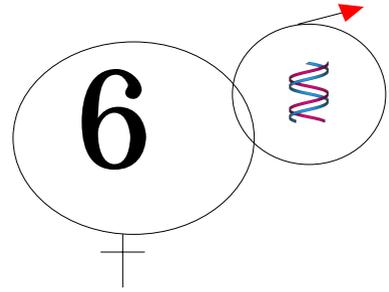


LOS CROMOSOMAS HUMANOS Y SU ESTUDIO

Araceli Lantigua Cruz



Existen varios enfoques sobre el estudio de los cromosomas humanos, que dependen del nivel de profundidad de lo que se quiere conocer, la urgencia del estudio y de los recursos técnicos con los que se cuenta para hacer el estudio.

Las fases del ciclo celular de una célula somática, pueden ser clasificados desde el punto de vista citológico en dos grandes momentos de estadio celular: la interfase y la mitosis. Tanto en una como en la otra es posible obtener información sobre los cromosomas humanos. En la interfase, que comprende los estadios G1, S y G2, la información se obtiene por las características de la cromatina nuclear y está relacionada específicamente con los cromosomas humanos X y Y.

Durante la mitosis es posible conocer muchos más detalles de cada uno de los 46 cromosomas humanos. En el Capítulo 1 de este texto se abordaron aspectos relacionados con la historia de la citogenética, en el presente capítulo se exponen los fundamentos de las técnicas citogenéticas con el propósito de comprender sus resultados e interpretaciones.

CROMATINA NUCLEAR

La molécula de ADN de un cromosoma existe como un complejo formado por una familia de proteínas básicas cromosómicas denominadas histonas y de un grupo heterogéneo de proteínas ácidas no histonas que, a pesar de que se encuentran menos caracterizadas, tienen un importante papel en la estructura y expresión apropiada de los genes. La cromatina nuclear depende entonces, del estado de condensación y descondensación del ADN. Hay dos formas de cromatina de acuerdo con lo hasta aquí descrito: la eucromatina, en un estado de condensación que permite la expresión génica, y la heterocromatina en un estado mucho más condensado que, atendiendo a sus características de activación o inactivación, se clasifica en dos grupos:

- la constitutiva, siempre inactiva y que se encuentra en sitios específicos de la estructura de los cromosomas.

- la facultativa, que puede existir en forma genéticamente activa (descondensada) o en forma inactiva y condensada situación ésta propia del cromosoma X.

LOS CROMOSOMAS

En la división celular o mitosis, la información es más completa y se extiende al estudio de cada par cromosómico, por lo que es posible analizar el complemento cromosómico, tanto desde el punto de vista numérico como estructural.

Como la mitosis comienza al finalizar el periodo G2 del ciclo de vida celular, al que a su vez le antecede la síntesis del ADN, los cromosomas siempre estarán constituidos por dos cromátidas (expresión citológica de la síntesis de ADN), unidas por una constricción primaria o centrómero y por extremos denominados telómeros.

Cada especie presenta un número haploide constante de cromosomas y a su vez un número diploide en el que cada par cromosómico se caracteriza por una estructura constante.

En los cromosomas humanos se destacan tres tipos, de acuerdo con la posición del centrómero y la longitud de las cromátidas. La posición del centrómero divide al cromosoma en dos regiones denominadas brazos y que son designados como cortos p (del francés petit: pequeño) y largos q (siguiente letra del alfabeto después de la p) (Figura 6.1).

Así, los cromosomas humanos son clasificados de acuerdo con la posición del centrómero en:

- Metacéntricos, cuando el centrómero está muy próximo al centro y ambos brazos, cortos y largos, impresionan de igual longitud.
- Submetacéntricos, cuando el centrómero está desplazado hacia un extremo identificándose brazos cortos y brazos largos.
- Acrocéntricos, cuando el centrómero está muy desplazado hacia un extremo, siendo los brazos cortos extremadamente pequeños.

En el humano hay cinco pares de cromosomas autosómicos, acrocéntricos, y todos presentan satélites. Los satélites son estructuras redondas unidas a los brazos cortos de estos cromosomas por una fina constricción secundaria denominada tallos. Los tallos de estos cinco pares de cromosomas humanos, contienen cientos de copias de genes que codifican ARN ribosomal, por lo que se dice que contienen ADN relacionado con el organizador nucleolar. El cromosoma Y por su estructura, es también acrocéntrico, pero en sus brazos cortos hay genes muy importantes que permiten la unión al cromosoma X durante la meiosis I y otros genes involucrados en la diferenciación sexual, y a diferencia

de los acrocéntricos autosómicos, no tiene satélites y en sus brazos largos presenta una zona extensa de heterocromatina constitutiva.

Hay un cuarto tipo de cromosoma denominado telocéntrico, con el centrómero tan desplazado hacia un extremo que los brazos cortos no se observan. Este tipo de cromosoma no es característico del humano y una estructura similar pudiera observarse en cromosomas humanos productos de rearrreglos estructurales que serán estudiados más adelante.

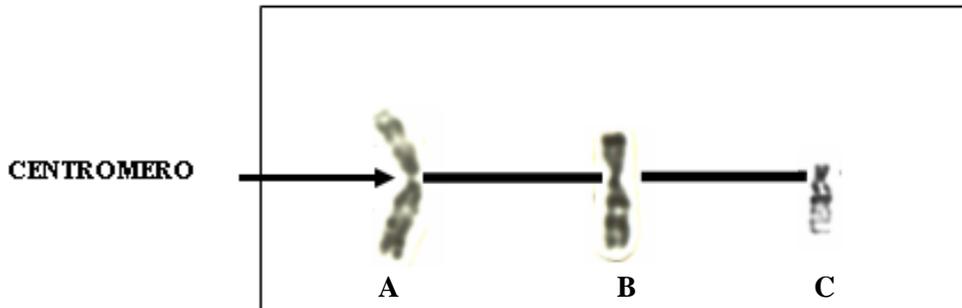


Figura 6.1 Tipos de cromosomas humanos según posición del centrómero. A: metacéntrico, B: submetacéntrico y C: acrocéntrico.

ESTUDIO DE LOS CROMOSMAS HUMANOS EN CÉLULAS EN INTERFASE: CROMATINA SEXUAL

Estudio del cuerpo Y

El cromosoma Y puede ser identificado en células en interfase tratando una extensión de un tejido con colorantes fluorescentes. El tejido obtenido se coloca sobre un portaobjeto para ser coloreado. La muestra puede ser obtenida por medio de raspado de la mucosa bucal. Este tipo de colorante tiñe intensamente la región de heterocromatina constitutiva que caracteriza al ADN de los brazos largos del cromosoma Y, observable sólo con el uso de luz ultravioleta, por lo que se requiere un microscopio con estas características. El cuerpo Y, como se le denomina, sólo es observado cuando el cromosoma Y está presente en el genoma del individuo en estudio, de tal modo que es positivo en las muestras obtenidas de individuos masculinos y negativo en el sexo femenino. También se tiene en cuenta el número de cuerpos Y que se observan por cada núcleo examinado.

Estudio del cromosoma X

En el texto ya se ha tratado sobre el fenómeno de inactivación (heterocromatina facultativa) de uno de los dos cromosomas X en estadios tempranos de preimplantación del cigoto.

En el año 1949, dos investigadores Barr y Bertran, observaron diferencias entre los núcleos de las células de tejido nervioso de los animales sobre los que realizaban sus experimentos. A partir de esta observación, comenzaron a realizarse investigaciones que permitieron identificar el hallazgo de estos investigadores con la inactivación de uno de los cromosomas X en el sexo femenino.

Como para el estudio del cuerpo Y, la muestra se obtiene de raspado de la mucosa bucal y a diferencia del estudio del cuerpo Y, la coloración puede realizarse con colorantes habituales y la observación bajo microscopio común. En el núcleo se observa una pequeña masa heterocromática, en forma convexa con uno de sus lados como fijado a la envoltura nuclear que se tiñe más intensamente (Figura 6.2).

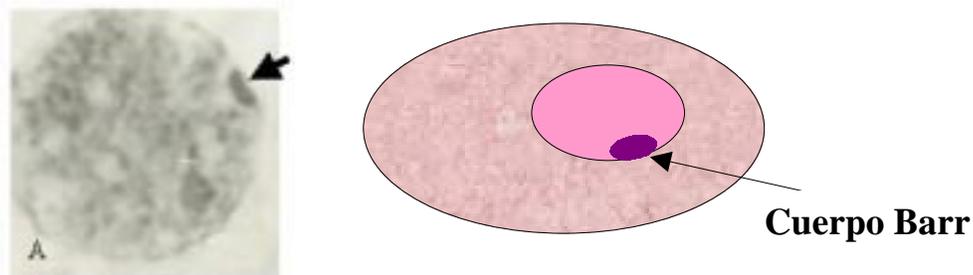


Figura 6.2. A. Foto de un núcleo en interfase con el cuerpo de Barr señalado por la flecha. B. Esquema de la imagen de un cuerpo Barr en el núcleo de una célula epitelial.

La mujer presenta en el análisis de 100 células, aproximadamente un 40% de células en las que se observa un cuerpo Barr, que corresponde con el número de cromosomas X-1.

El estudio de la cromatina sexual para análisis del cuerpo Barr, constituye una técnica sencilla, económica, rápida de realizar y muy útil para identificar la presencia del cromosoma X en recién nacidos con genitales externos no bien definidos, y que requieren de un diagnóstico rápido, niñas con baja talla, individuos femeninos o masculinos con historia de infertilidad o el sexo de deportistas femeninos de alto rendimiento.

EL CARIOTIPO HUMANO

Generalidades técnicas del análisis de los cromosomas humanos

A diferencia de la cromatina sexual que su estudio puede realizarse en células en interfase, los cromosomas humanos requieren de la obtención de divisiones celulares.

A finales de la década del 50 del siglo pasado, se desarrollaron técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* que permitieron identificar el número preciso de cromosomas del humano.

En la actualidad, el estudio cromosómico es una técnica de avanzada bastante común. Puede realizarse en diferentes tipos de tejidos como piel, cartílago, médula ósea, sangre, células de diversos órganos, tejidos fetales y trofoblásticos, incluyendo el líquido amniótico.

Por su fácil obtención, la sangre periférica se ha convertido en el tejido más utilizado para los estudios cromosómicos corrientes. El término empleado para referirse al estudio de los cromosomas humanos es el de cariotipo.

El cariotipo se define como la culminación del ordenamiento de los cromosomas humanos según su forma y la posición de su centrómero, en grupos que van de la A a la G, y en pares del uno al veintidós, recortando los cromosomas a partir de una fotografía.

Pero también este término suele emplearse para referirse al conjunto de cromosomas de un individuo o al conjunto de cromosomas de una especie, por ejemplo "el cariotipo de un hombre o mujer" o el "cariotipo humano".

En la actualidad se cuenta con sistemas automatizados que permiten la confección del cariotipo automáticamente, una vez que a través del sistema de lentes del microscopio, y a partir de una lámina portaobjeto previamente preparada, se capta la imagen de la metafase que se desee estudiar (Figura 6.3).

Existe un sistema internacional de clasificación de los cromosomas acordado en la Conferencia de París, en el año 1971. Este sistema ha sido enriquecido en la medida en que se han ido perfeccionando las técnicas citogenéticas.

De acuerdo con este sistema internacional cada grupo y par cromosómicos tienen las siguientes características:

- . Grupo A. Está formado por los pares cromosómicos 1, 2 y 3. El 1 y el 3 son ambos metacéntricos, siendo el cromosoma 1 el más grande de los cromosomas humanos y el cromosoma 2, el mayor submetacéntrico .
- . Grupo B. Está integrado por los pares 4 y 5. Ambos submetacéntricos, prácticamente de igual tamaño.
- . Grupo C. Incluye a los pares del 6 al 12 y todos son submetacéntricos.
- . Grupo D. Integrado por los pares 13, 14 y 15. Todos son acrocéntricos, los mayores con esta forma cromosómica, del cariotipo humano. Todos presentan satélites.

- . Grupo E. Está formado por los pares 16, metacéntrico y 17 y 18, ambos submetacéntricos.
- . Grupo F. Incluye a los pares 19 y 20 ambos son los cromosomas metacéntricos más pequeños del cariotipo humano.
- . Grupo G. Está formado por los pares 21 y 22, son los cromosomas acrocéntricos más pequeños, ambos tienen satélites y de ellos el 21 es el más pequeño.
- . El cromosoma X es submetacéntrico y por su tamaño corresponde al grupo C mientras que el cromosoma Y es acrocéntrico, por su tamaño se incluye en el G.

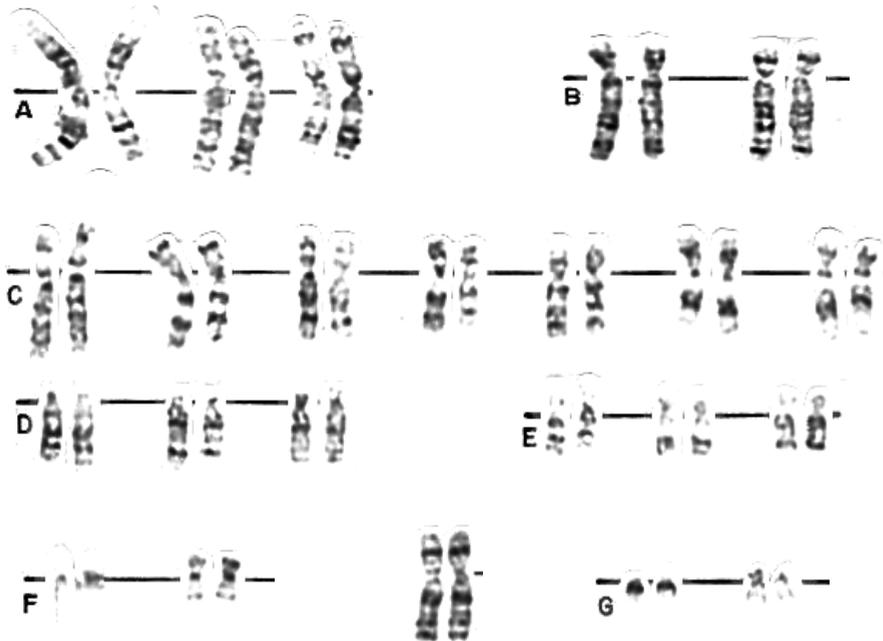


Figura 6. 3 Cariotipo de mujer cromosómicamente normal.

Técnicas para la obtención de cromosomas

El momento del ciclo celular que permite la observación de los cromosomas es la división celular, por lo que, con pocas, muy pocas excepciones, se requiere del cultivo in vitro de tejidos que permitan este tipo de análisis por crecimiento rápido del mismo. El tejido humano de más fácil acceso con estos propósitos es la sangre.

Los componentes celulares de la sangre que se encuentran en mayor proporción son los hematíes, que por su alto grado de especialización han perdido su núcleo y se encuentran en una fase G0 de su ciclo celular por lo que, son los leucocitos y en especial los linfocitos T, las células a partir de las cuales podrá ser posible, bajo la estimulación de la fitohemaglutinina (FHA), que es un agente mitogénico (estimula la mitosis), potencializar la iniciación del ciclo celular. En 24 horas se obtienen nuevas células que ya no requieren de la acción de la FHA.

Se describen varios protocolos de procedimientos técnicos para la obtención de cromosomas, pero todos se basan en los siguientes pasos:

- . Obtención de una muestra de sangre periférica, mezclada con heparina para prevenir la coagulación, y no perder la posibilidad de mantener libres a los linfocitos:
- . Medio de cultivo enriquecido con suplemento exógeno.
- . Uso de FHA, para estimular la mitosis de los linfocitos T.
- . Incubación a 37^o durante 72 horas,
- . Detección de la división celular en metafase con el uso de colchicina, producto que inhibe la formación del huso acromático, incubando a 37^o por varios minutos.
- . Cosechar el cultivo, iniciando este paso, con una primera centrifugación que permita la sedimentación de los elementos formes.
- . Extraer el sobrenadante sustituyéndolo por igual cantidad de una solución hipotónica con lo cual se logra aumentar el volumen celular y separar a los cromosomas lo suficiente para su identificación evitando la sobreposición de los cromosomas.
- . Fijación con ácido acético y metanol, para finalmente depositarlos en gotas sobre una lámina portaobjeto que finalmente será sometida a diversos métodos de coloración.
- . Observación bajo microscopio óptico y análisis del número de metafases estimado según los objetivos del estudio.
- . Fotografía de varias metafases según sea necesario y finalmente la confección de uno o varios cariotipos.

Método de coloración para análisis cromosómico común

Existen diversos métodos de coloración de los cromosomas después de aplicar procedimientos técnicos, que tienen como objetivo común la identificación de cada pareja cromosómica teniendo en cuenta señales que permitan reconocer la estructura longitudinal de cada uno de ellos. A estas técnicas se les conoce como de bandas ya que dejan en

toda la longitud del cromosoma un patrón de señales en forma de bandas que tienen la característica de ser constantes para cada par cromosómico y para cada especie ya que las bandas obtenidas parecen estar relacionadas con regiones del ADN ricas en AT y GC. Los protocolos técnicos empleados con mayor frecuencia en el análisis de los cromosomas humanos son denominados:

Bandas G, refiriéndose a un patrón constante de bandas claras y oscuras como consecuencia del tratamiento de las láminas con soluciones de tripsina y posterior coloración con Giemsa. Este tipo de bandas es el más empleado por los laboratorios que realizan el servicio citogenético de cariotipos corrientes.

Bandas Q, se basan en el uso de colorantes fluorescentes como la quinacrina, y la acción de la luz ultravioleta sobre la metafase en observación. Deja un patrón como el de las bandas G siendo brillantes las bandas que son oscuras y no brillantes las bandas claras. Tienen el inconveniente técnico de necesitar microscopio de fluorescencia.

Bandas R, este patrón de bandas se obtiene al someter las láminas a un proceso de calor que produce un fenómeno de desnaturalización del complejo ADN-proteínas de los cromosomas. Al ser coloreadas las láminas con Giemsa se obtiene un patrón de bandas que son el *reverso* del patrón obtenido en las bandas G y Q, de ahí el nombre de bandas R. Esta técnica se emplea comúnmente por laboratorios de algunos países europeos como Francia.

Existen otros procedimientos especiales, como las *bandas C*, para cuya obtención se emplea un método de coloración que destaca las zonas heterocromáticas de cada cromosoma permitiendo identificar con mayor precisión a los cromosomas de los pares 1, 9 y 16 que presentan una región variable de heterocromatina pericentromérica hacia los brazos largos y al cromosoma Y, que presenta una importante extensión de heterocromatina que ocupa casi los dos tercios del brazo largo hacia el telómero y a la que ya hemos hecho mención (Ver cuerpo Y). Estas regiones de heterocromatina son útiles para reconocer el origen materno o paterno de estos cromosomas cuando se encuentran presentes.

Bandas de alta resolución o prometáfásicos. Este tipo de bandas se utiliza cuando se quiere identificar algún pequeño defecto estructural de un cromosoma. Consiste en aplicar protocolos de bandeado G, Q o R a láminas obtenidas después de tratar los cultivos con sustancias que sincronizan la mitosis con el objetivo de obtener un gran número de células en prometafase tardía o metafases muy tempranas. Los cromosomas se alargan y el patrón de bandas que se obtiene es lo suficientemente grande como para identificar pequeños defectos estructurales. Los cromosomas con este tipo de técnica pueden tener un número de bandas tan grande como de 550 a 850 o más, mientras que con las técnicas de cromosomas en metafase se alcanzan menos de 400 bandas.

No podemos dejar de mencionar a la citogenética molecular, que se basa en el uso de segmentos de ADN complementarios, obtenidos por técnicas de ADN recombinante. Con el uso de estas técnicas, la distancia entre grandes mutaciones cromosómicas y mutaciones de un solo gen se acortan y su uso ha permitido cartografiar grandes genes. Una descripción de este tipo de técnica aparece con más detalles en el Capítulo 7.

Describir el cariotipo de forma resumida ha requerido de un acuerdo entre todos los citogenetistas del mundo. Finalmente se han adoptado un conjunto de abreviaturas y símbolos con los cuales informar lo que se observa en el análisis del cariotipo pero de una forma muy sintética. En la tabla se muestran los principales. Los defectos genéticos expresados se estudian en el Capítulo 8.

TERMINOLOGÍA UTILIZADA PARA LA DESCRIPCIÓN DE LOS CROMOSOMAS Y SUS ANORMALIDADES

Abreviatura	Significado	Ejemplo	Condición
p	Brazo corto		
q	Brazo largo		
cen	Centrómero		
ter	Hacia el telómero		
+	Ganancia	46, XX, + 21	Femenino, Trisomía 21
-	Pérdida	46, XY, 5p-	Masculino deleción brazos cortos del 5
/	Mosaicismo	45,X / 46,XX	Dos líneas celulares.
del	Deleción	46,XX,del (4p)	Femenino, deleción de los brazos cortos del cromosoma 4
dup	Duplicación	46,XY, dup (3p)	Masculino, duplicación de brazos cortos del cromosoma 3
inv	Inversión	46, XX, inv (9)	Femenino con inversión del cromosoma 9
ins	Inserción		
i	Isocromosoma	46,X,i(Xq)	Femenino isocromosoma de brazos largos del X
t	Translocación	45, XY,-14,-21, t(14;21)	Masculino con translocación balanceada entre los cromosomas 14 y 21.
t	Translocación	46,XX, -14, t(14;21)	Femenino con translocación entre los cromosomas 14 y 21 y trisomía 21.
recp	Translocación recíproca		
rob	Translocación robersoniana o por fusión centromérica		
mar	marcador	47, XY,+ mar	Masculino con cromosoma marcador extra.
pat	Paterno		
mat	Materno		
r	anillo	46,XX, r(13)	Femenino con cromosoma 13 en anillo
		46, XX	Femenino normal
		46,XY	Masculino normal

RESUMEN

El estudio microscópico de células en interfase, con objetivos de identificar la presencia de ADN de los cromosomas X y Y, en forma de cromatina, ofrece un método rápido y económico que permite identificar el sexo cromatínico del individuo en estudio.

Esta técnica se indica cuando se requiere conocer con urgencia el sexo en un recién nacido cuyos genitales externos son ambiguos.

Es un paso técnico que se encuentra entre la clínica y el cariotipo cuando se estudia a niñas con baja talla o a parejas infértiles.

Permite identificar hombres con síndromes de feminización testicular y fenotipo de mujer, en equipos deportivos de mujeres de alto rendimiento.

El cariotipo es una técnica más elaborada y costosa, requiere de un tiempo mayor de análisis que depende del cultivo del tejido fundamentalmente. Para cariotipos comunes se utiliza como tejido sangre de la persona que se desea estudiar. Este tipo de cultivo lleva un tiempo menor ya que a las 72 horas se detiene y se pueden obtener extensiones en láminas portaobjeto listas para ser sometidas a las coloraciones deseadas. La técnica de bandas usada en cariotipos comunes son las bandas G y la resolución más efectiva es el nivel prometafásico de estudio.

Oras técnicas de coloración para la obtención de bandas, se realizan cuando es necesario tener más detalles de algún defecto cromosómico no bien identificado o cuando se proyectan investigaciones específicas.

En análisis de cromosomas de mayor resolución se emplea cuando se desea identificar algún defecto pequeño no identificado en el estudio de rutina.

La citogenética molecular ofrece un nivel técnico mucho más especializado y algunas de sus indicaciones están en manos de Especialistas en Genética Clínica, cuando se quieren identificar defectos submicroscópicos de cromosomas específicos o de uso de los Citogenetistas con fines de investigaciones en las que intervienen grupos de especialistas involucrados en el estudio de etiología de defectos genéticos poco comprendidos.