (en caso que sea hipodiploide).

- Registro: debe consignarse todos los datos necesarios para ubicar a las células analizadas.

- Bando: deben estar capacitados para realizar técnica de bando G, R, Q, C, y NOR.
- Grado de resolución: nivel de 400 bandas será el mínimo requerido y de 550 bandas en caso de malformaciones, retardo mental, o abortos iterativos.
- Número de células a analizar: debe ser entre 15 y 20 como mínimo. Sin embargo se deberá adecuar para cada caso según criterio del responsable. La cantidad de células puede ser menor al criterio general establecido en caso de anomalía de tipo familiar o de escasez de material.

Nomenclatura. Se recomienda adoptar la nomenclatura establecida en *ISCN 1995*.

Subcontratación. Cualquier laboratorio podrá subcontratar otro/s en el caso de:

- exceso de caudal de trabas o
- necesidad de técnicas no disponibles en el laboratorio solicitante

En todos estos casos se recomienda aclarar en el informe final la identidad y responsabilidad del laboratorio subcontratado.

Control y garantía de calidad. Todos los laboratorios deben diseñar un programa de control y garantía de calidad de: reactivos, equipamiento, metodologías y el personal.

- Control sobre reactivos para cultivo de células, se debe ejercer básicamente sobre dos aspectos:
 - * contaminación
 - * eficiencia
- Lotes nuevos entrarán al circuito recién después de haber sido pre-testeados.
- Control del equipamiento: el responsable de cada laboratorio debe trazar y documentar un plan de control adecuado.

- Control de performance: se puede basar en dos indicadores mayores que son:

* duración del estudio

* tasa de fracasos

Sin embargo, es recomendable participar en por lo menos un programa de evaluación externa.

Informe citogenético. Debe contener como mínimo los siguientes datos:

Del paciente:

- Nombre y apellido

- Fecha de nacimiento

De la muestra:

- Fecha de recepción

- Código de identificación dado al ingresar

- Tipo de muestra

Del médico:

- Nombre y apellido

- Motivo del pedido o diagnóstico presuntivo

Del estudio:

- Número de células estudiadas (contadas, analizadas, cariotipadas)

- Técnicas aplicadas

- Cariotipo según *ISCN 1995*

- Interpretación del resultado

- Firma y sello del responsable

- Fecha

Datos que pueden ser incluidos:

- Nivel de resolución de bandas

- Fotocopia del cariotipo

- Referencia bibliográfica

- Iniciales de técnicos que intervinieron

- Polimorfismos

De tratarse de un estudio prenatal:

- método de cultivo
- riesgo sobre futuros embarazos
- ofrecer estudios prenatales para futuros embarazos
- recomendar asesoramiento
- no garantiza un feto normal
- no garantiza detección de microdelecciones

En el estudio de X frágil:

-tipo de medio o método usado.

Cáncer:

- informar todas las anomalías observadas o sólo aquellas con significado clonal
- pronóstico
- recomendar seguimiento

PRECAUCIONES**Incubadora**

Se recomienda disponer de por lo menos dos incubadoras totalmente independientes, ubicadas lejos de zonas de tráfico.

Área de cultivo

Se recomienda usar vestimenta adecuada para el trabajo de

- guardapolvo enterizo de frente, manga larga abrochada
- gorra
- barbijo
- guantes
- protección de calzados
- protección de ojos

Dispositivos destinados a los desechos deben estar ubicados lo más lejos posible del operador.

Lavado de mano: se debe efectuar lavado de mano higiénico:

- después de manipular muestras
- al concluir un procedimiento

- al quitarse guantes
- al salir del laboratorio

Decontaminación de superficies: Se recomienda realizar limpieza de superficies de área (incluido el gabinete) diariamente con lavandina al 10% o etanol 70%, manteniendo fuente de radiación UV germicida encendida mientras no se encuentre operando.

Droguero

- Todo el material debe ser fechado al llegar.
- Se recomienda almacenar la mínima cantidad indispensable dentro del laboratorio.
- Sustancias corrosivas deben almacenarse en los estantes inferiores o gabinetes especiales.
- Los inflamables deben permanecer en envases adecuados en gabinetes especiales.

MUESTRA

1. **Datos que deben acompañar la muestra**
2. **Ingreso de la muestra**
3. **Envíos**
4. **Conservación**

Datos que deben acompañar la muestra

De la muestra:

Fecha y hora de obtención. Tipo de tejido: sangre periférica, líquido amniótico, vellosidades coriales, médula ósea, tejido sólido, otros.

Del paciente:

Apellido y nombre

Edad

Sexo

Domicilio y teléfono

Diagnóstico presuntivo y resumen de la historia clínica (conseguir antecedentes de la transfusión, rayos, medicación, infecciones)

Del médico a cargo:

Nombre y apellido

Institución y teléfono

Ingreso de la muestra al laboratorio

Deben registrarse fecha y hora de ingreso de la muestra al laboratorio junto con todos los datos que la acompañan. Se le dará inmediatamente un código de identificación del laboratorio.

Envío

Se podrá enviar la muestra el mismo elemento con que se efectuó la obtención, debidamente protegida y acondicionada. Se debe tratar de garantizarla llegada al laboratorio de destino dentro de las 24 hs., manteniendo la temperatura debajo de los 20 grados C. Nunca congelar.

Conservación

Conservar:

- una semana si es sangre
- 24 hs. si es médula
- 72 hs. si es líquido amniótico o vellosidades coriales
- 48 hs. si es tejido sólido

Estos lapsos deben ser considerados como extremos, sólo aplicables excepcionalmente.

Disponible en: <http://www.drwebsa.com.ar/sagm/normat.htm>

ACTIVIDADES DE COMPRENSIÓN

Para construir comprensión sobre los contenidos desarrollados en este capítulo se presentan actividades que permiten:

- Analizar metafases de linfocitos humanos con bandas G al microscopio óptico (100x)
- Reconocer diferentes variaciones cromosómicas y escribir el cariotipo
- Resolver casos clínicos que requieren estudios genéticos
- Elaborar producciones escritas

1. Observación al microscopio

- a) Recorre en 40X cada extendido cromosómico
- b) Analiza y dibuja en 100X al menos dos metafases, en el espacio que sigue:

A continuación se presentan diferentes casos, luego de analizarlos escribe los contenidos centrales en los que basarías el asesoramiento genético a la persona o sus familiares:

CASO 1.

Mujer de 35 años con embarazo de 12 semanas.

Datos de la ecografía en 12+5: CRL: 65,33 mm; TN: 2,3 mm; ausencia de hueso nasal.

El laboratorio informa sobre la base del triple test (Alfa feto proteína, Gonadotropina coriónica y estradiol) que el riesgo S. de Down es 1/7.859 y el riesgo para S. de Edwards es menor de 1 entre 10.000.

La paciente manifiesta preocupación por la observación en la ecografía de la ausencia del hueso nasal y su relación con el S. de Down. ¿Es posible incluir la presencia o no de hueso nasal en la valoración de realizar o no la amniocentesis cuando los resultados del laboratorio indican esos valores de riesgo?

CASO 2.

Mujer de 40 años con abortos a repetición. Se realiza el cariotipo y el resultado es 46,XX, 9phqh. ¿Es posible atribuir el diagnóstico al resultado obtenido?

CASO 3.

Madre (35 años) de una niña de 3 años con una delección 22q11.2. La mujer consulta para interiorizarse sobre las probabilidades de tener otro hijo con alguna alteración cromosómica.

CASO 4.

Niño de 4 años con estudio citogenético con el siguiente resultado: 46, XY, fra(X)q27.3 [3]. ¿Es posible indicar que el paciente presenta Síndrome del X frágil?

CASO 5.

Niño de 4 años con estudio citogenético con el siguiente resultado: 46, XY, fra(X)q27.3 [45]. ¿Es posible indicar que el paciente presenta Síndrome del X frágil?

CASO 6.

Pareja con pérdidas recurrentes. Mujer de 25 años y Varón de 26 años. Los resultados de los cariotipos con bandas G son: 46, XX y 46, XY, 15 ps+. ¿El cariotipo del varón debe confirmarse con otra técnica de bandas? ¿Es posible atribuir el diagnóstico al resultado obtenido?

CASO 7.

Mujer embarazada de 32 años con un segundo embarazo. La ecografía del primer trimestre detectó que el feto tiene un higroma quístico, teratoma de 2.7 mm. En el primer embarazo no hubo complicaciones. La mujer pide las siguientes explicaciones ¿Qué le está pasando? ¿Es preocupante? ¿Podré llevar a término el embarazo?

CASO 8.

Varón de 32 años con cariotipo 45,XY,-14,-21,+t(14;21)(q10;q10). El varón consulta por las consecuencias de ese cariotipo en la descendencia.

CASO 9.

Recién nacida con cariotipo 45,X[45]/46,XX[5]. Los padres consultan por el origen de este cariotipo, características y el riesgo de recurrencia.

CASO 10.

Recién nacido con cariotipo 47,XYY[10]/46,XY[20]. Los padres consultan por el origen de este cariotipo, características y el riesgo de recurrencia.

CASO 11

- Las **figuras 1) a y b** muestran ejemplos de prueba de aneuploidía donde se han combinado núcleos en interfase procedentes de células de fluido amniótico con sondas de DNA para los cromosomas 13 (color verde) y 21 (color amarillo) en distintos pacientes:

La **figura 1) a** representa núcleos del paciente 1, donde se señala, con sus respectivos colores, la presencia de los cromosomas 13 y 21.

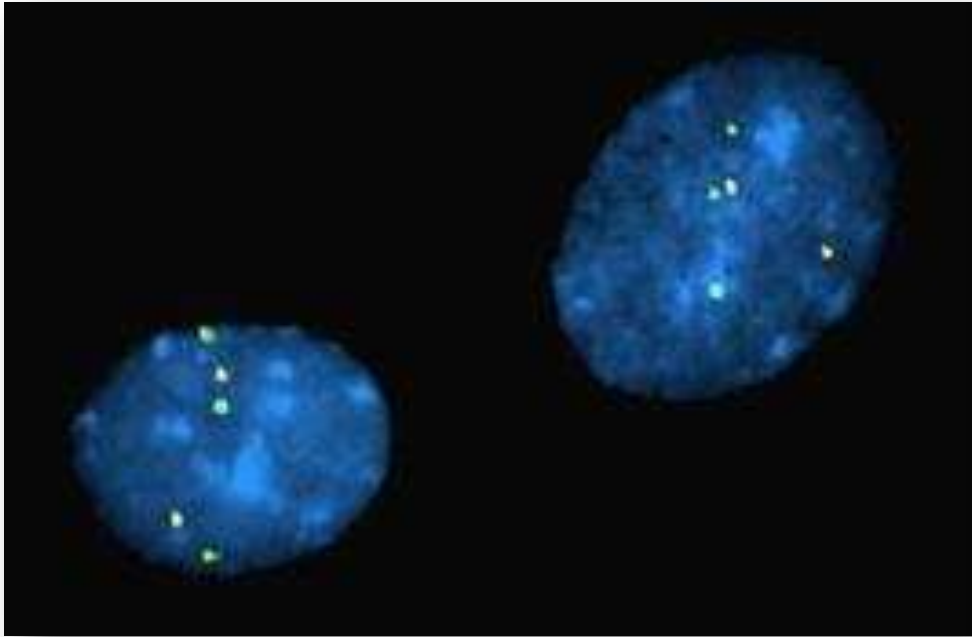


Fig. 1 (a). Núcleos en interfase de una muestra de líquido amniótico

- a) De acuerdo a las señales observadas, ¿qué aneuploidía cromosómica presenta este paciente en particular?

La **figura 1) b** muestra varios núcleos, en este caso, del paciente 2, donde nuevamente observamos células de fluido amniótico con sondas de DNA para los cromosomas 13 (verde) y 21 (amarillo).

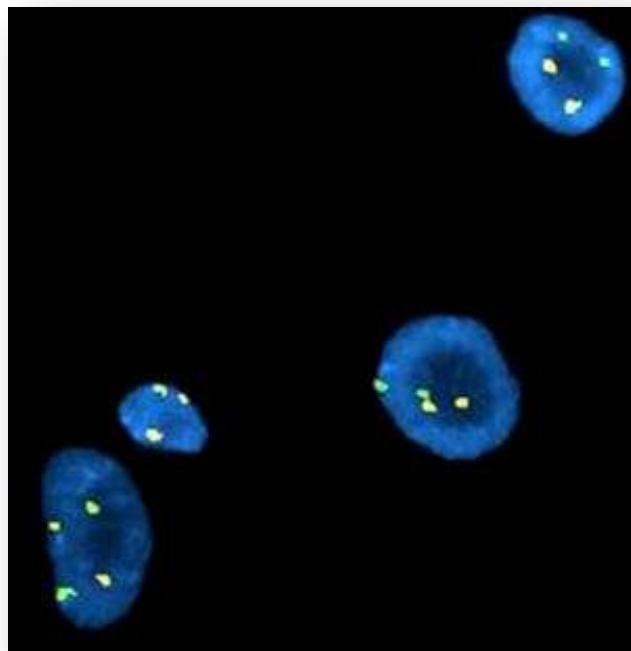


Fig. 1 (b). Núcleos en interfase de una muestra de líquido amniótico

- a) Analizando las señales que presentan cada uno de los núcleos ¿Que patología presenta este paciente?
- En un laboratorio de Citogenética humana se analizaron 20 metafases de sangre proveniente de un niño de dos años de edad derivado por un médico neurólogo, cuyo resultado fue 47,XY+m
- a) Elabora el informe según las Normatizaciones en Citogenética Clínica. Sociedad Argentina de Genética Médica.
- b) Elabora un breve escrito con un breve asesoramiento que le darías a los padres del niño.

Bibliografía de consulta

1. Cerezo C.A. 2007. Bases cromosómicas de las alteraciones genéticas humanas. *Química clínica* 26(4):224-228.
2. Feuk L., Carson A.R. y Scherer S.W. 2006. Structural variation in the human genome. *Nature Reviews Genet* 7:85-97.
3. Gardner R.J. y Sutherland G.R. 1996. *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling*. NY, Oxford University Press.
4. Hassold y Hunt. 2001. To err (meiotically) is human: The genesis of human aneuploidy. *Nature Reviews* 2:280-291.
5. Jones K.L. 2007. *Smith Patrones reconocibles de malformaciones humanas*. Editorial Elsevier Español. 6ta edición
6. Jorde L.B., Carey L.C., Bamshad M.J. y White R.L. 2009. *Medical Genetic*. Elsevier. Mosby. 4ta edición.
7. Korf B.R. 2000. *Human Genetics: A Problem-Based Approach*. Blackwell Science. Boston 2d edition.
8. Solari A.J. 1999. *Genética Humana. Fundamentos y aplicaciones en medicina*. Editorial Médica Panamericana. 2da edición.
9. Tamar Silva C., Contreras N.C., Fonseca D.J. 2008. Utilidad de la citogenética en la medicina actual., visión histórica y aplicación. *Acta Med Colomb* 33:309-316.
10. Thompson y Thompson. 2008. *Genética Médica*. Editorial Salvat Editores. Barcelona. 7ma edición.
11. Turnpenny P. y Ellard S. 2009. *Emery Elementos de Genética Médica*. Editorial Elsevier España. 13ª edición.

9 CITOGENÉTICA Y CÁNCER

Variaciones cromosómicas y neoplasias

Actualmente se asume que el cáncer tiene su origen en alteraciones en una célula que conducen a la modificación de su potencial de crecimiento, de su respuesta a los mecanismos de control y de su función. Estas alteraciones pueden implicar mutaciones en uno o más genes, variaciones cromosómicas o defectos en la transcripción que conducen a la dediferenciación y modificación de un proceso celular crítico: el ciclo celular. Como consecuencia, ocurren cambios en las propiedades de crecimiento de la célula. La proliferación de esta célula transformada genera un crecimiento maligno, sugiriendo el origen monoclonal del cáncer.

El estudio de la relación genética-cáncer puede ser abordado desde distintos aspectos: (1) carcinogénesis. (2) condiciones predisponentes. (3) enfermedades de herencia mendeliana con elevada incidencia de neoplasias. (4) neoplasias hereditarias (5). oncogenes (6) variaciones cromosómicas y neoplasias.

El análisis cromosómico ha proporcionado un conocimiento básico de los cambios genéticos responsables de los procesos que suceden durante la transformación maligna de las células. Se han descrito un número de variaciones cromosómicas frecuentemente asociadas con subtipos tumorales particulares. Además, estas variaciones cromosómicas han contribuido a establecer en muchos casos el pronóstico de la enfermedad y, en algunos, incluso indicar tratamientos específicos. Por todo ello, muchas decisiones terapéuticas están basadas en estos hallazgos genéticos.

El análisis citogenético de las células tumorales ha revelado la presencia de variaciones cromosómicas en más de 30.000 neoplasias humanas: las variaciones citogenéticas son un atributo característico de las células neoplásicas. La presencia de determinadas variaciones cromosómicas aporta información con valor diagnóstico y pronóstico en neoplasias hematológicas tanto como en tumores sólidos. El conocimiento de la variación cromosómica asociada con un diagnóstico permite hacer un seguimiento de la evolución de la enfermedad, valorar la respuesta al tratamiento y detectar y cuantificar la enfermedad mínima residual

(EMR). En los protocolos clínicos, especialmente en neoplasias hematológicas y sarcomas, las decisiones terapéuticas están basadas, entre otros parámetros, en el análisis citogenético de las células neoplásicas

El estudio cromosómico en neoplasias humanas ha pasado por tres etapas. La primera, antes de las técnicas de bandeo, cuando sólo se había reconocido un rearrreglo cromosómico consistente en la leucemia mieloide crónica. En 90% de pacientes adultos con este padecimiento se puede detectar citogenéticamente un cromosoma Filadelfia (Ph) que es producto de una translocación balanceada entre los brazos largos del cromosoma 22 y los brazos largos del cromosoma 9. Sin embargo, todos los pacientes presentan el rearrreglo molecular. La segunda etapa se inicia con el desarrollo de las técnicas de bandeo que permitieron detectar anomalías cromosómicas clonales consistentes en un mayor número de neoplasias. Y en la tercera, gracias a las técnicas de alta resolución en combinación con métodos de biología molecular e hibridación in situ ha sido posible reconocer uno o más defectos cromosómicos recurrentes en la mayoría de los procesos malignos. Los rearrreglos cromosómicos observados son principalmente de cuatro tipos: translocaciones recíprocas, monosomías totales o parciales, trisomías totales o parciales e inversiones. Las dos primeras son las más comunes: las translocaciones en leucemias y linfomas no Hodgkin y las deleciones en tumores sólidos.

Debido a estas observaciones, el análisis cromosómico debe realizarse rutinariamente en las neoplasias, ya que el hallazgo de marcadores citogenéticos es de gran valor en el diagnóstico, pronóstico, elección de tratamiento y evolución de estos padecimientos.

A continuación se muestran Tablas con las alteraciones cromosómicas más frecuentes asociadas con leucemias, linfomas y tumores sólidos (Tomado de Calasanz M. J. 2001)

Tabla 2 Alteraciones cromosómicas recurrentes en leucemias y genes implicados*		
	Alteración citogenética	Genes implicados
Mieloides:		
LMC	t(9;22)(q34;q11)	<i>ABL-BCR</i>
LMC crisis blástica	t(9;22)(q34;q11), +8,+19,+Ph,I(17q)	<i>ABL-BCR</i>
LANL-M2	t(8;21)(q22;q22)	<i>ETO-AML1</i>
LANL-M3	t(15;17)(q22;q11-12)	<i>PML-RARA</i>
LANL-M4Eo	inv(16)(p13q22) ó t(16;16)	<i>MYH11-CBFB</i>
LANL-M5	t(9;11)(p22;q23)	<i>AF10-MLL</i>
LANL	t(6;9)(p23;q34)	<i>DEK-CAN</i>
	t(3;3)(q21;q26)	<i>EVII</i>
	ó inv(3)(q21q26)	
LANL-secundaria	+8,-7,-5,del(5q),del(20q),12p -7,del(7q),-5,del(5q)	
LMMC	t(11q23)	<i>MLL</i>
SMD	t(5;12)(q33;p13)	<i>PDGFRB-TEL(ETV6)</i>
	-7,del(7q),-5,del(5q), +8,del(11q),del(20q), del(11q),del(12p)	
Linfoides:		
LAL preB	t(1;19)(q23;p13)	<i>PBX1-E2A</i>
	t(5;14)(q31;q32)	<i>IL3-IGH</i>
LAL B(Sig+)	t(12;21)(p13;q22)	<i>TEL-AML1</i>
	t(8;14)(q24;q32)	<i>MYC-IGH</i>
	t(2;8)(p12;q24)	<i>IGK-MYC</i>
	t(8;22)(q24;q11)	<i>MYC-IGL</i>
LAL B o B-mielotide	t(9;22)(q34;q11)	<i>ABL-BCR</i>
	t(4;11)(q21;q23)	<i>AF4-MLL</i>
LAL T	t(1;14)(p32;q11)	<i>TALI/SCL-TCRA</i>
	t(1;7)(p34;q34)	<i>LCK-TCRB</i>
	t(8;14)(q24;q11)	<i>MYC-TCRA</i>
	t(7;9)(q35;q34)	<i>TCRB-TAL2</i>
	t(7;9)(q34;q34.3)	<i>TCRB-TAN1</i>
	t(7;10)(q35;q24)	<i>TCRB-HOX11</i>
	t(10;14)(c24;q11)	<i>HOX11-TCRA</i>
	t(11;14)(p13;q11)	<i>RBTN2/TTG2-TCRA/D</i>
	t(7;11)(q35;p13)	<i>TCRB-RBTN2/TTG2</i>
	t(11;14)(p15;q11)	<i>RBTN1/TTG1-TCRA/D</i>
	del(9p),t(9p)	
LLC-B	t(14;18)(c32;q21)	<i>IGH-BCL2</i>
	t(11;14)(c13;q32)	<i>BCL11A-IGH</i>
	t(14;19)(c32;q13)	<i>IGH-BCL3</i>
	t(2;14)(p13;q32)	<i>BCL11A-IGH</i>
	+12,del(13q)	
	del(11)(q21q23)	
LLC-T	t(8;14)(q24;q11)	<i>MYC-TCRA</i>
	t(14;14)(c11;q32)	<i>TCRA-TCL1</i>
	inv(14)(q11q32)	<i>TCRA-TCL1</i>
MM	t(11;14)(c13;q32)	<i>BCL1(CyclinD1)-IGH</i>
	t(4;14)(p16;q32)	<i>FGFR/MMSET3-IGH</i>
	t(14;16)(q32;q23)	<i>IGH-CMAF</i>
	t(6;14)(p25;q32)	<i>MUM1(IRF4)-IGH</i>
	t(1;14)(q21;q32)	<i>MUM2/3-IGH</i>
	1q, 13q,del(6q)	<i>TNF</i>
	del(7q)	<i>GPI70</i>
* La lista completa de alteraciones cromosómicas y genes implicados en leucemias puede ser consultada en: (http://www.ncbi.nlm.gov/CCAP).		

Tabla 3. Translocaciones cromosómicas recurrentes en Linfomas no Hodgkin y genes implicados*.		
	Alteración citogenética	Genes implicados
LNH-B:		
Burkitt	t(8;14)(q24;q32)	<i>MYC</i> -IGH
	t(2;8)(p11;q24)	IGK- <i>MYC</i>
	t(8;22)(q24;q11)	<i>MYC</i> -IGL
Follicular	t(14;18)(q32;q21)	IGH- <i>BCL2</i>
	t(2;18)(p12;q21)	IGK- <i>BCL2</i>
	t(18;22)(q21;q11)	<i>BCL2</i> -IGL
	t(1;22)(q22;q11)	<i>FCGR1B</i> -IGL
DCG	t(3;22)(q27;q32)	<i>BCL6</i> -IGL
	t(3;14)(q27;q32)	<i>BCL6</i> -IGH
	t(2;3)(p12;q27)	IGK- <i>BCL6</i>
	t(14;15)(q32;q11-q13)	IGH- <i>BCL8</i>
	t(10;14)(q24;q32)	<i>NFKB2(LYT10)</i> -IGH
	t(14;18)(q32;q21)	IGH- <i>BCL2</i>
	t(8;14)(q24;q32)	<i>MYC</i> -IGH
	t(6;14)(p21;q32)	<i>CyclinD3</i> -IGH
	t(1;14)(q21;q32)	<i>MUC1</i> -IGH
Manto	t(11;14)(q13;q32)	<i>BCL1(CyclinD1)</i> -IGH
Marginal:		
• Linfoplasmocitoide	t(9;14)(p13;q32)	<i>PAX5</i> -IGH
• Malt	t(11;18)(q21;q21)	<i>AP2</i> -MLT
	t(1;14)(p22;q32)	<i>BCL10</i> -IGH
• Linfocítico (small)	t(14;19)(q32;q13)	IGH- <i>BCL3</i>
• Esplénico veloso	t(7;14)(q21;q32)	<i>CDK6</i> -IGH
	t(2;7)(p12;q21)	IGK- <i>CDK6</i>
• Otros	t(11;14)(q23;q32)	<i>PAFAH2</i> -IGH
	t(11;14)(q23;q32)	<i>RCK</i> -IGH
	t(12;14)(q24;q32)	<i>BCL7A</i> -IGH
	t(12;22)(q24;q32)	<i>CyclinD2</i> -IGL
LNH T:		
Anaplásico KI+	t(2;5)(p23;q35)	<i>ALK-NPM</i>
(T o B)		
variable	t(10q24)	<i>NFKB2(LYT10)</i>
	t(7;14)(q35;q11)	TRCB-TRCA/D
	t(7;14)(p15;q11)	TCRG-TCRA/D
	t(7;7)(p15;q11)	TCRG
	t(11;14)(p13;q11)	<i>RBTN2</i> -TRCD
	inv(14)(q11q32)	TCRA- <i>TCL1</i>
	t(14;14)((q11;q32)	TCRA-IGH
* La lista completa de alteraciones cromosómicas y genes implicados linfomas puede ser consultada en: (http://www.ncbi.nlm.gov/CCAP).		

Tabla 4. Algunas de las alteraciones cromosómicas recurrentes descritas en tumores sólidos.*

Alteraciones cromosómicas y genes implicados

• **Benignos**

adenoma de colon	+7, +8,+12, del(12q)
lipoma	t(3;12)(q27;q14)(<i>LPP-HMGIC</i>),t(1;12),t(2;12), t(5;12),del(12q),del(13q)
neuroepitelioma	t(11;22)(q24;q12)
neurinoma	-22,-Y
adenoma de ovario	+12
fibroma de ovario	+12
leiomioma de útero	r(1),t(2;12),del(7q)(q21q31),t(12;14),+12,t(12q13), 1p36,10q22,-13,-22,t(1;2),inv(X)(p22q13)
glándulas salivares	t(1;8),t(3;8)(p21;q12)(<i>CTNMB1-PLAG1</i>),t(6;8),t(8;13),del(8q), t(8;9),t(9;12),inv(12)(p13q13)
adenoma renal	-Y,+7,+17

• **Malignos**

liposarcoma (mix)	t(12;16)(q13;p11),(<i>DDIT3-FUS</i>)
sarcoma sinovial	t(X;18)(p11;q11, genes <i>SYT-SSX1/2</i>)
sarcoma de Ewing	t(11;22)(q24;q12)(<i>FLI-1</i>),t(21;22)(q22;q12) (<i>ERG-EWS</i>),t(1;16)(q11;q11),+8
rabdomiosarcoma	t(2;13)(q35;q14)(<i>PAX3-FKHR</i>),t(1;13)(p36;q14) (<i>PAX7-FKHR</i>)
condrosarcoma	-Y,t(9;22)(q22;q12)(<i>CSMF-EWS</i>)
fibrosarcoma	-Y
sarcoma (<i>clear cell</i>)	t(12;22)(q13;q12)(<i>ATF1-EWS</i>)
vejiga	+7,del(10p),i(5p),i(11p),del(11p),i(11q),13q14, LOH, 3p,12q,mutac. p53
próstata	del(10)q24),+7,-Y,ganancias:3q,7q,8q,Xq
pulmón (SCLC)	del(3)(p14p23)(<i>FHIT</i>),+7,del(5q),13q(<i>RB</i>);LOH (3p),5q,6,9p,(p16),17q,17p(p53), <i>MYC,RAS</i>
colon	del(17p),-18,dm in,LOH18q(gen <i>DCC</i>),mutac gen APC, p53,12q,17q,+12,del(1p)
riñón	del(3p),t(3;5),t(3;8),i(5p),del(6q),t(X;1)(p11;q21) (<i>TFE31-PRCC</i>),-3,+7,+8,+10,-Y, inv(7)(p15q34)
útero	+10,i(1q),del(6)(q21),1q21
ovario	del(6q),del(3p),t(1;17),dm in,hsr,gen <i>AKT2,KRAS, BRCA1,OVC</i> ,+12,+7,+8
tiroides	inv(10)(q11q21)(<i>RET</i>),t(7;10)(q35;q21)
gliomas	+8,fusiones teloméricas,-7,-10,-22,-X,Y,del(22)q11),del(9p), amplif.12q, inactivación de <i>p53,p16,RB,PTEN</i> . Sobreexpresión de <i>CDK4,EGFR,VEGF</i>
melanoma	t(1;6),t(1;19),i(6p),+7,del(9p)(13),del(6q),1q11, del(1)(p11p22)
mesotelioma	t,dup,del,inv (3)(p21p23)
retinoblastoma	i(6p),del(13)(q14),1q,LOH13q
neuroblastoma	del(1)(p32p36),t(1;17)(p36;q14),dm in,amplif <i>NMYC</i> , ganancias 1q21-q25
testicular	i(12p)(10), amplif <i>KRAS</i>
Wilms	del(11)(p13),del(11)(p15),i(1q),t(1;16)(q10;q10),LOH 11p
mama	-17,i(1q),t(1;16),del(1q),del(3p)(p12p14),del(6q), +7,+18,+20,del,t1p, t(1q),t(7q), t(11q),dup(11q),dm in,hsr (8p),mutaciones <i>p53,BRCA1</i> ,amplificación de <i>HER2/neu</i> , amplificación 20q.

* La lista completa de alteraciones cromosómicas y genes implicados en tumores sólidos puede ser consultada en: (<http://www.ncbi.nlm.gov/CCAP>) y (<http://www.helsinki.fi/~lgl/www/CMG.html>).

Asimismo, se ha descripto el incremento en el riesgo de padecer cáncer en algunos síndromes cromosómicos. Estos datos se muestran en la siguiente tabla:

Síndromes cromosómicos con riesgo incrementado de padecer cáncer

SÍNDROME	ALTERACIONES CROMOSÓMICAS	INCREMENTO RIESGO TUMOR
PATAU	TRISOMÍA 13	TUMOR CEREBRAL CÉLULAS GERMINALES LEUCEMIA EXTRAGONADAL NEUROBLASTOMA TUMOR DE WILMS
DOWN	TRISOMIA 21	TUMORES CUTANEOS LEUCEMIA
EDWARDS	TRISOMÍA 18	HEPATOBLASTOMA NEUROBLASTOMA TUMOR DE WILMS
TURNER	45,X	CANCER DE COLON
DISGENESIA GONADAL MIXTA	45,X/46,XY DISGENESIA GONADAL	GONADOBLASTOMA SEMINOMA
SWYER	MUJERES 46,XY	TUMOR DE OVARIO
KLINEFELTER	47,XXY	TUMOR CÉLULAS GERMINALES EXTRA GONADAL
XYX	47,XYX	TUMOR NEUROEPITELIAL LEUCEMIA MICOSIS FUNGOIDE NEUROBLASTOMA LINFOMA NO HODGKIN
X FRAGIL	46,XX, FRAXA+	CÁNCER DE COLON GLIOBLASTOMA HEPATOBLASTOMA LEUCEMIA CÁNCER DE PANCREAS SEMINOMA TUMOR VEJIGA

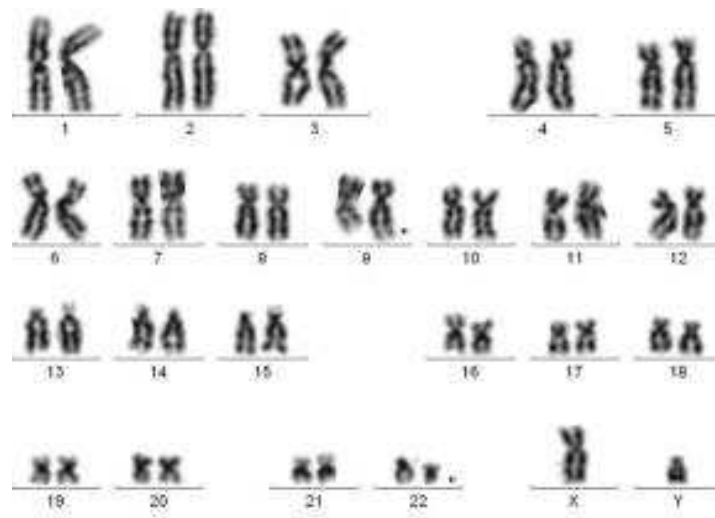


El riesgo de padecer ese tipo de cáncer no esta confirmado

Las técnicas citogenéticas como rutina diagnóstica

• Citogenética convencional (cariotipo con bandas G)

El análisis citogenético convencional consiste en el estudio de las alteraciones cromosómicas en las metafases de las células neoplásicas obtenidas tras el cultivo "in vitro", a corto plazo y sin mitógenos de células de médula ósea, sangre periférica, ganglios, biopsias, etc. El estudio de la morfología de los cromosomas, teñidos fundamentalmente con bandas G (Tripsina-Giemsa), permite detectar en un único experimento, tanto las alteraciones numéricas (monosomías, trisomías, etc.), como las estructurales (translocaciones, inversiones, deleciones, etc.) presentes en todo el genoma.



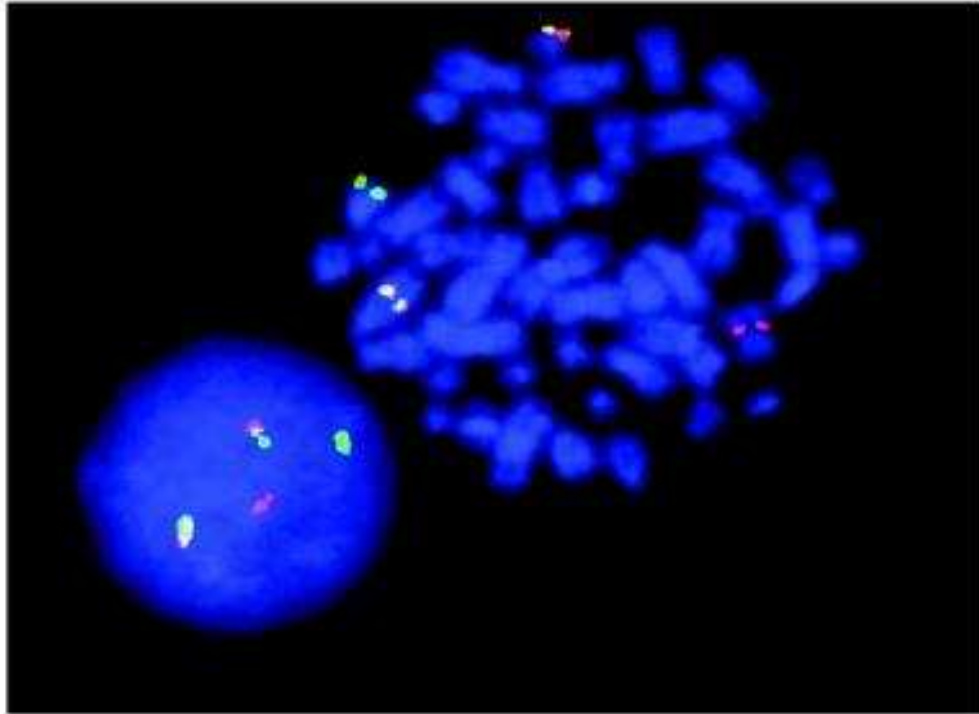
Cariotipo en el que se observa la t (9;22)(q34;q11).

IMAGEN TOMADA de Hernández *et al.* 2011

• Citogenética molecular (hibridación "in situ" con fluorescencia)

Las técnicas de FISH vienen utilizándose desde los años 80, si bien no se han incorporado en todos los laboratorios de genética como rutina. La alta sensibilidad y especificidad del FISH y la rapidez de los ensayos han hecho de esta técnica una importante estrategia diagnóstica. Por otra parte, otras técnicas derivadas del FISH han progresado hasta tal punto que hoy es posible, como veremos más adelante, utilizar simultáneamente 24 sondas de pintado cromosómico, consiguiendo identificar cada cromosoma por su color. Entre las técnicas derivadas del FISH convencional, cabe destacar, la hibridación genómica comparada (CGH), de enorme utilidad en tumores sólidos y el cariotipo multicolor (SKY-FISH y M-FISH).

Todas ellas, constituyen una nueva disciplina a la que se ha denominado "citogenética molecular", que complementan, pero nunca excluyen al análisis citogenético convencional (cariotipo de bandas G).



FISH en células de linfoma de manto t (11;14)

IMAGEN TOMADA de <http://www.monografias.com/trabajos62/estudio-cariotipo/estudio-cariotipo2.shtml>

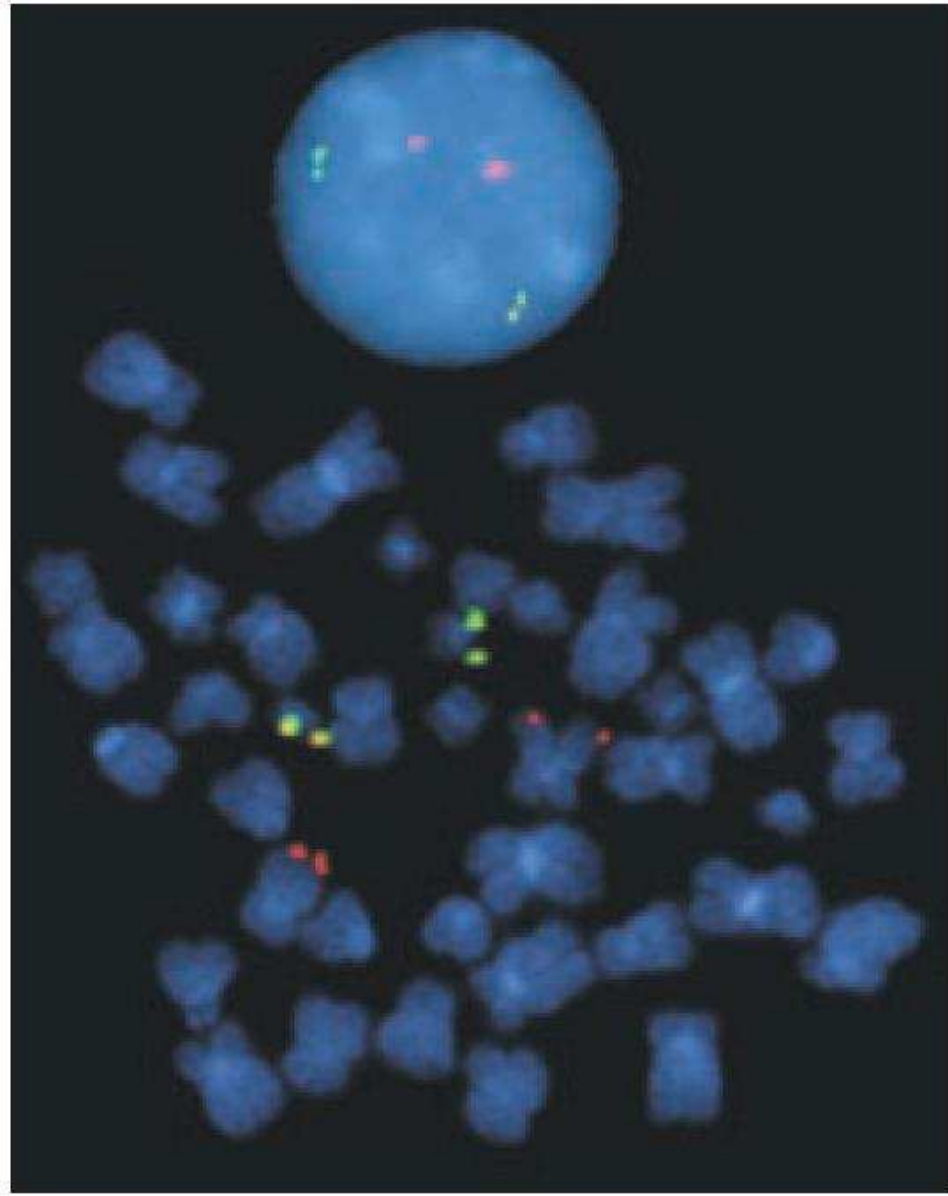
• **FISH convencional**

Los dos componentes principales de la técnica de FISH convencional son la sonda de ADN marcada con fluorescencia y la secuencia diana en la muestra tumoral para la cual es específica. Es muy importante destacar que no es una técnica de búsqueda de nuevas alteraciones cromosómicas, sino que detecta únicamente aquello que se buscan. El resto del genoma permanece oculto.

Se pueden utilizar sondas de ADN de distintos tipos: centroméricas (marcan únicamente las zonas centroméricas), de pintado cromosómico (marcan todo un cromosoma) o de secuencias específicas de locus (marcan regiones cromosómicas de secuencia única).

Esta técnica complementa perfectamente a la citogenética convencional en todas aquellas situaciones en las que no ha sido posible realizar un cariotipo: al disponer de metafases de poca calidad, o no haber obtenido metafases, o bien en los casos en los que las alteraciones

cromosómicas asociadas a un diagnóstico son crípticas no visibles en el cariotipo, como el caso de la t(12;21) en leucemia aguda linfoblástica infantil.



Identificación mediante FISH en metafase e interfase de la t(9;22)(q34;q11). Las señales de fluorescencia resultan de hibridar el gen ABL (en rojo) y el gen BCR (en verde). La fusión BCR/ABL aparece sobre el cromosoma 22 (en amarillo).

IMAGEN TOMADA de Ramos *et al.* 2001

- **CGH (hibridación genómica comparada)**

Como ya se ha mencionado, uno de los mayores problemas a los que se enfrenta la citogenética convencional, es la ausencia de metafases y su gran ventaja reside en ser una técnica que permite analizar todo el genoma. La técnica de FISH convencional ha resuelto el primer problema, ya que permite analizar núcleos en interfase, pero en cambio su gran limitación es que no es una técnica de screening, como el cariotipo, ya que sólo detecta las alteraciones que se buscan. A principio de los 90, y con especial aplicación en tumores sólidos, en donde obtener metafases de calidad es a menudo complicado, se describió una nueva técnica de citogenética molecular: la hibridación genómica comparada (CGH). Esta técnica emplea ADN del tumor y, además, no analiza metafases, obviando la necesidad de células en crecimiento.

Esta técnica derivada del FISH se basa en la hibridación competitiva de dos ADNs, (tumoral y control normal) marcados con distintos fluorocromos, sobre cromosomas normales. En resumen: se marca el ADN del tumor con un fluorocromo verde y un ADN normal (control) con un fluorocromo rojo. Ambos ADNs se mezclan en cantidades equimolares y se realiza una hibridación in situ sobre cromosomas metafásicos normales. Ambos ADNs compiten por hibridar en los mismos lugares cromosómicos. En condiciones normales (tumor sin alteraciones genéticas), como la cantidad de ADN marcado en rojo y verde es la misma, el resultado final son cromosomas amarillos (mezcla 1:1 de rojo y verde). En condiciones patológicas, si el tumor contiene alguna ganancia cromosómica, la cantidad de ADN tumoral disponible para hibridar es mayor, y la hibridación de esa zona resultará en una mayor proporción de fluorocromo del tumor (verde). Al contrario, si el tumor contiene una delección (pérdida), la región delecionada del tumor aparecerá en rojo, ya que habrá más cantidad de ADN normal (rojo) para hibridar en esa región cromosómica. La CGH permite, por tanto, la detección de ganancias y pérdidas de regiones cromosómicas en todo el genoma del tumor por la comparación de las intensidades de las señales de hibridación.

La CGH ha contribuido significativamente al conocimiento actual de las alteraciones genómicas en las neoplasias humanas. Además de definir patrones de ganancias y pérdidas específicas de tumor, proporciona información para la identificación de nuevos genes implicados en el cáncer. Actualmente esta técnica se utiliza sobre todo para detectar alteraciones cromosómicas en tumores sólidos, donde la obtención de metafases presenta muchas dificultades técnicas. En sólo 8 años desde su aparición, se han publicado más de

3.900 trabajos de CGH en tumores, de los que sólo 1/10 corresponden a leucemias y linfomas. En neoplasias hematológicas, la CGH está casi restringida a síndromes linfoproliferativos crónicos, ya que en éstos, el índice mitótico de las células tumorales es generalmente muy bajo.



CGH en carcinoma hepatocelular

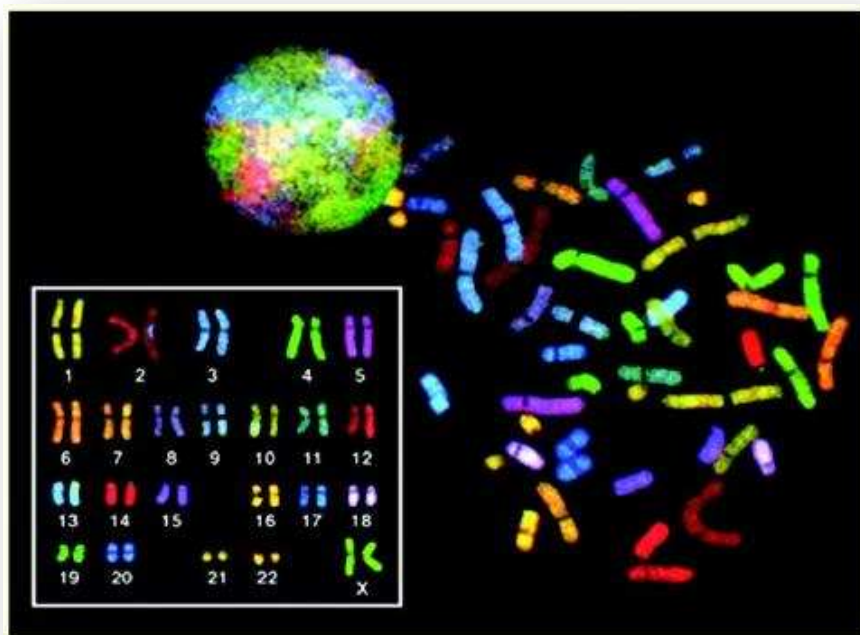
IMAGEN TOMADA de http://www.aist.go.jp/aist_e/aist_today/2003_07/hot_line/hot_line_20.html

Todas las alteraciones cromosómicas, ganancias y pérdidas, descritas en cáncer por CGH pueden ser consultadas en la base de datos actualizada de la Universidad de Helsinki (http://www.helsinki.fi/~lgl_www/CMG.html).

• Cariotipo multicolor (SKY-FISH y M-FISH)

El cariotipo espectral (SKY-FISH) y el multi-FISH (M-FISH) son técnicas de citogenética molecular desarrolladas recientemente, y en este momento sólo se utilizan en el campo de la investigación. Su fundamento técnico es sencillo. En resumen: consiste en marcar el ADN de cada cromosoma con uno o varios fluorocromos, de manera que el espectro de emisión de cada cromosoma sea único y diferenciable de los demás. Esta técnica, por tanto, pinta a cada cromosoma de un color. Con el "cocktail" de 24 sondas de pintado cromosómico obtenido tras el marcaje, se hibrida sobre los cromosomas de las metafases del tumor, el cromosoma anómalo aparecerá no uniforme, sino con los colores de los cromosomas que intervienen en la translocación. Por tanto, es una forma de realizar un cariotipo, pero teñido no con bandas G sino con colores, de forma que se puedan clasificar las alteraciones de forma unívoca.

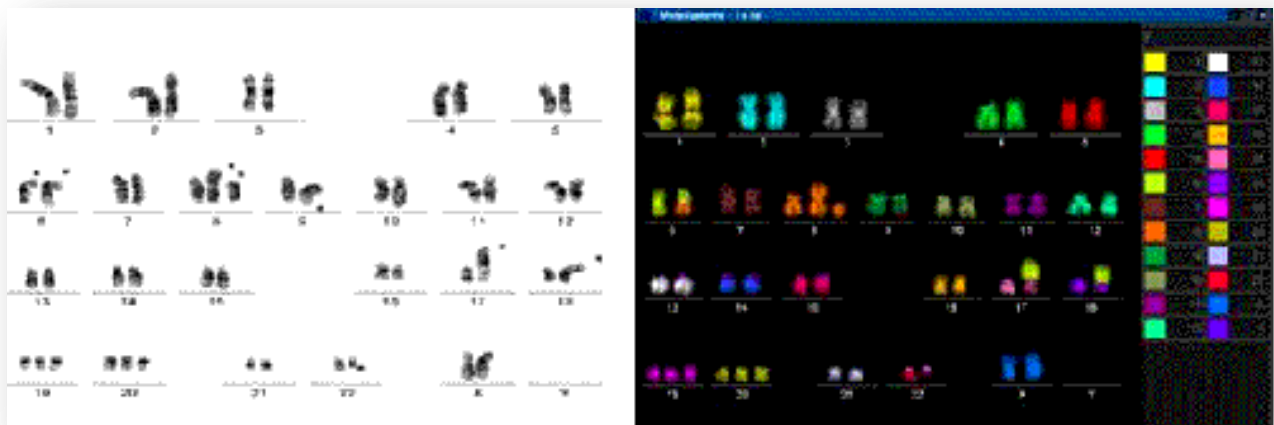
El cariotipo multicolor se ha mostrado muy útil en neoplasias hematológicas, donde no es difícil obtener metafases tumorales. Se han podido caracterizar correctamente translocaciones complejas, y también detectar alteraciones cromosómicas crípticas en cariotipos aparentemente normales. Esto ha permitido identificar un gran número de nuevas alteraciones cromosómicas, lo que ha facilitado la búsqueda de nuevos genes implicados. Su uso en tumores sólidos es más limitado por la necesidad de obtener metafases de calidad, aunque de todo lo expuesto, es la única técnica que permitirá averiguar el origen de las múltiples alteraciones cromosómicas que habitualmente aparecen en los cariotipos de tumores sólidos. No obstante, las aplicaciones de esta técnica son crecientes, y ya son cerca de 700 casos las neoplasias humanas analizadas por SKY-FISH, de las cuales 410 son leucemias y linfomas y 146 tumores sólidos. La dirección: <http://www.spectral-imaging.com>, proporciona información técnica, un sumario de aplicaciones y una lista actualizada de publicaciones relevantes sobre el cariotipo espectral. Las mejoras técnicas del cariotipo multicolor avanzan con gran rapidez y ya se está optimizando el M-FISH con bandas multicolor.



Cariotipo multicolor

IMAGEN TOMADA de <http://www.plusformacion.com/Recursos/r/Tecnicas-estudio-del-cariotipo-0>

Consultada 18/07/11



49,XX,der(6)t(6;8)(q12;q12),i(6)(p10),der(8)del(8)(q12),i(8)(q10),t(9,22)(q34;q11),der(17)t(6;17)(q12;p13),der(18)t(6;18)(q12;p11),+19,+20 Bando G y múltiple FISH.

IMAGEN TOMADA de Castillo Taucher, S., Fuentes, S., Paulos, A. y A. Pardo. 2002. Múltiple FISH y múltiple BAND: técnicas de citogenética molecular en cinco casos. Revista Médica de Chile 13(5).

En: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872002000500005

Consultada 07/07/11

ACTIVIDADES DE COMPRENSIÓN

Para construir comprensión sobre los contenidos desarrollados en este capítulo se presentan actividades que permiten:

- Analizar, reconocer variaciones e indicar el cariotipo de diferentes metafases tumorales

1. Metafase y cariotipo de célula de meningioma



IMAGEN TOMADA de Isaza, C., Escobar, M., Montoya, A. y J. Sánchez. 2006. Estudio de alteraciones cromosómicas y su relación con el crecimiento in vitro en células de meningiomas. Colombia Médica 37(1):61-66.

Cariotipo:

2. Metafase y cariotipo de célula de meningioma



IMAGEN TOMADA de Isaza, C., Escobar, M., Montoya, A. y J. Sánchez. 2006. Estudio de alteraciones cromosómicas y su relación con el crecimiento in vitro en células de meningiomas Colombia Médica 37(1):61-66.

Cariotipo:

3. Metafase y cariotipo de célula de meningioma



IMAGEN TOMADA de Isaza, C., Escobar, M., Montoya, A. y J. Sánchez. 2006. Estudio de alteraciones cromosómicas y su relación con el crecimiento in vitro en células de meningiomas. Colombia Médica 37(1):61-66.

Cariotipo:

4. Cariotipo de célula de médula ósea

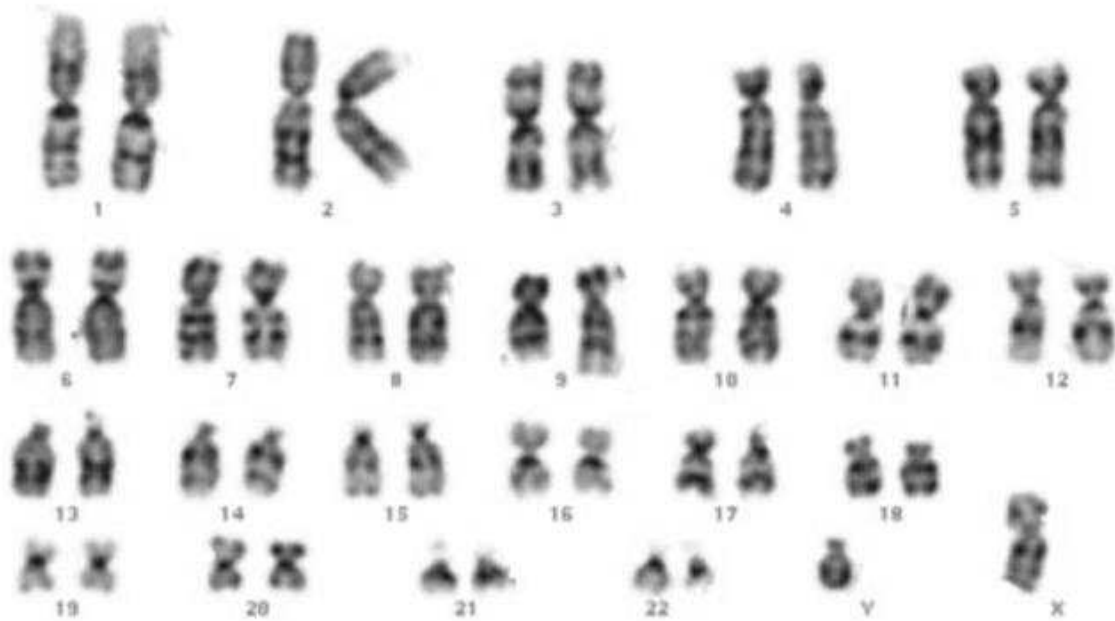


IMAGEN TOMADA de Ramos, M., M. L., Fernández Martínez, F. J. y E. Barreiro Miranda. 2001. Alteraciones cromosómicas en la leucemia linfoblástica aguda. An Esp Pediatr 55: 45-52 Servicio de Genética. Hospital 12 de Octubre. Madrid.

Cariotipo:

5. Cariotipo de célula de tumor de colon

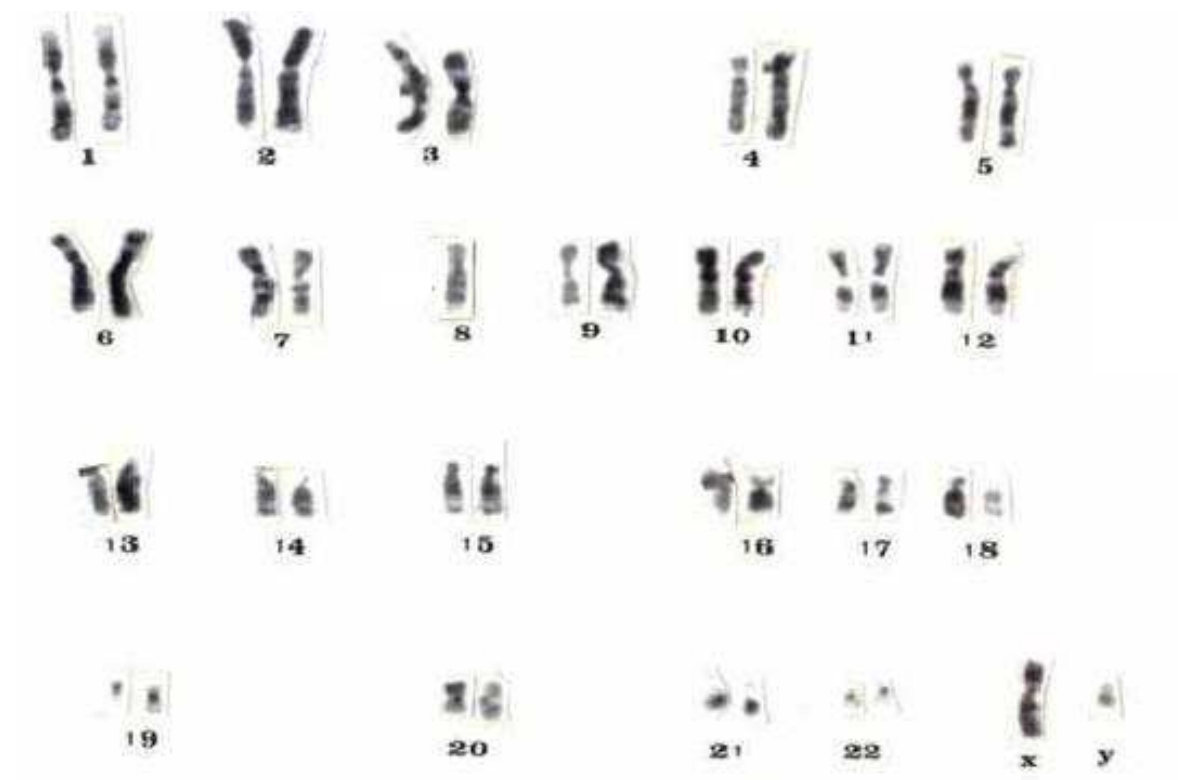


IMAGEN TOMADA de Rojas-Atencio, A., Urdaneta, K. y P. Estrada. 2002. Anomalías Cromosómicas Clonales en Tumores Colorectales. Invest. Clin. 43(4):263-270. Consultado 22/11/10
Disponible en http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0535-51332002000400005&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0535-5133 Consultada 17/08/11

Cariotipo:

6. Cariotipo de célula de melanoma

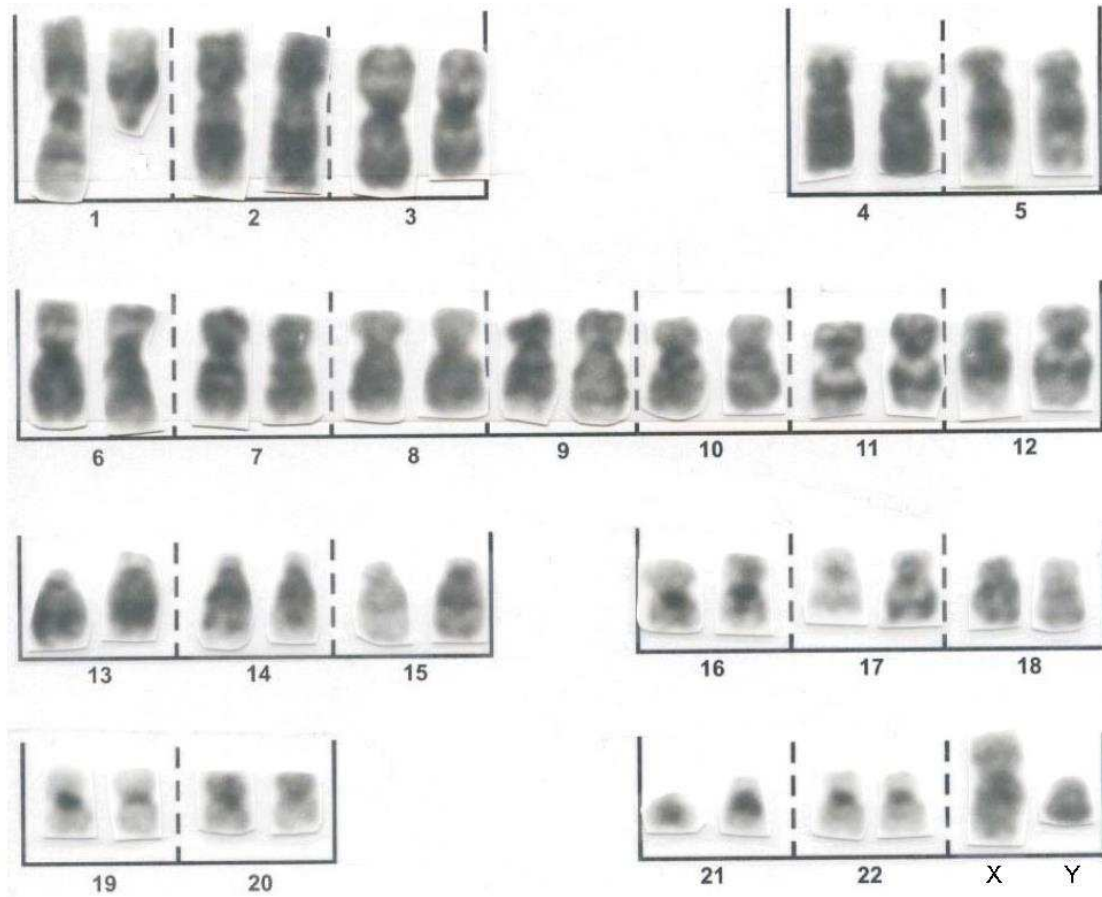


IMAGEN TOMADA de Rondón, S., Rangel, N. y S. Ramírez. 2009. Estudio citogenético en sangre periférica de pacientes con melanoma. *Invest Clin* 50(2): 173–186.

Cariotipo:

- Marca con un círculo la respuesta correcta:

a) ¿Los tumores malignos tienen rearrreglos cromosómicos?:

Siempre

Nunca

A veces

b) ¿Los rearrreglos cromosómicos son específicos de cada tumor y tejido?

Siempre

Nunca

En la mayoría de los casos, especialmente en los estadios iniciales de la tumorigénesis

- Como responsable de un laboratorio de genética, debes visitar a un médico especializado en el tratamiento de diversas neoplasias en el hombre. Debes asesorarlo sobre las utilidades (y/o limitaciones) de los estudios de citogenética convencional y molecular en el diagnóstico y pronóstico del cáncer. Elabora un texto con los argumentos que darías al médico.

Resolución de casos

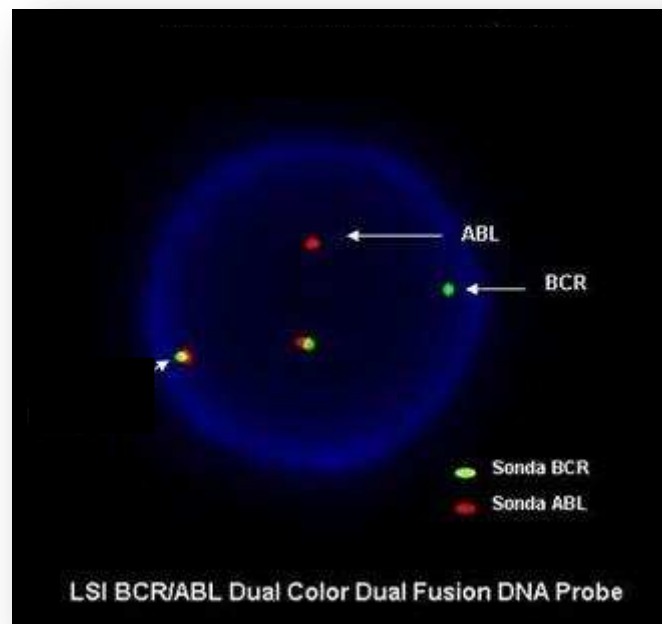
CASO 1:

La Leucemia Granulocítica Crónica es una malignidad hematológica que proviene de una célula madre pluripotencial, se presenta generalmente en adultos con una mediana de edad alrededor de los 50 años, con un ligero predominio en varones, aunque también puede presentarse rara vez en niños.

Las características patológicas principales de esta enfermedad son la presencia de granulocytosis, anemia, basofilia, trombocitosis y esplenomegalia.

La anormalidad genética presentada en estos pacientes es la translocación $t(9;22)(q34;q11)$ cuyo derivado 22 q- es el cromosoma Philadelphia (Cr. Ph1). A nivel molecular se forma el gen híbrido bcr/abl. El cromosoma Philadelphia y el gen bcr/abl constituyen los marcadores genéticos para el diagnóstico y seguimiento del clon neoplásico.

Un análisis de núcleos en interfase en el microscopio de fluorescencia, dio como resultado la siguiente imagen (tomada de <http://www.inen.sld.pe/genetica/fish.htm>):



Las señales verdes representan el gen bcr y las señales rojas el gen abl:

- a) ¿Qué representa la señal amarilla? ¿Tendrá este paciente la anomalía genética descrita con anterioridad?

Actualmente muchas investigaciones han sido dirigidas al estudio de la translocación bcr/abl en pacientes con Leucemia Granulocítica Crónica utilizando la técnica de Hibridación In Situ con Fluorescencia donde es una gran herramienta para complementar los estudios citogenéticos convencionales, especialmente en el reconocimiento de esta translocación usando sonda centroméricas.

- a) ¿Cuáles son las ventajas de la técnica de hibridación in situ con fluorescencia?
b) ¿Podría aplicarse otra técnica más sensible? ¿Cuál?

Bibliografía de consulta

1. Calasanz M. J. 2001. Revisión de técnicas de citogenética convencional y molecular y su implicación en el diagnóstico y pronóstico del cáncer Review of conventional and molecular cytogenetic techniques and their use in the diagnosis and prognosis of cancer. 2001. Anales del Sistema Sanitario de Navarra. Ed. Departamento de Salud del Gobierno de Navarra. En <http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol24/suple1/suple3a.html>
2. Fundia A F, Gorla N B, Bonduel M M, Azpilicueta O, Lejarraga H, Sackman Muriel F, Larripa I B. 1992. Increased expression of 5q 31 fragile site in a Bloom syndrome family, Human Genetics, 89: 569-572
3. Fundia A F, Gorla N B, Larripa I. 1994. Spontaneous chromosome aberrations in Fanconi anemia are located at fragile sites and acute myeloid breakpoints, Hereditas,120: 47-50
4. Fundia A, Gorla N B M, Larripa I. 1995. Non random distribution of spontaneous chromosome aberrations in two bloom syndrome patients. Hereditas 122: 239-243
5. Hernández, J., Granada, I. y F. Solé. 2011. De la citogenética convencional al análisis por micromatrices. Cincuenta años del cromosoma Filadelfia. Medicina Clínica 137 (5):221-229.
6. Isaza, C., Escobar, M., Montoya, A. y J. Sánchez. 2006. Estudio de alteraciones cromosómicas y su relación con el crecimiento in vitro en células de meningiomas Colombia Médica 37(1):61-66.
7. Nussbaum R. L, R.R.MC Innes and H.F.Willard 2004, Thompson y Thompson Genetics in medicine, 6th. edition, W.B.Saunders Company.
8. Ramos, M., M. L., Fernández Martínez, F. J. y E. Barreiro Miranda. 2001. Alteraciones cromosómicas en la leucemia linfoblástica aguda. An Esp Pediatr 55: 45-52 Servicio de Genética. Hospital 12 de Octubre. Madrid.
9. Rojas-Atencio, A., Urdaneta, K. y P. Estrada. 2002. Anomalías Cromosómicas Clonales en Tumores Colorectales. Invest. clín. [online]. dic. 2002, vol.43, no.4 [citado 22 Noviembre 2010], p.263-270. Disponible en la World Wide Web: <http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0535-51332002000400005&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0535-5133.
10. Rondón, S., Rangel, N. y S. Ramírez. 2009. Estudio citogenético en sangre periférica de pacientes con melanoma. Invest Clin 50(2): 173–186.
11. The National Cancer Institute (NCI), <http://www.cancer.gov>.

10 CITOGENÉTICA APLICADA A LA DETECCIÓN DE DAÑO GENÉTICO

La detección de mutágenos y carcinógenos

El estudio de la mutagénesis ha sido importante para la identificación de agentes potencialmente dañinos en una gran cantidad y variedad de áreas, incluyendo el monitoreo medioambiental, salud ocupacional, evaluación de riesgos, seguridad productiva y el entendimiento de la participación de componentes genéticos en la salud humana.

Además de la identificación de aquellos agentes tóxicos para la integridad del ADN, estos estudios intentan dilucidar la compleja relación entre los efectos tóxicos que afectan al material genético y la oncogénesis, y determinar la manera más confiable de evaluar la genotoxicidad desarrollando e implementando nuevos ensayos conocidos como ensayos de corto plazo (ECP).

Por definición, los ECP para genotoxicidad, detectan puntualmente agentes genotóxicos. En esa dirección, existe suficiente evidencia, basada en consideraciones mecanísticas, para afirmar que los agentes genotóxicos son potencialmente cancerígenos.

Muchos métodos han sido desarrollados para medir genotoxicidad. Estos ensayos pueden ser desarrollados empleando sistemas *in vitro* o *in vivo* y fueron diseñados para detectar sustancias que pudieran causar daño genético directa o indirectamente por distintos mecanismos de acción. Permiten la identificación de un riesgo real de daño al ADN y su fijación en la forma de mutaciones puntuales, daño cromosómico a gran escala, recombinación y cambios numéricos (aneuploidía). Se considera que los compuestos químicos que resultan positivos al ser evaluados por estos ensayos tienen la capacidad de ser cancerígenos y/o mutagénicos, y por lo tanto de inducir el desarrollo neoplásico y/o defectos heredables en seres humanos.

La “OECD Ensayo Guidelines”, es una colección de métodos usados para evaluar efectos adversos de compuestos químicos.

Estos métodos cubren ensayos de propiedades físicas y químicas, efectos sobre la salud humana y la vida silvestre, y acumulación y degradación en el ambiente. Esta guía está reconocida en todo el mundo como una herramienta de referencia estándar para evaluar compuestos químicos.

La OECD: (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico) es una Organización intergubernamental de 30 países industrializados de Europa, el pacífico y EEUU, para coordinar y armonizar políticas, discutir temas de preocupación común y trabajar juntos para responder a problemas internacionales.

Los ensayos para evaluar genotoxicidad pueden ser aplicados sobre una amplia variedad de sistemas biológicos, incluyendo bacteriófagos, bacterias, levaduras, células en cultivo de mamíferos, plantas, insectos y otros animales. Cada uno de estos sistemas proporciona cierta información, limitada e insuficiente cuando es analizada en forma aislada, pero por lo general concluyente cuando es analizada de forma integrada como parte de una batería de ensayos.

Los ensayos de corto plazo para la detección de mutágenos y carcinógenos se utilizan extensamente para la evaluación de antimicrobianos, antiparasitarios, diferentes tipos de radiaciones, citostáticos, y exposición a compuestos químicos ambientales como pueden ser plaguicidas y metales pesados, agentes laborales y una amplia variedad de agentes sospechosos de producir daño genético. Para un listado completo de carcinógenos reconocidos, posibles y probables consultar la página de la International Agency for Research on Cancer. (<http://www.iarc.fr>). A continuación se presenta la clasificación que realiza la IARC y los carcinógenos del grupo 1 que se ha establecido que son carcinógenos para el hombre.

Clasificación de la International Agency for Research on Cancer y número de agentes por categoría

Grupo 1	<i>Carcinógeno para los humanos</i>	107 agentes
Grupo 2A	<i>Probablemente carcinogénicos en seres humanos</i>	59
Grupo 2B	<i>Posiblemente carcinogénico en seres humanos</i>	267
Grupo 3	<i>No clasificable como carcinogénico para los humanos</i>	508
Grupo 4	<i>Probablemente no carcinógeno para los humanos</i>	1

Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1–102

CAS No	Agent	Group	Volume	Year
000075-07-0	Acetaldehyde associated with consumption of alcoholic beverages	1	100E	in prep
	Acid mists, strong inorganic	1	54, 100F	in prep
001402-68-2	Aflatoxins	1	56, 82, 100F	in prep
	Alcoholic beverages	1	44, 96, 100E	in prep
	Aluminium production	1	34, Sup 7, 100F	in prep
000092-67-1	4-Aminobiphenyl	1	1, Sup 7, 99, 100F	in prep
	Areca nut	1	85, 100E	in prep
	Aristolochic acid			
000313-67-7	(NB: Overall evaluation upgraded to Group 1 based on mechanistic and other relevant data)	1	82, 100A	2011
000313-67-7	Aristolochic acid, plants containing	1	82, 100A	2011
007440-38-2	Arsenic and inorganic arsenic compounds	1	23, Sup 7, 100C	in prep
001332-21-4				
013768-00-8	Asbestos (all forms, including actinolite, amosite, anthophyllite, chrysotile, crocidolite, tremolite)			
012172-73-5	(NB: Mineral substances (e.g. talc or vermiculite) that contain asbestos should also be regarded as carcinogenic to humans.)	1	14, Sup 7, 100C	in prep
017068-78-9				
012001-29-5				
012001-28-4				
014567-73-8				
	Auramine production	1	Sup 7, 99, 100F	in prep
000446-86-6	Azathioprine	1	26, Sup 7, 100A	2011
000071-43-2	Benzene	1	29, Sup 7, 100F	in prep
000092-87-5	Benzidine	1	29, Sup 7, 99, 100F	in prep
	Benzidine, dyes metabolized to (NB: Overall evaluation upgraded to Group 1 based on mechanistic and other relevant data)	1	99, 100F	in prep
	Benzo[a]pyrene			
000050-32-8	(NB: Overall evaluation upgraded to Group 1 based on mechanistic and other relevant data)	1	92, 100F	in prep
007440-41-7	Beryllium and beryllium compounds	1	58, 100C	in prep
	Betel quid with tobacco	1	85, 100E	in prep
	Betel quid without tobacco	1	85, 100E	in prep
000542-88-1	Bis(chloromethyl)ether; chloromethyl methyl ether	1	4, Sup 7, 100F	in prep
000107-30-2	(technical-grade)			
000055-98-1	Busulfan	1	4, Sup 7, 100A	2011
000106-99-0	1,3-Butadiene	1	97, 100F	in prep
007440-43-9	Cadmium and cadmium compounds	1	58, 100C	in prep
000305-03-3	Chlorambucil	1	26, Sup 7, 100A	2011
000494-03-1	Chlornaphazine	1	4, Sup 7, 100A	2011

CAS No	Agent	Group	Volume	Year
018540-29-9	Chromium (VI) compounds	1	49, 100C	in prep
	<i>Clonorchis sinensis</i> (infection with)	1	61, 100B	2011
	Coal, indoor emissions from household combustion of	1	95, 100E	in prep
	Coal gasification	1	92, 100F	in prep
008007-45-2	Coal-tar distillation	1	92, 100F	in prep
065996-93-2	Coal-tar pitch	1	35, Sup 7, 100F	in prep
	Coke production	1	92, 100F	in prep
000050-18-0 006055-19-2	Cyclophosphamide	1	26, Sup 7, 100A	2011
059865-13-3 079217-60-0	Cyclosporine	1	50, 100A	2011
000056-53-1	Diethylstilbestrol	1	21, Sup 7, 100A	2011
	Epstein-Barr virus	1	70, 100B	2011
066733-21-9	Erionite	1	42, Sup 7, 100C	in prep
	Estrogen therapy, postmenopausal	1	72, 100A	2011
	Estrogen-progestogen menopausal therapy (combined)	1	72, 91, 100A	2011
	Estrogen-progestogen oral contraceptives (combined) (NB: There is also convincing evidence in humans that these agents confer a protective effect against cancer in the endometrium and ovary)	1	72, 91, 100A	2011
000064-17-5	Ethanol in alcoholic beverages	1	96, 100E	in prep
	Ethylene oxide			
000075-21-8	(NB: Overall evaluation upgraded to Group 1 based on mechanistic and other relevant data)	1	97, 100F	in prep
	Etoposide			
033419-42-0	(NB: Overall evaluation upgraded to Group 1 based on mechanistic and other relevant data)	1	76, 100A	2011
033419-42-0 015663-27-1 011056-06-7	Etoposide in combination with cisplatin and bleomycin	1	76, 100A	2011
	Fission products, including strontium-90	1	100D	in prep
000050-00-0	Formaldehyde	1	88, 100F	in prep
	Haematite mining (underground)	1	1, Sup 7, 100D	in prep
	<i>Helicobacter pylori</i> (infection with)	1	61, 100B	2011
	Hepatitis B virus (chronic infection with)	1	59, 100B	2011
	Hepatitis C virus (chronic infection with)	1	59, 100B	2011
	Human immunodeficiency virus type 1 (infection with)	1	67, 100B	2011
	Human papillomavirus types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 (NB: The HPV types that have been classified as <i>carcinogenic to humans</i> can differ by an order of magnitude in risk for cervical cancer)	1	64, 90, 100B	2011
	Human T-cell lymphotropic virus type I	1	67, 100B	2011
	Ionizing radiation (all types)	1	100D	in prep
	Iron and steel founding (occupational exposure during)	1	34, Sup 7, 100F	in prep
	Isopropyl alcohol manufacture using strong acids	1	Sup 7, 100F	in prep
	Kaposi sarcoma herpesvirus	1	70, 100B	2011

CAS No	Agent	Group	Volume	Year
	Leather dust	1	100C	in prep
	Magenta production	1	57, 99, 100F	in prep
000148-82-3	Melphalan	1	9, Sup 7, 100A	2011
000298-81-7	Methoxsalen (8-methoxypsoralen) plus ultraviolet A radiation	1	24, Sup 7, 100A	2011
000101-14-4	4,4'-Methylenebis(2-chloroaniline) (MOCA) (NB: Overall evaluation upgraded to Group 1 based on mechanistic and other relevant data)	1	57, 99, 100F	in prep
	Mineral oils, untreated or mildly treated	1	33, Sup 7, 100F	in prep
	MOPP and other combined chemotherapy including alkylating agents	1	Sup 7, 100A	2011
000091-59-8	2-Naphthylamine	1	4, Sup 7, 99, 100F	in prep
	Neutron radiation (NB: Overall evaluation upgraded to Group 1 with supporting evidence from other relevant data)	1	75, 100D	in prep
	Nickel compounds	1	49, 100C	in prep
016543-55-8 064091-91-4	N'-Nitrosomornicotine (NNN) and 4-(N-Nitrosomethylamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) (NB: Overall evaluation upgraded to Group 1 based on mechanistic and other relevant data)	1	89, 100E	in prep
	<i>Opisthorchis viverrini</i> (infection with)	1	61, 100B	2011
	Painter (occupational exposure as a)	1	47, 98, 100F	in prep
057465-28-8	3,4,5,3',4'-Pentachlorobiphenyl (PCB-126) (NB: Overall evaluation upgraded to Group 1 based on mechanistic and other relevant data)	1	100F	in prep
057117-31-4	2,3,4,7,8-Pentachlorodibenzofuran (NB: Overall evaluation upgraded to Group 1 based on mechanistic and other relevant data)	1	100F	in prep
000062-44-2	Phenacetin (NB: Overall evaluation upgraded to Group 1 with supporting evidence from other relevant data)	1	24, Sup 7, 100A	2011
	Phenacetin, analgesic mixtures containing	1	Sup 7, 100A	2011
014596-37-3	Phosphorus-32, as phosphate	1	78, 100D	in prep
007440-07-5	Plutonium	1	78, 100D	in prep
	Radioiodines, including iodine-131	1	78, 100D	in prep
	Radionuclides, alpha-particle-emitting, internally deposited (NB: Specific radionuclides for which there is <i>sufficient evidence</i> in humans are also listed individually as Group 1 agents)	1	78, 100D	in prep
	Radionuclides, beta-particle-emitting, internally deposited (NB: Specific radionuclides for which there is <i>sufficient evidence</i> in humans are also listed individually as Group 1 agents)	1	78, 100D	in prep
013233-32-4	Radium-224 and its decay products	1	78, 100D	in prep
013982-63-3	Radium-226 and its decay products	1	78, 100D	in prep
015262-20-1	Radium-228 and its decay products	1	78, 100D	in prep
010043-92-2	Radon-222 and its decay products	1	43, 78, 100D	in prep
	Rubber manufacturing industry	1	28, Sup 7, 100F	in prep

CAS No	Agent	Group	Volume	Year
	Salted fish, Chinese-style	1	56, 100E	in prep
	<i>Schistosoma haematobium</i> (infection with)	1	61, 100B	2011
013909-09-6	Semustine [1-(2-Chloroethyl)-3-(4-methylcyclohexyl)-1-nitrosourea, Methyl-CCNU]	1	Sup 7, 100A	2011
068308-34-9	Shale oils	1	35, Sup 7, 100F	in prep
014808-60-7	Silica dust, crystalline, in the form of quartz or cristobalite	1	68, 100C	in prep
	Solar radiation	1	55, 100D	in prep
	Soot (as found in occupational exposure of chimney sweeps)	1	35, Sup 7, 100F	in prep
000505-60-2	Sulfur mustard	1	9, Sup 7, 100F	in prep
010540-29-1	Tamoxifen (NB: There is also conclusive evidence that tamoxifen reduces the risk of contralateral breast cancer in breast cancer patients)	1	66, 100A	2011
001746-01-6	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- <i>para</i> -dioxin	1	69, 100F	in prep
000052-24-4	Thiotepa	1	50, 100A	2011
007440-29-1	Thorium-232 and its decay products	1	78, 100D	in prep
	Tobacco, smokeless	1	89, 100E	in prep
	Tobacco smoke, second-hand	1	83, 100E	in prep
	Tobacco smoking	1	83, 100E	in prep
000095-53-4	<i>ortho</i> -Toluidine	1	77, 99, 100F	in prep
000299-75-2	Treosulfan	1	26, Sup 7, 100A	2011
	Ultraviolet radiation (wavelengths 100-400 nm, encompassing UVA, UVB, and UVC)	1	100D	in prep
	Ultraviolet-emitting tanning devices	1	100D	in prep
000075-01-4	Vinyl chloride	1	97, 100F	in prep
	Wood dust	1	62, 100C	in prep
	X- and Gamma-Radiation	1	75, 100D	in prep
000079-06-1	Acrylamide (NB: Overall evaluation upgraded to Group 2A with supporting evidence from other relevant data)	2A	60	1994
023214-92-8	Adriamycin (NB: Overall evaluation upgraded to Group 2A with supporting evidence from other relevant data)	2A	10, Sup 7	1987
	Androgenic (anabolic) steroids	2A	Sup 7	1987
	Art glass, glass containers and pressed ware (manufacture of)	2A	58	1993
000320-67-2	Azacitidine (NB: Overall evaluation upgraded to Group 2A with supporting evidence from other relevant data)	2A	50	1990
	Biomass fuel (primarily wood), indoor emissions from household combustion of	2A	95	2010
000154-93-8	Bischloroethyl nitrosourea (BCNU)	2A	26, Sup 7	1987
002425-06-1	Captafol (NB: Overall evaluation upgraded to Group 2A with supporting evidence from other relevant data)	2A	53	1991
	Carbon electrode manufacture	2A	92	2010

Los ensayos de genotoxicidad

Son varios los ensayos de genotoxicidad que actualmente se disponen, los más frecuentemente utilizados son:

- 1- **Ensayo de Aberraciones Cromosómicas (AC)**
- 2- **Ensayo de Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH)**
- 3- **Ensayo de Micronúcleos en médula ósea de ratón**
- 4- **Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de anfibios**
- 5- **Ensayo de Micronúcleos en mucosa bucal**
- 6- **Ensayo de Micronúcleos en sangre (CBMN)**
- 7- **Ensayo de *Allium cepa***

Los protocolos más usados para los ensayos mencionados se especifican a continuación:

1-Ensayo de Aberraciones cromosómicas en cultivo de linfocitos humanos (AC)

(Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) Test guideline 473. In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test, 1997)

Alícuotas de 0,8 ml de sangre heparinizada se cultivan durante 72 horas a 37° C de acuerdo a los métodos convencionales (Moorhead *et al.*, 1960). La sangre entera heparinizada (0,8 ml.) es resuspendida en 8 ml de medio de cultivo RPMI 1640, suplementado con un 20% de Suero Fetal Bovino empleando tubos estériles de polipropileno de 15 ml con tapa a rosca. Las células son estimuladas a entrar en mitosis mediante el agregado de Fitohemaglutinina (20µg/ml). La división celular se detiene en metafase empleando Colchicina a una concentración final de 0,4 µg/ml. Luego de una incubación a 37° C durante 25 minutos en presencia de Colchicina, los tubos son centrifugados durante diez minutos a 3000 rpm. Una vez obtenida la separación de las células que quedaron retenidas en el pellet dentro del tubo de centrífuga, se descarta el sobrenadante, el cual se sustituye por una solución hipotónica de CLK, homogeneizando cuidadosamente el contenido a fin de provocar el shock osmótico celular. Tras una nueva incubación durante 25 minutos a 37° C en estufa, los tubos se centrifugan nuevamente. Esta vez el sobrenadante es reemplazado por una solución de Metanol y Ácido Acético en una proporción de 3:1, homogeneizando nuevamente las células separadas por centrifugación con el fijador, con el que deben permanecer en contacto al menos durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se renueva el fijador al menos dos veces,

repitiendo el procedimiento de centrifugar y eliminar el sobrenadante, eliminando restos celulares que causen interferencias en la correcta visualización de los cromosomas.

Finalmente se procede a la preparación de los extendidos. Se procede a gotear sobre su superficie la solución fijadora que contiene los cromosomas de aquellas células que fueron detenidas en metafase de la división celular. Una vez secos los portaobjetos, se los identifica y se realiza la tinción con una solución de Giemsa al 10% durante 10 minutos.

Análisis de las metafases al microscopio óptico

El análisis de los preparados se lleva a cabo en microscopio óptico en magnificación 100x y todas las alteraciones cromosómicas detectadas se deben re-analizar por un segundo observador. Mediante la codificación de los portaobjetos se evita el reconocimiento de la identidad del preparado para asegurar de este modo la objetividad del análisis. Se calcula el índice mitótico (número de metafases por cada 1000 células observadas) para cada tratamiento. Al menos 100 metafases se deben observar para cada tratamiento en busca de alteraciones numéricas (aneuploidías) o morfológicas, indicadoras de efecto clastogénico sobre los cromosomas. Las alteraciones se clasifican de acuerdo al ISCN 2009 en roturas (breaks), pudiendo éstas involucrar a ambas cromátidas (chromosome break-chrb) o a una sola cromátida (Chromatide break-chtb); lesión acromática (gaps), de tipo cromátida (chtg) y de tipo cromosoma (chrg); anillos (r), dicéntricos (dic), fragmentos acéntricos (acentric fragments-ace), células endoreduplicadas (tetraploides), etc. (Figura 1). Las células con menos de 44 cromosomas no son incluidas en el análisis.

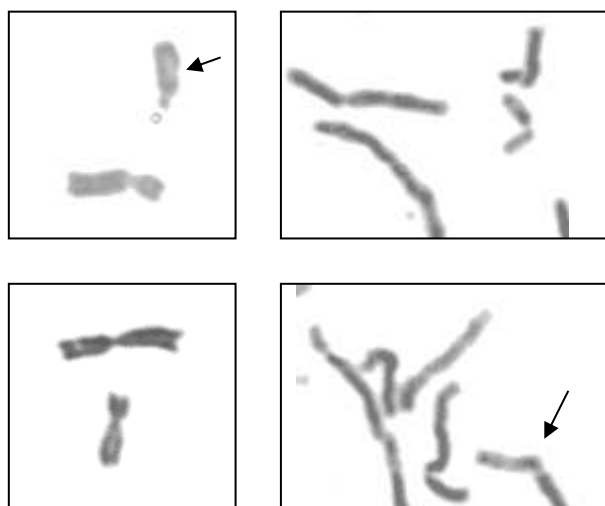


Fig. 1. Microfotografía de cromosomas con aberraciones.

(Foto Fernando Mañas).

Las flechas señalan rupturas y gaps de una o dos cromátidas.

2-Ensayo de Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH)

Alícuotas de 0,8 ml de sangre heparinizada se cultivan durante 72 horas a 37° C. La sangre entera heparinizada (0,8 ml.) es resuspendida en 8 ml. de medio de cultivo RPMI 1640, suplementado con un 20% de Suero Fetal Bovino y 0,3 ml de bromodeoxiuridina empleando tubos estériles de polipropileno de 15 ml con tapa a rosca. Las células son estimuladas a entrar en mitosis mediante el agregado de Fitohemaglutinina (20µg/ml). La división celular se detiene en metafase empleando Colchicina a una concentración final de 0,4 µg/ml. Luego de una incubación a 37° C durante 25 minutos en presencia de Colchicina, los tubos son centrifugados durante diez minutos a 3000 rpm. Una vez obtenida la separación de las células que quedaron retenidas en el pellet dentro del tubo de centrífuga, se descarta el sobrenadante, el cual se sustituye por una solución hipotónica de CLK, homogeneizando cuidadosamente el contenido a fin de provocar el shock osmótico celular. Tras una nueva incubación durante 25 minutos a 37° C en estufa, los tubos se centrifugan nuevamente. Esta vez el sobrenadante es reemplazado por una solución de Metanol y Ácido Acético en una proporción de 3:1, homogeneizando nuevamente las células separadas por centrifugación con el fijador, con el que deben permanecer en contacto al menos durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se renueva el fijador al menos dos veces, repitiendo el procedimiento de centrifugar y eliminar el sobrenadante, eliminando restos celulares que causen interferencias en la correcta visualización de los cromosomas.

Finalmente se procede a la preparación de los extendidos. Se gotea sobre la superficie la solución fijadora que contiene los cromosomas de las células que fueron detenidas en metafase de la división celular. Una vez secos los portaobjetos, se los guardan durante 24hs en oscuridad. Para teñir se utiliza una solución de fluorocromo Hoeschst 33258 en la que se sumergen los preparados durante 30 minutos en completa oscuridad. Una vez transcurrido este tiempo se enjuagan con agua corriente, se secan al aire para exponerlos a la luz ultravioleta cubiertos con buffer de fosfatos y cubreobjetos, durante dos horas. Se enjuagan con agua corriente, se secan al aire y se tiñen con una solución 1:5 de Giemsa durante 2-4 minutos.

Análisis de las metafases al microscopio óptico

El análisis de los preparados se lleva a cabo en microscopio óptico en magnificación 100x. Se cuentan, en cada portaobjeto codificado, la cantidad de ICH por metafases (Figura 2), en al menos 50 metafases con más de 44 cromosomas.

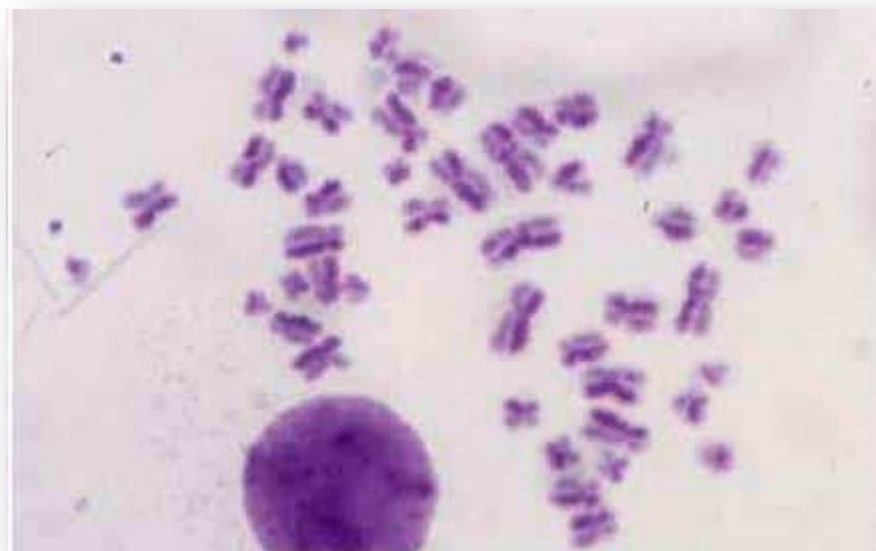


Fig. 2 Microfotografía que muestra una metafase con la técnica de ICH

IMAGEN TOMADA de: <http://www.udc.es/gen/dicomosa/linea2.htm>

3-Ensayo de Micronúcleos en médula ósea de ratón

Se sacrifican los animales y se les extraen los fémures. Para la extracción de la médula ósea se procede a la limpieza del fémur con gasa a fin de separar los tejidos del hueso. El contenido del canal medular se extrae por la presión ejercida en su interior mediante la descarga en uno de sus extremos del Suero Fetal Bovino contenido en una jeringa de tuberculina. De este modo, la médula ósea se deposita en tubos eppendorfs con un volumen final de 400 µl. de Suero Fetal Bovino. Tras una cuidadosa homogeneización del tejido con el suero fetal bovino, estos tubos eppendorfs se centrifugan a 1000 rpm durante 5 minutos. Se retira el sobrenadante, dejando el precipitado levemente hidratado (Smith, 1975). Finalmente se hace el extendido en portaobjetos limpios previamente identificados y se realiza una tinción de May Grunwald-Giemsa.

Análisis de los micronúcleos al microscopio óptico

La observación se lleva a cabo con los portaobjetos identificados mediante códigos por dos observadores. Se analizan 1000 eritrocitos inmaduros, con un conteo de eritrocitos micronucleados, así como el cálculo de la tasa de eritrocitos policromatófilos/eritrocitos normocrómicos (Figura 3).

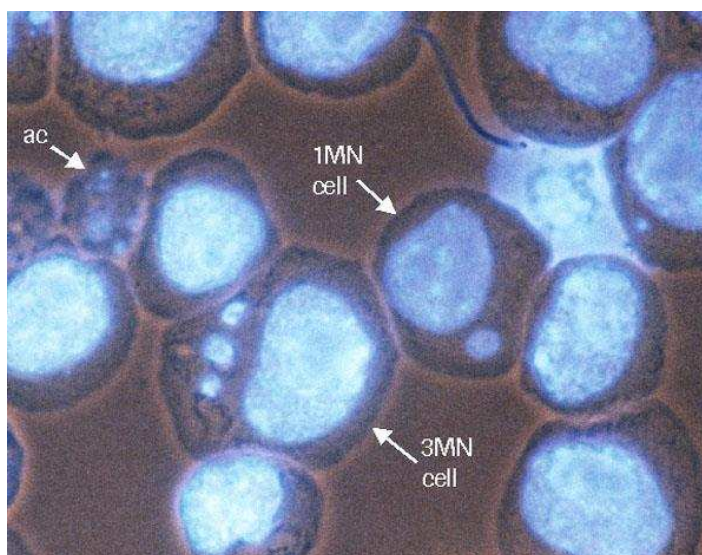


Fig. 3. Microfotografía que muestra células de médula ósea de ratón.

IMAGEN TOMADA de: http://www.roche.com/pages/facets/15/genotoxicology_2.jpg

Las flechas indican células con 3 y 1 MN.

4-Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de anfibios

Se obtiene una muestra de sangre de la vena angularis a través de una pequeña incisión en la comisura de la boca de cada animal. Las muestras de sangre periférica se dejan gotear sobre un portaobjeto de cristal limpio. Los extendidos obtenidos son secados a temperatura ambiente y se colorean con May Grunwald-Giemsa.

Análisis de los micronúcleos al microscopio óptico

Los preparados se observan con microscopio óptico, con una resolución de 100x con objetivo de inmersión. Los frotis se numeran. La presencia de micronúcleos se cuantifica en 2500-7500 eritrocitos por animal, a ciegas, por un solo observador, para calcular la frecuencia de micronúcleos (Figura 4).

La frecuencia se expresa en número de eritrocitos micronucleados por mil eritrocitos analizados ($MN = \frac{n^{\circ} \text{ de eritrocitos micronucleados}}{n^{\circ} \text{ total de eritrocitos}} \times 1000$)

Se aplican los siguientes criterios para la identificación de micronúcleos: el diámetro del micronúcleo deberá ser menos de un tercio del núcleo principal; los micronúcleos deberán encontrarse separados del núcleo principal; los micronúcleos deberán tener la misma refringencia y la misma coloración que el núcleo principal (Zoll-Moreux y Ferrier, 1999).

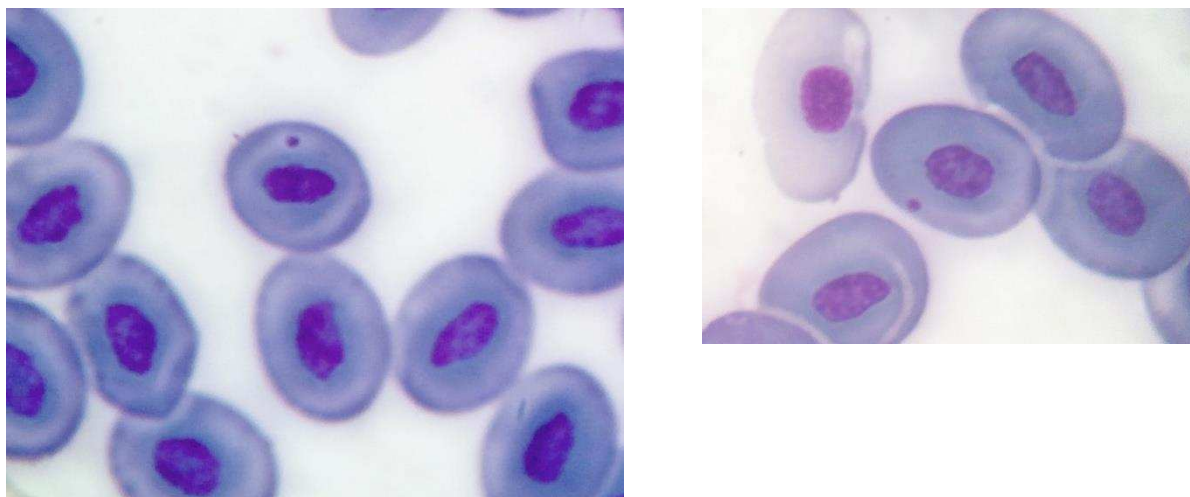


Fig. 4.: Microfotografías que muestran eritrocitos de *Chaunus arenarum* con micronúcleos
(Foto Beatriz Bosch).

5- Ensayo de Micronúcleos en sangre (CBMN)

(OECD Test guideline 487, In Vitro Micronucleus test. 2004)

Alícuotas de sangre periférica se obtienen por venopunción con jeringa estéril heparinizada. Se efectúa un cultivo celular de linfocitos humanos durante 72 horas a 37°C de acuerdo a los métodos convencionales (Moorhead *et al.*, 1960). La sangre heparinizada (8 gotas) se suspende en 4 ml de medio de cultivo RPMI 1640, suplementado con 1 ml de suero bovino fetal empleando tubos estériles de polipropileno de 15 ml con tapa a rosca. Las células son estimuladas a entrar en mitosis mediante el agregado de fitohemaglutinina (0.15 ml). A las 44 horas de cultivo se le agrega Citocalasina B en una concentración de 4 µg/ml. A las 72 horas de incubación (28 horas después del agregado de citocalasina B, los tubos se centrifugarán durante 10 minutos a 3000 rpm. Una vez obtenida la separación de las células que quedaron retenidas en el pellet dentro del tubo de centrífuga, se descarta el sobrenadante, el cual es sustituido por solución hipotónica de CLK, homogeneizando cuidadosamente el contenido a fin de provocar el shock osmótico celular y dejando incubar por 5 minutos. Luego los tubos se centrifugan nuevamente y esta vez el sobrenadante se reemplaza por una solución de Acido acético y Metanol en una proporción de 1:3, homogeneizando las células separadas por

centrifugación con el fijador, con el cual deberá permanecer en contacto al menos 24 horas. Transcurrido ese tiempo, se renueva el fijador al menos 2 veces, repitiendo el procedimiento.

Finalmente, se procede al preparado de los extendidos. Con los portaobjetos, se procede a gotear sobre su superficie la solución fijadora que contiene las células. Una vez secos los portaobjetos, se los identifica y se realiza la tinción con una solución de Giemsa al 10% durante 10 minutos.

Análisis de las células al microscopio óptico

Se analiza la frecuencia de micronúcleos en 1000 células binucleadas. Los preparados se observan con microscopio óptico, con una resolución de 100x con objetivo de inmersión. Los frotis se numeran.

Las condiciones óptimas en este tipo de ensayo requieren un porcentaje de células binucleadas entre 30-60% sobre células viables.

Formación de micronúcleos por acción de la Citocalasina B

A continuación se presenta un esquema tomado de Mutagenesis (July 2005) 20 (4): 255-269, que muestra a) origen de MN a partir de cromosomas y fragmentos acéntricos b) formación de puentes nucleoplásmicos a partir de un cromosoma dicéntrico.

En la siguiente figura se presentan las posibles vías que puede seguir linfocitos en cultivo bloqueados con citocalasina, expuestos a agentes citotóxicos/ genotóxicos o deficiencia de nutrientes. Utilizando los biomarcadores dentro del ensayo CBMN es posible medir la frecuencia de roturas cromosómicas (MN), pérdida de cromosomas (MN), rearrreglos cromosómicos, por ej. cromosomas dicéntricos (NPB), amplificación génica (brotes nucleares), necrosis y apoptosis. El efecto citostático se estima a partir de la relación mono. Bi y multinucleados.

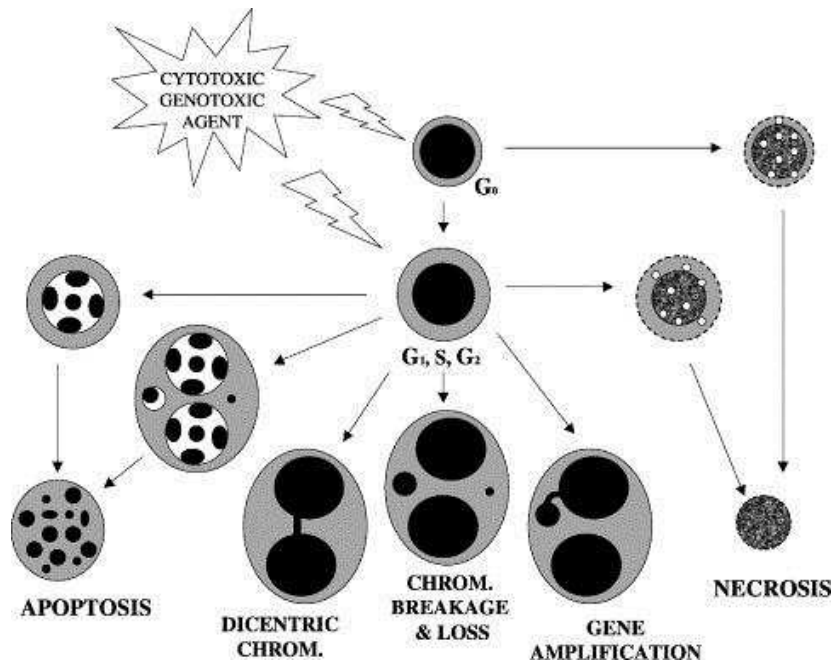


IMAGEN TOMADA de Mutagenesis (July 2005) 20 (4): 255-269.doi: 10.1093/mutage/gei040

Ensayo de micronúcleos en mucosa bucal

Se recolecta con una paleta bajalengua 2 muestras de epitelio oral realizando un frotis en la pared interna de ambas mejillas, después de un enjuague bucal con agua, que se dejan secar a temperatura ambiente.

El preparado se fija en etanol: ácido acético 3:1 de durante 1 hora y se deja secar a temperatura ambiente. Se realiza la hidrólisis en HCL 1N de la siguiente manera: 5 minutos a temperatura ambiente, 10 minutos a 60° C y 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente de acuerdo a la técnica de Tolbert (1991), los extendidos se colorean en vasos de Coplin con agua fría (5° C) durante 5 minutos con el objetivo de cortar la hidrólisis. Se dejan secar y se colocan las muestras hidrolizadas, en fuscina básica durante 20 minutos en ausencia de luz.

Se lavarán los extendidos con agua corriente, dejándolos secar a temperatura ambiente.

Luego se observan y analizan los preparados en microscopio con magnificación 1000x.

Se identifican además de micronúcleos otras anormalidades, como células binucleadas, en broken eggs, picnosis, cromatina condensada, y diversos estadios de células en apoptosis.

Ensayo de *Allium cepa*

Se deben seleccionar bulbos de cebollas (*Allium cepa* L. –Alliaceae-), de 5 cm de diámetro promedio adquiridos en comercio de venta de hortalizas. Despojar de las catáfilas externas hasta la primer catáfila blanca cada bulbo. Eliminar con un corte neto el brote apical y las porciones necrosadas del disco inferior. Raspar los discos con bisturí (para separar el tejido seco) y eliminar las raíces preexistentes sin destruir los primordios radicales. Lavar los bulbos con abundante agua y colocarlos en vasos plásticos individuales con agua potable durante 48 horas para la inducción de la radiculización, cuidando que la zona radicular (el disco) quede inmersa en el líquido.

El agua se renueva totalmente cada 24 horas, lavando suavemente la porción inferior del bulbo con la misma agua corriente.

Transcurridas 48h, se seleccionan bulbos, tomando como parámetro el buen desarrollo de sus raíces (no importa la medida sino que el crecimiento sea homogéneo).

Los bulbos que no han desarrollado raíces y retener los restantes para el tratamiento se descartan.

Los bulbos se dividen en tantos lotes como sea necesario para el tratamiento, reservando siempre un lote como control negativo. Se sugiere utilizar no menos de 5 bulbos por lote.

Colocar los bulbos en contacto con las distintas soluciones a ensayar por el término de tres días (72 hs). Si el compuesto a ensayar no fuera hidrosoluble, el mismo debe ser solubilizado con Dimetil sulfóxido (DMSO) y esta mezcla deberá ser agregada en la misma proporción que el control negativo. El ensayo se inicia con el llenado de los vasos (rotulados) con cada una de las diferentes soluciones a evaluar y con los respectivos controles cuidando que la zona radicular quede inmersa en el líquido.

Las soluciones de prueba y la de los controles tanto negativo como positivo se renuevan cada 24 horas.

Transcurridas 48h se cortan 3 raíces por bulbo, se fijan en CARNOY (etanol- ácido acético 3:1) durante 12 a 15 horas, en heladera. Luego se colocan en etanol al 70 % a 4 o 5 grados C (en heladera), por un mínimo de 24 horas, hasta el momento de su estudio.

Los bulbos en tratamiento se mantienen hasta completar 5 días con los cambios de solución de ensayo respectivos, renovando las soluciones cada 24hs.

Se retiran todos los bulbos de las diferentes soluciones, se cortan por su base todas las raíces de cada bulbo y proceder al estudio de los Parámetros Macroscópicos: longitud de las raíces, cuantificación y tipificación de las anomalías apicales tales como ganchos, tumores, necrosis, estrías, coloración y gelatinización.

En el momento de realizar el estudio: retirar las raíces del etanol en el que se hallan conservadas y colocarlas debajo de la lupa

Quitar la cofia y cortar los 2 mm terminales (zona meristemática, que se distingue por ser más blanca) con la ayuda de una aguja de disección

Lavar los meristemas con agua destilada durante 10 minutos con el fin de eliminar el fijador.

Hidrolizar los meristemas en 30 ul de HCl 1N durante 7 minutos, con el fin de que el tejido radical se ablande.

Lavar nuevamente con agua destilada para eliminar el HCl durante 10 minutos. Es muy importante este paso, ya que el HCl interfiere con la coloración de los cromosomas.

Transferir los meristemas a un portaobjeto y se agregará 30 ul del colorante Orceína acetoclorhídrica al 2 % por el intervalo de 5 minutos aproximadamente, cuidando que el material no se seque y monitoreando bajo la lupa el avance del proceso de coloración. Mientras el colorante actúa realizar la maceración con una varilla de vidrio esmerilada, para disgregar el tejido meristemático (por degradación de la lamela media de la pared celular) y permitir una buena separación de las células.

Colocar sobre el material coloreado uniformemente y disgregado un cubreobjetos evitando la entrada de aire y el movimiento lateral del mismo, ya que genera el enrollamiento de las células, generando la pérdida de la preparación.

Realizar el SQUASH (aplastamiento mecánico), realizar este proceso 2 minutos.

Rotular los preparados y se sellarlos con cera vegetal. Conservar en recipientes de plástico a 5 grados C hasta el momento de su lectura.

Análisis

Se analizan 1000 células por ápice y se determinarán los siguientes parámetros:

- Índice Mitótico= $\frac{\text{Número de células en división}}{\text{Número de células totales}} \times 100$.
- Índice de Fases= $\frac{\text{Número de células en cada fase}}{\text{Número total de células en división}} \times 100$.
- Cuantificación de anomalías de cada fase y totales.
- Tipificación de anormalidades: cromosomas arrestados, pegajosos, c-mitosis, “vagrant”, puentes cromosómicos, entre otros.

ACTIVIDADES DE COMPRENSIÓN

Para construir comprensión sobre los contenidos desarrollados en este capítulo se presentan actividades que permiten:

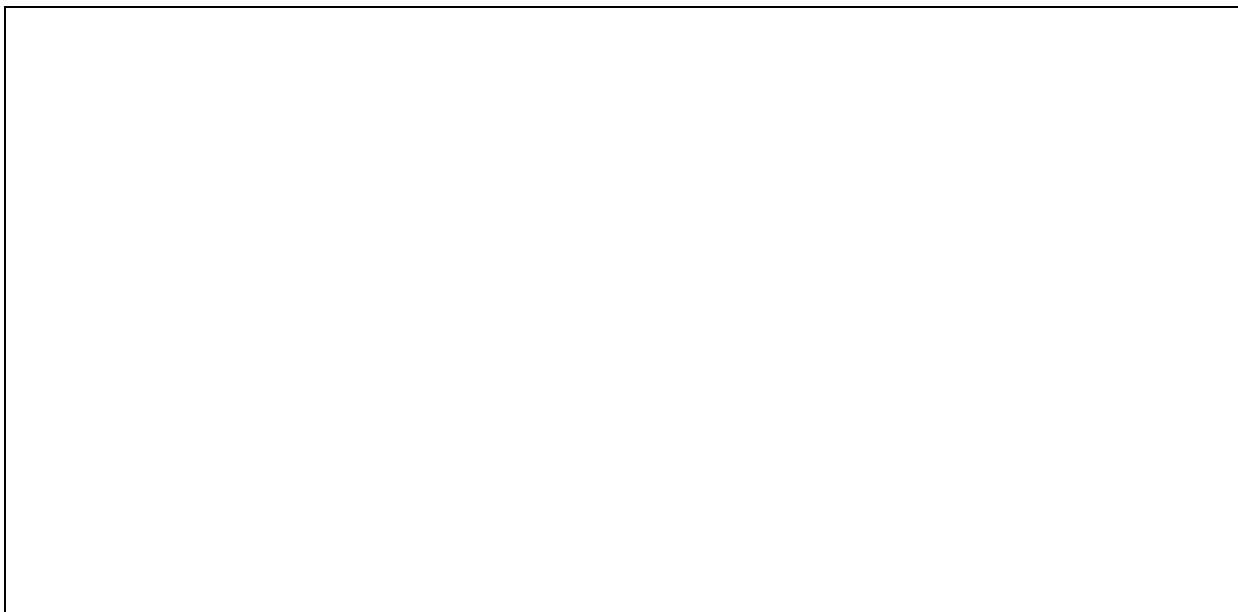
- Identificar aberraciones cromosómicas (AC), intercambio de cromátidas hermanas (ICH) y micronúcleos (MN) en diferentes preparados
- Interpretar los resultados de los ensayos de genotoxicidad a corto plazo

1. Elaboración de extendidos de MN en mucosa bucal

- Sigue el protocolo que se encuentra en este capítulo: toma una muestra de células de tu mucosa bucal, sigue el procedimiento indicado y realiza los extendidos.
- Elabora un texto explicativo con los fundamentos de cada paso del procedimiento aplicado

2. Observación al microscopio

- a) Recorre en 40X los extendidos realizados y extendidos de AC, ICH y MN en sangre
- b) Analízalos en 100X
- c) Esquematiza en los espacios siguientes células con micronúcleos, ICH y alguna aberración cromosómica



- Observa la Fig. 2 (metafase con la técnica de ICH) e indica el número de ICH que presenta la célula.

d) Aplicación de los ensayos de genotoxicidad

- Escribe ejemplos de sustancias tóxicas que hayan sido evaluadas a partir de cada uno de los ensayos descritos anteriormente.
- Consulta detenidamente el listado de agentes carcinógenos, extraído de: (<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>) que encuentras al principio del capítulo y contesta las siguientes preguntas:
 - a) Del grupo 1 de la IARC ¿cuáles son los agentes que pueden estar relacionados en el futuro con tu práctica profesional?
 - b) Del Grupo 1 de la IARC ¿cuáles son los agentes con los que puedes interactuar en tu vida cotidiana?
 - c) Del grupo 1 de la IARC ¿cuáles son compuestos químicos, agentes infecciosos y agentes físicos? Indica al menos 3 de cada uno.
- Analiza las siguientes tablas y luego responde los interrogantes que se presentan a continuación de las mismas:

Tabla I: Aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos cultivados con el herbicida glifosato. n= 6 dadores sanos de ambos sexos para cada tratamiento.

Treatment	ctb	csb	ctg	csg	dic	ace	end	Aberrant cells (%) with gaps	Aberrant cells (%) without gaps	Mitotic index
Without	1.6 ± 1.5	0.0 ± 0.0	2.0 ± 2.3	0.6 ± 0.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.4	4.4 ± 1.4	2.2 ± 0.7	7.0 ± 3.2
Mitomycin C 0.89 µM	23.5 ± 9.2	18.0 ± 15.6	3.0 ± 4.2	4.0 ± 2.8	0.0 ± 0.0	27.0 ± 26.0	0.0 ± 0.0	50.3 ± 25.2*	48.3 ± 38.3*	3.5 ± 2.1
Glyphosate 0.20 mM	1.3 ± 1.1	0.3 ± 0.6	2.7 ± 3.0	0.3 ± 0.6	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.2	0.0 ± 0.0	5.0 ± 2.6	2.3 ± 1.2	13.0 ± 2.8
Glyphosate 1.20 mM	2.0 ± 1.3	0.5 ± 0.8	2.2 ± 1.9	0.7 ± 0.6	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.2	1.0 ± 0.9	6.8 ± 1.6	4.0 ± 0.7	10.3 ± 4.5
Glyphosate 6.00 mM	1.3 ± 0.8	0.1 ± 0.4	1.8 ± 1.5	0.7 ± 1.2	1.7 ± 0.4	1.7 ± 0.4	0.5 ± 0.4	5.4 ± 1.0	2.6 ± 0.4	6.0 ± 1.9

Tomado de Mañas *et al.*, 2009

Tabla II: Numero de eritrocitos micronucleados (MNE)/ 1000 eritrocitos analizados y relación eritrocitos policromaticos/ eritrocitos normocromaticos

	MNE/1000 erythrocytes	PCE/NCE
Saline solution	3.8 ± 0.8	0.85 ± 0.17
Cyclophosphamide 20 mg/kg	19.2 ± 3.9*	0.80 ± 0.20
Glyphosate 100 mg/kg (2 × 50 mg/kg)	3.7 ± 0.5	0.77 ± 0.09
Glyphosate 200 mg/kg (2 × 100 mg/kg)	4.2 ± 0.5	0.89 ± 0.17
Glyphosate 400 mg/kg (2 × 200 mg/kg)	13.0 ± 3.5*	0.84 ± 0.15

Tablas TOMADAS DE Mañas *et al.*, (2009)

- ¿Los resultados obtenidos con mitomicina y ciclofosfamida son significativamente diferentes a los obtenidos con glifosato?
 - ¿Qué rol cumplen la mitomicina C y la ciclofosfamida en estos estudios?
 - ¿Ambos compuestos están incluidos en el grupo 1 de la IARC?
 - ¿En cuáles de los ensayos y en que concentraciones el glifosato produjo genotoxicidad?
 - ¿Cuál es la utilidad de analizar el índice mitótico en el ensayo de la tabla I?
 - Compara la significancia de uno y otro ensayo. Elabora una conclusión en relación a la comparación.
- Se desea estudiar el material genético de una población de hombres y mujeres (entre 25-40 años) que no se dedican a tareas rurales pero que viven entre 10 y 200 m de zonas donde se realizan pulverizaciones con agroquímicos ocho meses al año:
- ¿Qué ensayo/s de genotoxicidad sugerirías para este estudio? Fundamenta tu respuesta
 - Elabora un breve protocolo de trabajo donde indiques al menos el número de individuos a estudiar, criterios para la selección de los participantes, toma de los datos, estudios a realizar, información de los mismos.

Bibliografía de consulta

1. Aiassa D y N. Gorla. 2010. Los plaguicidas. Su relación con la salud humana y ambiental en la Provincia de Córdoba, *Experiencia Médica* 28: 39-44, 2010.
2. Albertini RJ, D Anderson, GR Douglas, L Hagmar, K Hemminki, F Merlo, AT Natarajan, H Norppa, DEG Shuker, R Tice, MD Waters, A Aitio. 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research* 463: 111-172.
3. Bosch B, F. Mañas, N. Gorla y D. Aiassa. 2011. Micronucleus test in post metamorphic *Odontophrynus cordobae* and *Rhinella arenarum* (Amphibia: Anura) for environmental monitoring, *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences*, 3, 155-163
4. Gentile, N., F. Mañas, B. Bosch, L. Peralta, N. Gorla y D. Aiassa. 2012. Micronucleus assay as a biomarker of genotoxicity in the occupational exposure to agroquímicos in rural workers. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 88(6): 816-822.
5. Gorla, N. B. M. 2006. Efectos tóxicos sobre el material genético, mutagénesis y carcinogénesis, Imprenta de la Universidad Juan Agustín Maza, Mendoza, pp.53.
6. Gorla, N. B., M. M. Bonduel, A. F. Fundia, H. Lejarraga, F. Sackman Muriel e I. Larripa. 1990. Síndrome de Bloom en Argentina. Presentación de dos casos, *Medicina*. 50: 89-90.
7. Gorla, N. B., M. M. Bonduel, H. Lejarraga, F. Sackman Muriel e I. Larripa. 1989. Síndrome de Bloom. Inestabilidad genética constitucional e inducida en dos casos de Argentina. *Sangre* 34: 475-480.
8. Gorla, N. B., J. A. Castro. 1985. MN formation in bone marrow of mice treated with NFX or BZ, *Toxicology Letters* 25: 259-263
9. Gorla, N. B. e I. Larripa. 1990. Daño genético inducido por el tratamiento con fármacos antischistosomal, *Archivos Argentinos de Pediatría* 88:79-83.
10. Gorla, N. B. e I. Larripa. 1991. Lack of sensitivity of SCE for chromosomal damage detection caused by antischistosomal treatment, *Toxicology Letters* 58:225-230.
11. Gorla, N. B., O. S. Ledesma, P. Barbieri, e I. Larripa. 1988. Assessment of cytogenetic damage in schistosomal childrens treated with benznidazole, *Mutation Research* 206: 217-220.
12. Gorla, N. B., O. S. Ledesma, P. Barbieri, e I. Larripa. 1989. Thirteen fold increase of chromosomal aberrations non randomly distributed in schistosomal children treated with nifurtimox, *Mutation Research* 224: 263-267.
13. Gorla, N. B. 1987. Sister chromatid exchange in splenic lymphocytes of mice after exposure to NFX and BZ, *Mutation Research* 188: 129-133.

14. Gorla, N., H. García Ovando e I. Larripa. 1999. Chromosomal aberrations in human lymphocytes exposed to enrofloxacin and ciprofloxacin, *Toxicology Letters* 104: 43- 48.
15. Hagelstrom, A., N. Gorla e I. Larripa. 1995. Chromosomal damage in occupationally exposed workers to chronic low level ionizing radiation, *Toxicology Letters* 76: 113-117.
16. Mañas, F. J., M. Gonzalez Cid, I. A. Weyers, L. Ugnia, H. García Ovando, I. Larripa y N. B. Gorla. 2007. Evaluación de genotoxicidad in vivo mediante el ensayo cometa y de micronúcleos en ratones tratados con glifosato, *Theoria* 15: 53-60.
17. Mañas, F., L. Peralta, N. Gorla, B. Bosch y D. Aiassa. 2009. Aberraciones cromosómicas en trabajadores rurales de la Provincia de Córdoba expuestos a plaguicidas. *BAG, J. basic appl. genet.*[online]. ISSN 1852-6233
18. Mañas, F., L. Peralta, J. Raviolo, H.García Ovando, A. Weyers, L. Ugnia, M. Gonzalez Cid, I. Larripa y N. Gorla. 2009. Genotoxicity and oxidative stress of glyphosate in vivo and in vitro testing, *Environmental Toxicology and Pharmacology* 28: 37-41 -ISI 1382-6689.
19. Mañas, F., L. Peralta, J. Raviolo, H.García Ovando, A. Weyers, L. Ugnia, M. Gonzalez Cid, I. Larripa y N. Gorla. 2009. Genotoxicity of AMPA, environmental metabolite of Glyphosate, assessed by the comet assay and cytogenetic tests, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 834- 837.- ISI 0147-6513.
20. Mateuca R, N Lombaert, PV Aka, I Decordier, M Kirsch-Volders. 2006. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie* 88: 1515-1531.
21. Mudry, M. D. y M. A. Carballo. 2006. *Genética Toxicológica*. Ed De los cuatro vientos. Buenos Aires, Argentina. Pp 669.
22. Nordberg, G. F. 2010. Biomarkers of exposure, effects and susceptibility in humans and their application in studies of interactions among metals in China. *Toxicology Letters* 192:45–49.

