



**LOS DOBLECES DE
LOS CROMOSOMAS
MITÓTICOS Y SU
RELACIÓN CON
LA ESTRUCTURA
DEL NÚCLEO
INTERFÁSICO**

TESIS DOCTORAL

Alberto Plaja Rustein

Diciembre 2003

AGRADECIMIENTOS

Si bien la responsabilidad final de lo aquí escrito es exclusivamente mía, estoy en deuda con mucha gente que directa o indirectamente han contribuido con este trabajo o mi formación. Así, desearía expresar mi agradecimiento a las siguientes personas:

A la Dra. Rosa Miró, por su valentía al aceptar una propuesta de tesis con un tema tan poco habitual como el de los dobleces cromosómicos, su paciencia y sus enseñanzas.

Al Dr. Josep Egozcue, por su corrección a mi artículo y pulir varias de las ideas centrales de esta tesis.

A la recientemente Dra. Angels Rigola por robar el tiempo a su familia y su tesis (llevada a buen puerto de forma casi simultánea a la mía) y a la Dra. Pilar Graó, en recuerdo de una larga tarde en la que “cazamos” mediante FISH el doblez 15q11q13.

A la Dra. Miriam Guitart en la Unidad de Genética Parc Taulí por sus estudios moleculares y de FISH para el diagnóstico de los sujetos con sospecha clínica de síndrome de Prader Willi.

A la Dra. Carmen Fuster, precursora en el tema de los dobleces, por sus enseñanzas.

A mis dos familias genéticas, en Vall d'Hebron y General Lab, por lo mucho que me han enseñado y me enseñan cada día. Gracias Enric, Teresa, Carmen, Elisabet, abuela Beni (a quien debo las magníficas extensiones de sangre periférica que he utilizado), Mati y Leo (a quienes, a su vez, debo las extensiones de líquido amniótico y velloso corial), Montse y Asun. Gracias Eli, Cristina, Lurdes, Sandra, Dani, Elena y Susana.

A los Dres. Greenbaum y Dahm, del Departamento de Biología de la Texas A&M por permitirme utilizar su programa estadístico FSM sin el cual el análisis de mis datos hubiera sido mucho más complicado y muy probablemente menos fructífero.

A mis compañeros de la reunión de bibliografía por sus muchas enseñanzas y sugerencias a lo largo de muchos años.

A mi familia, que próximamente se incrementará en un miembro: a mis padres por su constante apoyo., a mis hermanos (y parejas...), Veneranda, mis suegros y cuñados, especialmente a Marta Cros, que me permitió muy amablemente el uso de su material informático y evitó *in extremis* un *crack* informático de consecuencias impredecibles.

Finalmente, un agradecimiento muy especial a mi familia más cercana que ha tolerado el desorden, las prisas y la falta de atención que necesariamente producen un embolado como este. Gracias Miryam, Clara, Xavi y Guillem.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
BrdU	Bromodeoxiuridina
CBs	Coiled bodies, Cajal bodies o cuerpos de Cajal
CENP-C	Centromeric protein C o proteína centromérica C
CENP-E	Centromeric protein E C o proteína centromérica E
DEB	(+)- 1, 2: 3, 4- Diepoxibutano
FISH	Fluorescence <i>in situ</i> hybridization o Hibridación <i>in situ</i> fluorescente
G0	Gap 0 o periodo de reposo del ciclo celular
G1	Gap 1 o primer periodo de crecimiento del ciclo celular
HMG1/Y	High Mobility Group protein I/Y o proteína de alta movilidad I/Y
ICD	Interchromosome domain compartment o compartimento intercromosómico
INCENP	Inner centromeric protein o proteína del cinetocoro
LCRs	Low Copy Repeats o duplicaciones segmentarias
MCP1	Metaphase Chromosome Protein 1 o proteína I del cromosoma metafásico
NUMA	Nuclear matrix protein o proteína de la matriz nuclear
PCD	Premature centromere division o separación prematura de los centrómeros
PML	Leucemia promielocítica
S	Periodo de síntesis del ciclo celular
SARs	Scaffold attachment regions o regiones de unión al andamio cromosómico
SCI	Scaffold protein I o proteína I del andamio cromosómico.
SCII	Scaffold protein II o proteína II del andamio cromosómico.
SMC	Stability of microchromosomes o proteína estabilizadora de microcromosomas
SMP	Survival of Motor Protein o factor de supervivencia de la proteína motora.
snRNPs	Small nuclear ribonucleoprotein o pequeñas ribonucleoproteínas nucleares
TOPOI	Topoisomerasa 1

RELACIÓN DE FIGURAS

Figura 1.1: Niveles de compactación del ADN.....	2
Figura 1.2: Unión de los lazos de cromatina al andamio cromosómico mediante SARs.....	5
Figura 1.3: Unión de los lazos de cromatina entre sí mediante conectadores periódicos.....	6
Figura 1.4: Modelo de cromosoma interfásico en zigzag.....	9
Figura 1.5: Disposición del cromosoma 12 interfásico.....	10
Figura 1.6: Matriz nuclear.....	11
Figura 1.7: Zona pericromática.....	12
Figura 1.8: Compartimentos nucleares.....	13
Figura 1.9: Modelo tradicional del núcleo de una célula animal.....	16
Figura 1.10: Componentes del poro nuclear.....	17
Figura 1.11: Fotografía al microscopio electrónico de un poro nuclear.....	18
Figura 1.12: Modelo del núcleo basado en la matriz nuclear.....	19
Figura 1.13: Modelo del núcleo basado en los territorios cromosómicos.....	20
Figura 1.14: Dobleces detectados por Flejter y col. (1984).....	22
Figura 3.1: Evaluación de la resolución de una metafase.....	30
Figura 3.2: Cromosoma 3 mostrando diferentes tipos de doblez cromosómico.....	31
Figura 4.1: Dobleces 15q11q13 en homocigosis en un paciente con síndrome de Prader Willi por deleción.....	49
Figura 4.2: Asignación precisa del doblez 15q11q13 a la banda q12.....	50
Figura 4.3: Dobleces detectados en cromosomas 12 con bandas G de resolución elevada.....	53
Figura 4.4: Dobleces detectados en cromosomas 5 con bandas G de resolución elevada.....	54
Figura 5.1: Algunos cromosomas con dobleces no aleatorios.....	56
Figura 5.2: Cromosomas metafásicos mostrando dos tipos de doblez.....	61
Figura 5.3: Modelo que explica la relación entre los dobleces cromosómicos y la formación de isoacéntricos.....	62
Figura 5.4: Isoacéntricos.....	64
Figura 5.5: Representación esquemática de los tipos de reorganizaciones genómicas.....	67
Figura 5.6: Correspondencia entre los dobleces metafásicos y el cromosoma 12 interfásico.....	69
Figura 5.7: Dos modelos de estabilización de un doblez cromosómico.....	71
Figura 5.8: Dobleces en un cromosoma 15 delecionado en un paciente con síndrome de Prader Willi.....	72
Figura 5.9: Modelo de cromosoma interfásico.....	74
Figura 5.10: Comparación de las longitudes aparentes de un cromosoma interfásico y uno metafásico.....	75
Figura 5.11: Modelo de cromosoma interfásico mostrando el transporte del ARNm dentro del cromosoma, desde el punto de transcripción hasta el citoplasma.....	75
Figura 5.12: Modelo de cromosoma interfásico que muestra como el centrómero de un cromosoma con una pequeña parte de su material unido a la envoltura nuclear (a) se dobla mas que el centrómero de un cromosoma con una mayor proporción de su material unido a la envoltura nuclear (b).....	77

RELACIÓN DE TABLAS

TABLA I: Dobleces centroméricos hallados por Flejter y col. (1984).....	21
TABLA II: Sujetos y muestras incluidos en el presente estudio.	27
TABLA III: Denominación común de grupos de bandas de difícil discriminación a baja resolución.	32
TABLA IV: Media y desviación estándar de la longitud relativa e índice centromérico de cada cromosoma (basado en ISCN 1985).....	35
TABLA V: Número de dobleces centroméricos detectados en sangre periférica.....	38
TABLA VI: 69 bandas que se doblan con frecuencia superior al azar en metafases de cultivos de sangre periférica.	40
TABLA VII: Número de dobleces centroméricos detectados en líquido amniótico y vellosidad corial	43
TABLA VIII: Relación entre el número de dobleces y la resolución de las metafases de líquido amniótico y vellosidad corial.....	44
TABLA IX: 76 bandas que se doblan con frecuencia superior al azar en metafases de cultivos de líquido amniótico y vellosidad corial	45
TABLA X: Resolución de 498 metafases incluidas en los estudios del doblez 15q11q13 en sangre periférica.....	48
TABLA XI: Dobleces en 15q11q13.....	48
TABLA XII: Dobleces en Xq13q21 y 15q11q13 en sangre periférica y líquido amniótico	51
TABLA XIII: % de dobleces en Xq13q21 y 15q11q13 en sangre periférica y líquido amniótico ...	52
TABLA XIV: % células mostrando un doblez Xq13-Xq21 en diversos estudios.....	59

RELACIÓN DE FÓRMULAS

Fórmula 1: Coeficiente de correlación del producto de momentos r_x es el número de dobleces en una determinada banda e y la longitud cromosómica relativa o el índice centromérico.....34

Fórmula 2: Cálculo del valor medio global de los datos ISCN (1985) basados en las medidas realizadas en 20 células por el Dr. Pearson, en 10 células por el Dr. Caspersson y col. y en 95 células por el Dr. Lubs y col.....34

CONTENIDO DEL CD

Ficheros con el texto e ilustraciones de esta tesis.....	/Tesis
Ficheros originales con la resolución de las metafases incluidas en el estudio y los pacientes de las que proceden.....	/Datos
Ficheros originales con los dobleces en sangre y ficheros generados por el programa FSM.....	/Datos/Sangres
Ficheros originales con los dobleces en líquido amniótico y vellosidades coriales y ficheros generados por el programa FSM.....	/Datos/LAVC
Programa FSM.....	/FSM
Ficheros en formato PDF con artículos del autor relacionados con la presente tesis.....	/Artículos

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	i
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 ESTRUCTURA CROMOSOMICA.....	1
<i>Niveles de compactación del ADN.....</i>	<i>1</i>
<i>Histonas</i>	<i>2</i>
<i>No Histonas.....</i>	<i>3</i>
<i>Niveles de compactación superiores.....</i>	<i>4</i>
1.2 ESTRUCTURA DEL NUCLEO INTERFÁSICO.....	7
<i>Tipos de cromatina y su distribución espacial.....</i>	<i>7</i>
<i>Los territorios cromosómicos.....</i>	<i>8</i>
<i>La matriz nuclear</i>	<i>10</i>
<i>Nucleolo y cuerpos nucleares.....</i>	<i>13</i>
<i>Modelos de organización del núcleo celular.....</i>	<i>16</i>
1.3 LOS DOBLECES CROMOSÓMICOS	20
<i>Revisión histórica.....</i>	<i>20</i>
<i>Métodos de estudio de los dobleces cromosómicos.....</i>	<i>24</i>
2 OBJETIVOS	26
3 MATERIAL Y MÉTODOS.....	27
3.1 SUJETOS Y MUESTRAS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO.....	27
3.2 TÉCNICAS DE CITOGENÉTICA CONVENCIONAL	28
3.3 TÉCNICAS DE FISH	29
3.4 TÉCNICAS DE GENÉTICA MOLECULAR	29
3.5 CRITERIOS DE ANÁLISIS DE LOS DOBLECES CROMOSÓMICOS	29
<i>Nivel de resolución de las metafases.....</i>	<i>29</i>
<i>Observación de los dobleces cromosómicos.....</i>	<i>30</i>
<i>Análisis estadístico de los dobleces no centroméricos.....</i>	<i>32</i>
<i>Análisis estadístico de los dobleces centroméricos.....</i>	<i>34</i>
4 RESULTADOS.....	37
4.1 FRECUENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE LOS DOBLECES CROMOSÓMICOS EN CULTIVOS DE SANGRE PERIFÉRICA.....	37
4.2 FRECUENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE LOS DOBLECES CROMOSÓMICOS EN CULTIVOS DE LÍQUIDO AMNIÓTICO Y VELLOSIDAD CORIAL.....	42
4.3 EL DOBLEZ 15q11q13	48
<i>Análisis de la frecuencia de los dobleces en 15q11q13 en cultivos de sangre periférica... 48</i>	
<i>Localización precisa del doblez 15q11q13 mediante la técnica de FISH y en metafases de alta resolución con bandas G.....</i>	<i>49</i>
4.4 EL DOBLEZ Xq13q22.....	50
<i>Análisis de la frecuencia de los dobleces en Xq13q22 en cultivos de sangre periférica.....</i>	<i>50</i>
<i>Análisis de la frecuencia de los dobleces Xq13q22 en cultivos de líquido amniótico.....</i>	<i>51</i>
4.5 FRECUENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE LOS DOBLECES EN EL CROMOSOMA 12 (METAFASES DE RESOLUCIÓN ELEVADA EN CULTIVOS DE SANGRE PERIFÉRICA) ...	52
4.6 FRECUENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE LOS DOBLECES EN EL CROMOSOMA 5 (METAFASES DE RESOLUCIÓN ELEVADA EN CULTIVOS DE SANGRE PERIFÉRICA) ...	53
5 DISCUSIÓN.....	56
5.1 LOS CROMOSOMAS SE DOBLAN	56
5.2 LOS DOBLECES CENTROMÉRICOS.....	56
5.3 LOS DOBLECES NO CENTROMÉRICOS.....	57
<i>Los dobleces del cromosoma X y las diferencias en la frecuencia de algunos dobleces en diversos tejidos.....</i>	<i>58</i>
<i>Los dobleces cromosómicos pueden ser un remanente de su estructura interfásica precedente.....</i>	<i>61</i>

	<i>Los dobleces cromosómicos no dependen de factores presentes en el vértice del doblez.</i>	70
	<i>Todas las bandas de G oscuras pueden ser puntos de doblez.</i>	72
	<i>Las reorganizaciones cromosómicas tienden a localizarse en las bandas claras.</i>	73
	<i>Un modelo de cromosoma interfásico compatible con los datos derivados del estudio de los dobleces en los cromosomas metafásicos.</i>	73
6	CONCLUSIONES	78
7	BIBLIOGRAFÍA	79
8	APÉNDICE I	90
	TÉCNICAS DE CITOGENÉTICA CONVENCIONAL Y FISH	90
	<i>Material</i>	90
	<i>Reactivos</i>	92
	<i>Líquido amniótico y vellosidad corial</i>	103
	<i>Bandas G con colorante de Wright</i>	107
	<i>FISH para la zona crítica de los síndromes de Prader Willi y Angelman</i>	109
9	APÉNDICE II	111
	USO DEL PROGRAMA FSM	111

1 INTRODUCCIÓN

Con pocas excepciones, toda la información necesaria para la construcción y mantenimiento de un ser vivo está codificada en una larga molécula de ADN (Ácido Desoxirribonucleico).

El ADN eucariota se expresa y replica únicamente en el contexto del núcleo interfásico y cada célula ha de acomodar casi dos metros de ADN en este compartimento especializado de pocas micras de diámetro. Además, y pese a su alto grado de compactación, el ADN tiene que ser rápidamente accesible para permitir su interacción con la maquinaria proteica que regula las funciones vitales de replicación transcripción, reparación y recombinación.

Gracias a una enorme inversión de recursos materiales y humanos conocemos con razonable precisión el mensaje genético (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001), pero su organización dentro del núcleo interfásico aún nos es prácticamente desconocida.

1.1 ESTRUCTURA CROMOSOMICA

Los microscopistas de finales del siglo XIX denominaron cromatina al material que forma el núcleo y los cromosomas debido a su avidez por ciertos colorantes (Flemming, 1882). La cromatina es un complejo altamente estructurado de proteínas (histonas y no histonas) y ADN.

Niveles de compactación del ADN

Una célula haploide humana posee aproximadamente 3,65 picogramos de ADN, lo cual equivale a unos 3500 millones de pares de bases. En una célula diploide los aproximadamente dos metros de ADN (3 Kb de ADN tienen aproximadamente 1 μm) están empaquetados en 46 cromosomas de 1 a 10 μm . Esto representa una razón de compactación de aproximadamente 10000 a 1 y se logra mediante una serie de pasos sucesivos razonablemente bien caracterizados en los primeros niveles, pero muy poco conocidos en los superiores (Figura 1.1). Koshland y Strunnikov (1996) han sugerido que el ADN interfásico se pliega de una forma fija para formar el cromosoma metafásico.

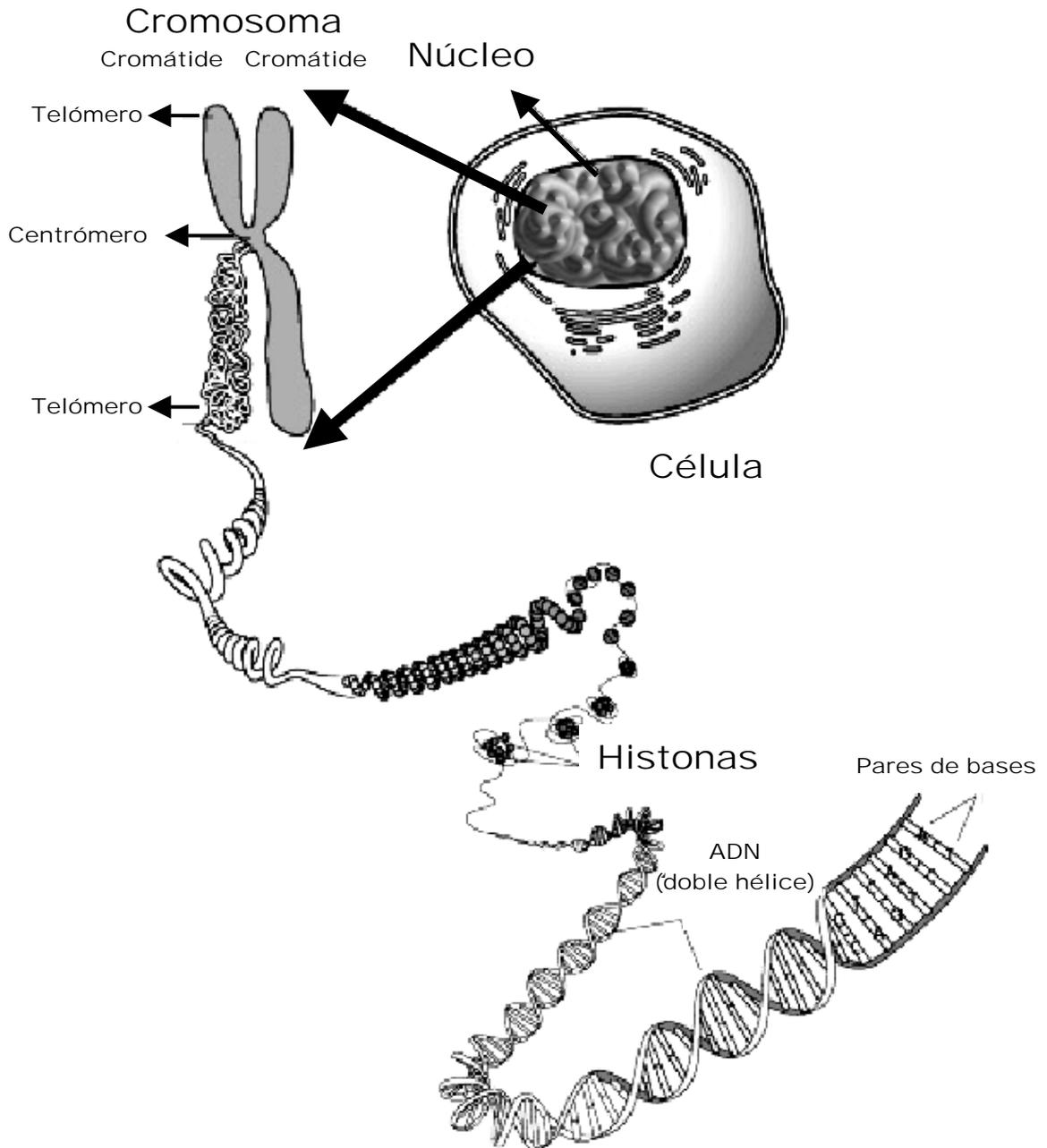


Figura 1.1: Niveles de compactación del ADN.

Histonas

Las histonas son proteínas de bajo peso molecular que presentan una gran afinidad por el ADN. Hay 5 tipos principales, denominados H1, H2A, H2B, H3 y H4. Las histonas, muy especialmente los tipos H3 y H4, están notablemente conservadas en todos los eucariotas, lo cual es una medida de la importancia de su función y de la complejidad de sus interacciones con otras proteínas y el ADN. Se puede encontrar un buen resumen en

Miller y Therman (2001). El componente mejor caracterizado de la cromatina es el nucleosoma, que representa el primer nivel de compactación del ADN. La estructura del nucleosoma ha sido resuelta por una miríada de trabajos que culminan en el estudio de Luger (1997) en el que se ha obtenido una resolución de 2.8 Å mediante difracción de rayos X.

El ADN da dos vueltas en torno a un disco cuyas caras exteriores están formadas por un complejo de las histonas H2A, H2B y su interior por dos moléculas de H3 y H4. De esta forma 146 pares de bases de ADN se compactan en los 5.7 nm que tiene el disco (esto representa una compactación de 9 a 1). Cada disco está separado del siguiente por 90-100 nucleótidos de ADN. Un nucleosoma es el conjunto de un disco y un segmento de ADN separador.

En el siguiente nivel de compactación interviene la histona H1, que une los nucleosomas consecutivos y probablemente forma un solenoide de 30 nm de diámetro, produciendo una compactación adicional de 6 a 1. Los niveles de compactación superiores, mucho peor caracterizados, parecen lograrse mediante el anclaje de una serie de lazos de fibra denominados dominios a un andamio cromosómico proteico.

No Histonas

Dos tercios de la masa cromosómica se debe al ADN e Histonas, el resto corresponde casi en su totalidad a un grupo de proteínas que no son histonas. Estas últimas incluyen varias proteínas HGM (high-mobility-group, debido a su rápida migración electroforética) y algunas proteínas insolubles que forman el andamio cromosómico (revisado por Miller y Therman, 2001). Cuando se extraen las proteínas solubles del cromosoma se observa al microscopio electrónico una estructura densa que remeda el cromosoma original, que se considera es el andamio cromosómico, a partir del cual se extiende en todas direcciones un halo de fibras de ADN desnudas (Paulson y Laemmli, 1977). El andamio cromosómico constituye un 5% de la masa total cromosómica y está compuesto principalmente por tres tipos de proteínas: SCI (Scaffold Protein 1, la proteína más abundante en el andamio cromosómico y que ha resultado ser la topoisomerasa II o TOPO II), una ATPasa denominada SCII y la HMG1/Y (High Mobility Group protein 1/Y) (Lewis y Laemmli, 1982). La más abundante es la proteína TOPO II, un enzima que corta y vuelve a unir el ADN bicatenario permitiendo que una molécula de ADN pase a través de otra. Esta función es indispensable para aumentar o

disminuir el superenrollamiento de una molécula de ADN y eliminar la gran tensión torsional que se genera al condensarse y descondensarse la cromatina. El enzima TOPO II ha sido localizado mediante anticuerpos fluorescentes en el andamio de los cromosomas mitóticos y meióticos (Moens y Earnshaw, 1989) y posee una sorprendente actividad aún sin explicación: la inhibición del sobrecruzamiento (crossing over) mitótico (Wang, 1996).

ScII es la segunda proteína más abundante del andamio cromosómico, donde forma complejos con TOPOII, pero esta ausente de la matriz nuclear durante la interfase. ScII pertenece a una familia génica muy conservada denominada SMC por su efecto de estabilización de microcromosomas en las levaduras (Stability of Microchromosomes). ScII parece tener un papel esencial en la condensación cromosómica durante la mitosis y en la separación de las cromátides hermanas (Saitoh y col., 1995).

Finalmente, también se pueden aislar a partir del andamio cromosómico otras proteínas menos abundantes. Un ejemplo es MCP1 (Metaphase Chromosome Protein 1), una proteína con un posible papel en la condensación cromosómica que se une exclusivamente al cromosoma metafásico y se localiza en la matriz nuclear durante la interfase (Bronze-da-Rocha y col., 1998). Otros ejemplos son CENP-C y CENP-E (Centromeric Proteins C y E) y INCENPs, proteínas localizadas en el cinetocoro e implicadas en su funcionamiento (Saitoh y col., 1995).

Niveles de compactación superiores

Tal como ya se había comentado anteriormente, se conocen pocos detalles sobre los niveles superiores de compactación cromosómica. Existe evidencia experimental que sugiere que ciertas zonas del ADN especialmente ricas en AT denominadas SARs (Scaffold Attachment Regions o regiones de unión al andamio cromosómico) se anclan muy próximas una a la otra en el andamio cromosómico (Mirkovitch y col., 1988) y se asume que esto provoca que el ADN entre ellas forme lazos de cromatina (Figura 1.2).

A su vez, las proteínas del andamio cromosómico situadas en la base de los lazos de ADN se organizan en una cadena que adopta una disposición helicoidal con direcciones opuestas en ambas cromátides hermanas (Boy de la Tour y Laemmli, 1988). Baumgartner y col. (1991) confirmaron estos hallazgos con FISH y hallaron que la posición de los genes en ambas cromátides (exterior o mediana en relación con el eje cromosómico) permanece invariable desde la prometáfase temprana a la metafase, lo

cual indica que las fases finales de la condensación cromosómica consisten en una compactación más densa y no en un enrollamiento adicional.

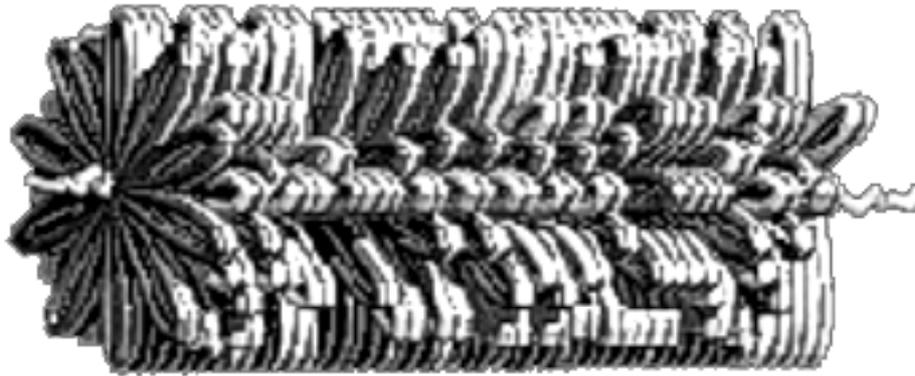


Figura 1.2: Unión de los lazos de cromatina al andamio cromosómico mediante SARs (Mirkovitch y col. , 1988).

La condensación y descondensación cromosómica podrían ser principalmente en sentido perpendicular al eje cromosómico (Weise y col. , 2002), y no en sentido longitudinal como tradicionalmente se asume.

Poirier y col (2002) han medido la resistencia al dobléz y el estiramiento de los cromosomas de *N. Viridescens* y *Xenopus*. Sus resultados son compatibles con una estructura homogénea, con una conectividad uniforme a lo largo de la sección del cromosoma que recuerda una goma elástica, y no apoyan el modelo de un cromosoma que debe su forma a un eje central al que se unen lazos de DNA sueltos. Los cromosomas metafásicos se pueden estirar de forma reversible hasta 5 veces su longitud original, alteran de forma irreversible su estructura si se estiran de 5 a 30 veces y se rompen con estiramientos superiores (Poirier y col., 2000). Este comportamiento es compatible con un modelo en el que los lazos de DNA se unen unos con otros mediante conectadores de proteína, quizás condensinas (Hirano y Mitchison, 1994), distribuidos con una periodicidad de aproximadamente de uno cada 5-6 Kb (Figura 1.3).

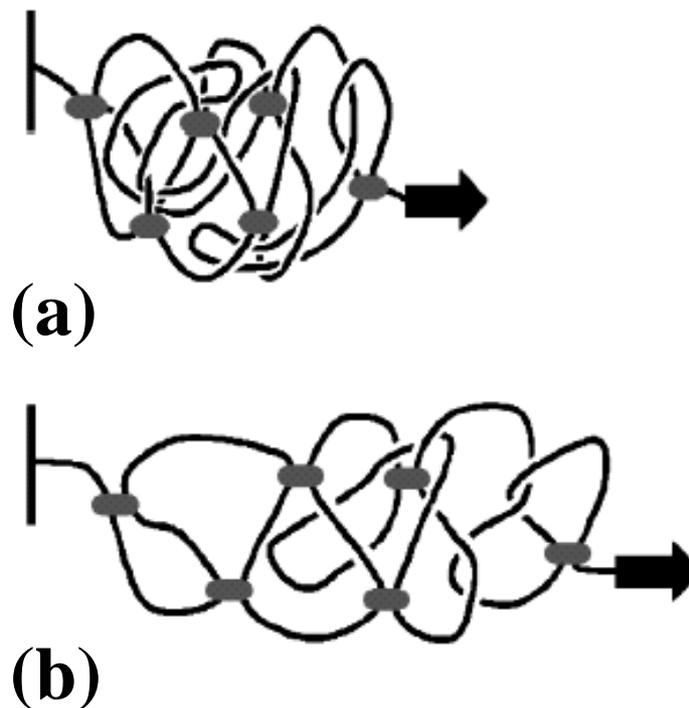


Figura 1.3: Unión de los lazos de cromatina entre sí mediante conectores periódicos.

(a) En reposo y (b) sometido a fuerzas de estiramiento.

Muchos modelos tradicionales atribuyen el origen de las bandas cromosómicas a variaciones en la composición de bases. Sin embargo, las diferencias entre bandas son demasiado sutiles en comparación con la abrupta transición que se observa en las características tintoriales del cromosoma. Saitoh y Laemmli (1994) propusieron un modelo radicalmente diferente: las bandas cromosómicas se corresponderían a diferentes tipos de patrones de plegamiento de la cromatina. Así, las bandas G/Q positivas ricas en AT presentarían un plegamiento muy denso mientras las bandas G/Q negativas ricas en GC presentarían un plegamiento mucho menos denso. Yakota y col. (1997) aportaron evidencia experimental al realizar FISH de dos colores con 42 sondas de copia única correspondientes a loci que estaban separados 0.1 a 1.5Mb. En primer lugar, observaron que la distribución de las señales era compatible con una organización de la cromatina del núcleo en G₀/G₁ en lazos de un tamaño dentro del orden de magnitud de la megabase. En segundo lugar, observaron que las señales fluorescentes

estaban más próximas cuando las sondas utilizadas hibridan dentro de una banda G oscura que cuando lo hacen en una zona de tinción clara.

1.2 ESTRUCTURA DEL NUCLEO INTERFÁSICO

Tipos de cromatina y su distribución espacial

La visión tradicional del núcleo interfásico es la de una masa de cromatina y proteínas que sólo se organiza durante la división en la forma de cromosomas. Las técnicas de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) ha permitido descubrir que el núcleo de la célula eucariota es en realidad un orgánulo celular altamente compartimentalizado (Lamond y Earnshaw, 1998). El núcleo interfásico ocupa aproximadamente un volumen cuatro veces mayor que el volumen total ocupado por los cromosomas metafásicos (Belmont y col. , 1989) y está totalmente ocupado por la cromatina. Por tanto los cromosomas tienen que estar al menos parcialmente descondensados.

Clásicamente se ha dividido la cromatina en heterocromatina (que no altera su condensación a lo largo del ciclo celular) y eucromatina (descondensada durante la interfase) (Heitz, 1928). La heterocromatina se replica de forma tardía y tiende a localizarse en la periferia nuclear, mientras que la eucromatina se replica de forma más temprana y tiende a situarse en el interior. La heterocromatina constitutiva (que se tiñe mediante la técnica de bandas C) contiene muy pocos genes y esta formada por secuencias repetitivas localizadas en los centrómeros. En las hembras de los mamíferos uno de los dos cromosomas X se inactiva como parte de un mecanismo de compensación de dosis génica y forma la heterocromatina facultativa (compuesta por regiones transcripcionalmente activas que en determinadas circunstancias pueden adoptar las características estructurales y funcionales de la heterocromatina) (Lyon, 1999; Avner, 2001). La inactivación del cromosoma X es un proceso complejo (Véase una buena revisión en Miller y Therman, 2001) regulado por el RNA transcrito del gen XIST. Afecta uno u otro homólogo al azar en el embrión de 1000 o 2000 células. A partir de este momento el cromosoma X inactivo es el mismo en todas las descendientes de una determinada célula. El cromosoma X inactivo se replica de forma más tardía que el resto de los cromosomas, incluyendo su homólogo activo.

Los territorios cromosómicos

Los cromosomas forman territorios bien delimitados tanto en núcleos fijados (Manuelidis, 1985) como en células vivas (Zink y col. 1998). Los compartimentos cromosómicos no se solapan entre sí, con excepciones poco frecuentes que podrían representar procesos como los intercambios entre cromátides hermanas (Visser y Aten, 1999)

Durante el ciclo celular se producen cambios en la posición de los territorios cromosómicos, de los *foci* cromosómicos dentro de los territorios y de las fibras de cromatina dentro de los *foci* subcromosómicos (Zink y col. , 1998). Existen evidencias que sugieren algún tipo de organización de los territorios cromosómicos dentro del núcleo (revisado por Parada y Misteli, 2002). La configuración de Rabl (la agrupación de centromeros en un polo nuclear y la agrupación de telómeros en el polo opuesto) es frecuente en *Drosophila* y plantas, pero no en mamíferos. Sin embargo si que se ha observado que los cromosomas homólogos frecuentemente ocupan posiciones opuestas en un anillo o roseton que se forma muy brevemente en la placa metafásica.(Nagele y col. , 1995). Los territorios de los cromosomas con un contenido génico más activo tienden a adoptar una posición mas central en el núcleo (Croft y col. , 1999; Cremer y Cremer , 2001), pero no hay una distribución fija de los territorios cromosómicos en el núcleo ni entre homólogos (Bischoff y col. , 1993). También se ha observado que los cromosomas mas grandes tienden a ocupar una posición mas periférica que la de los cromosomas de menor tamaño (Sun y col. , 200) y que los territorios con genes más activos son más irregulares (Elis y col. , 1996). El ARN recién transcrito parece formarse en la superficie de los territorios cromosómicos y pasar luego al territorio intercromosómico para proceder a su modificación y transporte (Cremer y col. , 1993; Cremer y Cremer, 2001).

En contra de lo generalmente asumido, el desempaquetamiento de los cromosomas en el núcleo interfásico es muy limitado: la diferencia de volumen entre el cromosoma X activo e inactivo es de sólo el 25% (Bischoff y col. , 1993; Elis y col., 1995) y el cromosoma 5 en interfase tiene una longitud similar a un cromosoma metafásico de un nivel de resolución de unas 600 bandas (Lemke y col. , 2002).

Los territorios cromosómicos tienen una organización bien definida y se dividen en compartimentos discretos que se corresponden con los brazos e incluso bandas, centrómeros y telómeros que se observan en el cromosoma metafásico (Manuelidis

1990; Zhao y col. 1995; Dietzel y col. 1998b; Kurz y col. 1996). El ADN de replicación tardía (correspondiente a las bandas G) se localiza preferentemente en la periferia nuclear mientras que el ADN de replicación temprana (bandas R) lo hace en el interior del núcleo. Los genes activos (Cremer y col. , 1993; Moen y col. , 1995) e inactivos (Kurz y col. , 1996) se sitúan casi exclusivamente en la periferia de los territorios cromosómicos. Se ha propuesto un modelo de cromosoma interfásico en el que el eje del cromosoma forma un zigzag que segrega las zonas de elevada expresión de las de menor expresión (Lukášová y col. , 2002) (Figura 1.4)

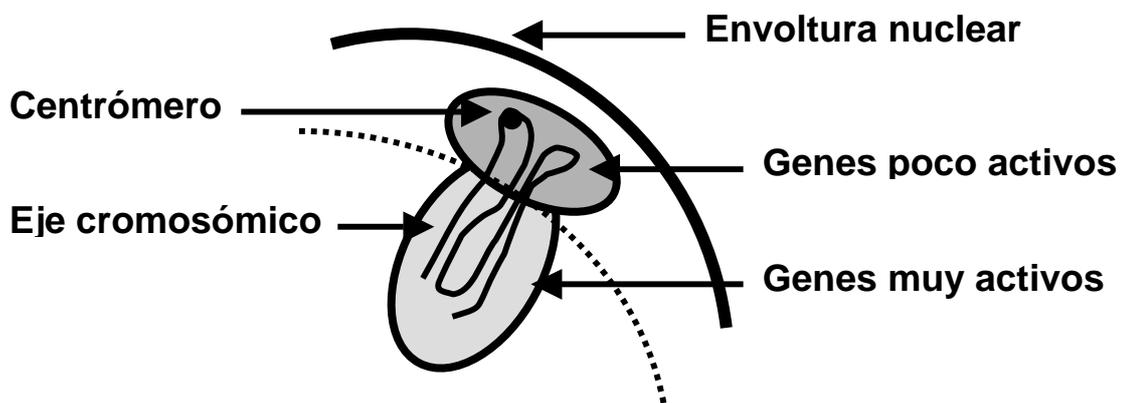


Figura 1.4: Modelo de cromosoma interfásico en zigzag.

Hay evidencia experimental de que los cromosomas interfásicos no adoptan una configuración rectilínea, sino con cambios de dirección mas o menos bruscos (dobles) (Lemke y col. , 2002).

Nogami y col (2000) han investigado en detalle la disposición del cromosoma 12 en núcleos en G₀ (G₁) mediante FISH usando 15 cósmidos con una localización citogenética bien definida en una única banda y con una distribución bastante uniforme a lo largo de todo el cromosoma. Experimentos con parejas de cósmidos marcados con diferente color en los que se evaluó la posición relativa (central o periférica) de ambas señales permitieron a estos autores concluir que la organización del cromosoma 12 en la

interfase no es al azar y elaborar un esquema de cromosoma interfásico que asume dobleces en las bandas 12p12, 12cen, 12q14-15, 12q21 y 12q24.2 (Figura 1.5).

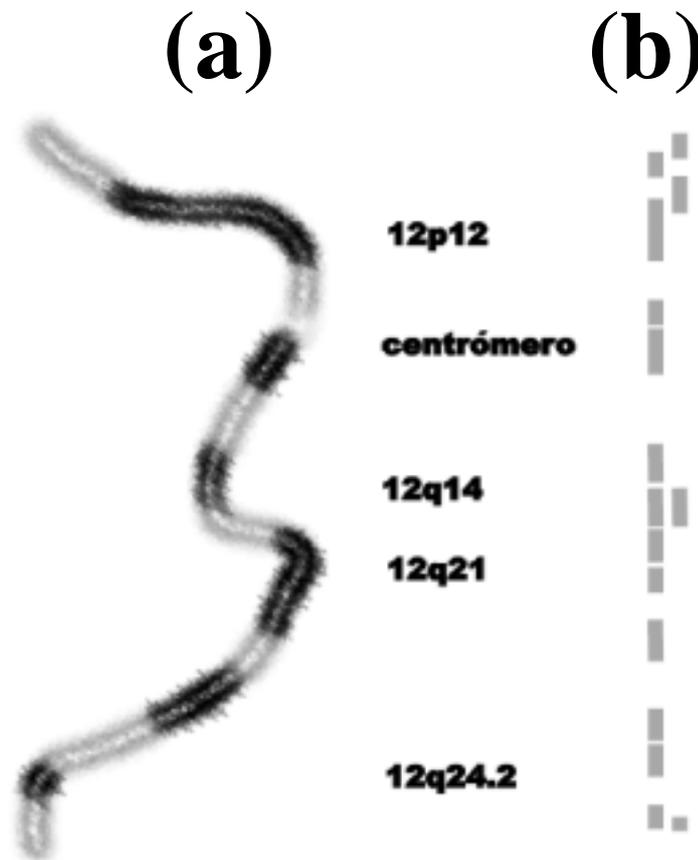


Figura 1.5: Disposición del cromosoma 12 interfásico.

(a) Representación gráfica y (b) distribución de los cósmidos utilizados por Nogami y col. (2000) .

La matriz nuclear

El componente mayoritario del núcleo interfásico es el complejo ADN/Histonas. Sorprendentemente, la extracción de este complejo con una solución salina 2M no produce la total destrucción del núcleo sino que se retiene la forma general y algunas estructuras morfológicas como los residuos nucleolares y los poros nucleares interconectados por una densa red de filamentos (Zbarsky y col. , 1962; Berezney y Coffey, 1974) (Figura 1.6).

La fracción nuclear residual de proteínas insolubles se denomina matriz nuclear e incluye laminas (proteínas principalmente asociadas a la envoltura nuclear, pero

también presentes en el interior) (Hozak y col. , 1995), proteínas nucleolares, ribonucleoproteínas y más de un centenar de proteínas minoritarias diferentes (Dell'Orco y col. , 1994).

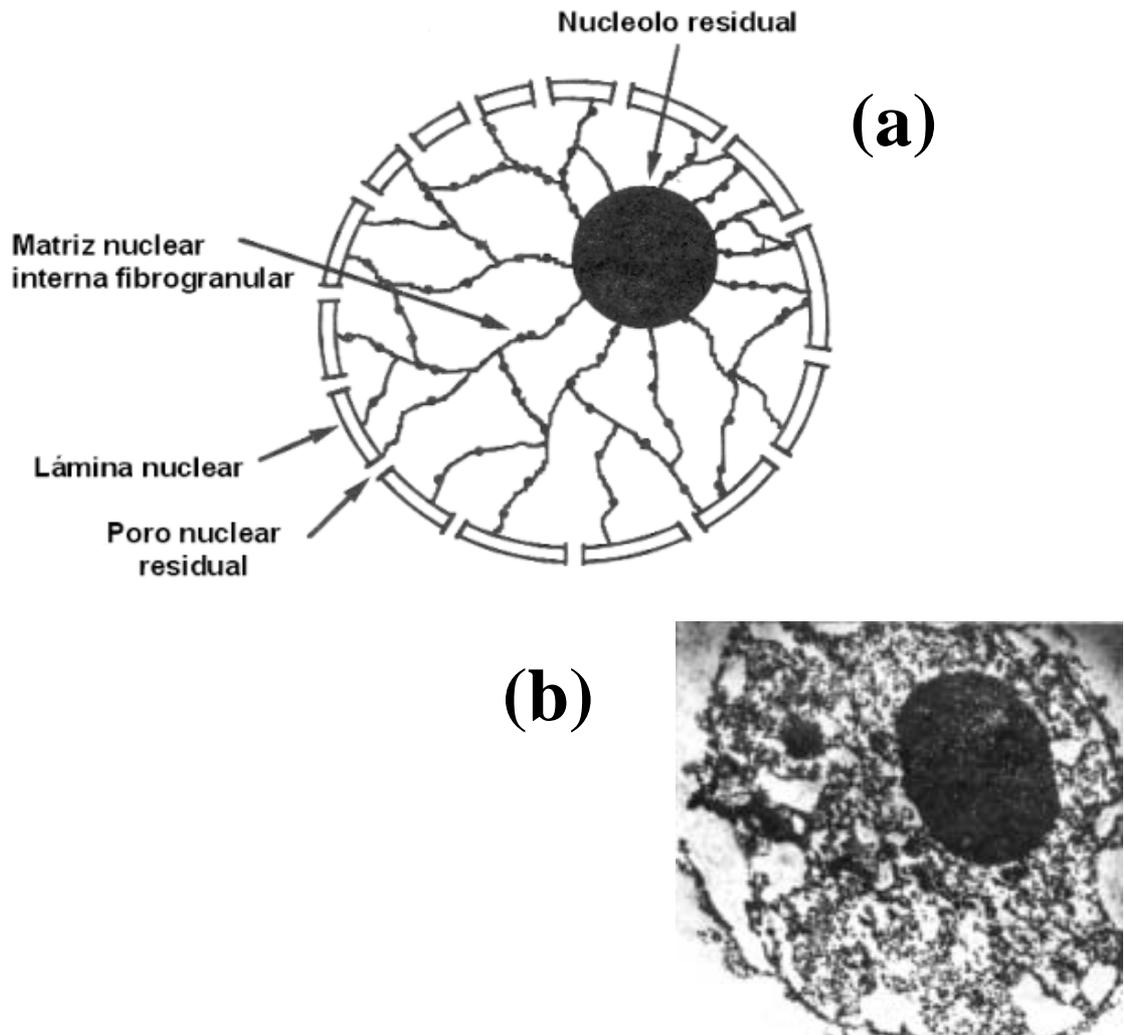


Figura 1.6: Matriz nuclear.

(a) Esquema y (b) foto al microscopio electrónico de un eritroblasto de pollo.

Hay una fuerte compartimentalización espacial de las diversas funciones nucleares (revisado por Lamond y Earnshaw, 1998). Aunque existe una fuerte controversia sobre si se trata de un artefacto de extracción o una entidad real (Penderson, 2002), la hipótesis mas extendida acepta que la matriz nuclear es una estructura con funciones esqueléticas o de soporte que organiza el volumen nuclear interno y proporciona

superficies para la unión y organización de complejos multienzimáticos implicados en el metabolismo del ADN y ARN (Baskin, 1995).

Durante la mitosis celular el núcleo desaparece y se suele aceptar que parte de la matriz nuclear se reorganiza formando los andamios cromosómicos. Como era de esperar, el andamio cromosómico es resistente a los mismos procedimientos de extracción que la matriz nuclear (Adolph y col. , 1977). Otros componentes de la matriz nuclear se sitúan dentro de las zonas pericromosómicas que encapsulan los cromosomas mitóticos y los aíslan del citoplasma (Hernandez-Verdun y Gautier, 1994) (Figura 1.7). Finalmente, algunas proteínas de la matriz como NuMA tienen un importante papel en la organización del huso acromático (Compton y Cleveland, 1994) y otras se distribuyen por el citoplasma con una función aún desconocida.

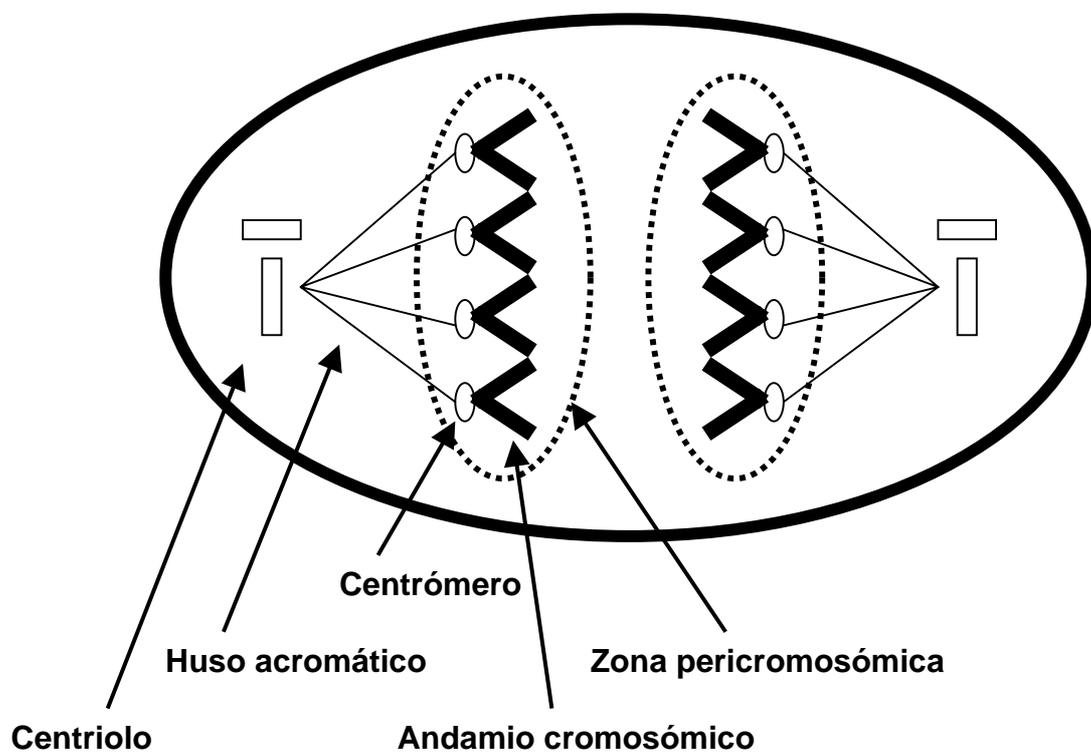


Figura 1.7: Zona pericromática.

Nucleolo y cuerpos nucleares

Muchos factores nucleares se localizan total o parcialmente en compartimentos discretos no aislados por una membrana o cuerpos nucleares. Son visibles mediante técnicas de FISH, inmunofluorescencia y microscopía e incluyen el nucleolo, los gránulos inter cromatínicos, las fibras pericromáticas, los cuerpos de Cajal (CBs o Cajal Bodies), los “Gems” y los cuerpos formados por la oncoproteína de la leucemia promielocítica (PML) (Figura 1.8)

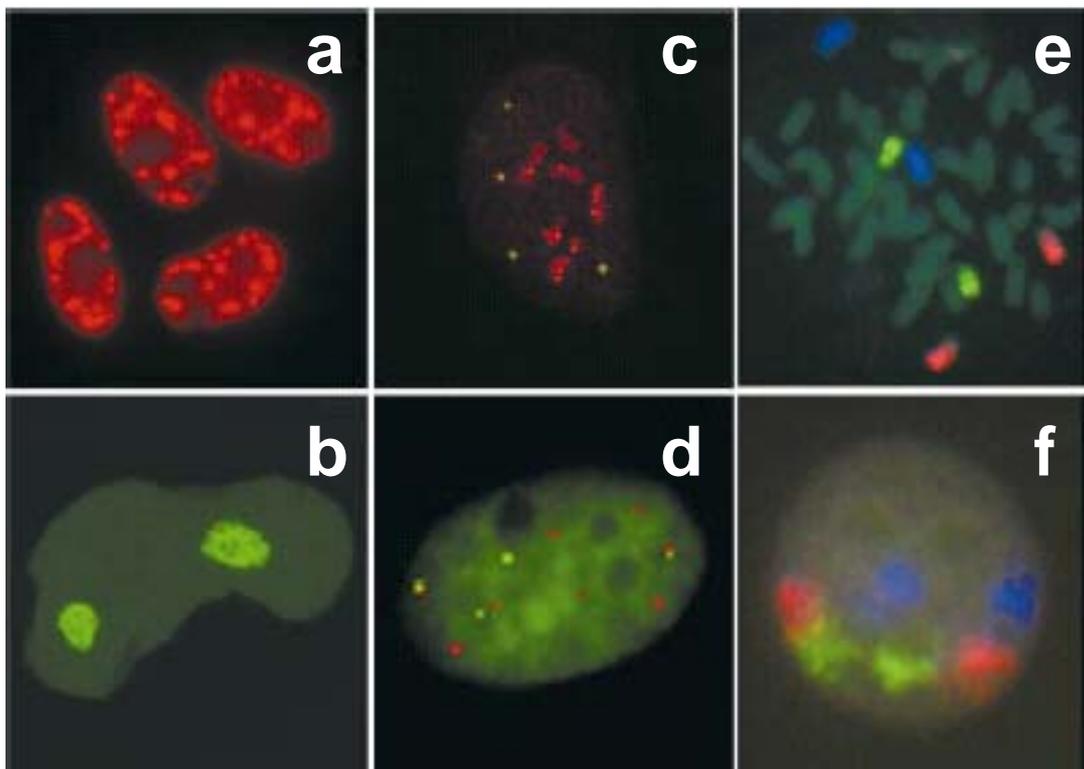


Figura 1.8: Compartimentos nucleares.

Visualización mediante técnicas de FISH e inmunofluorescencia de (a) gránulos inter cromatínicos, (b) nucleolo, (c) cuerpos de Cajal, (d) cuerpos PML, pintado cromosómico para los cromosomas 13, 14 y 15 en (e) una metafase de ratón y (f) un núcleo interfásico (Dundr y Misteli, 2001).

El compartimento más conspicuo es el nucleolo, una estructura dinámica presente en el núcleo interfásico que desaparece durante la división celular. Es un agregado de macromoléculas muy complejo en el que el ARN ribosómico (ARNr) se transcribe, procesa y monta en subunidades. Se ha comprobado que el tamaño del nucleolo depende del número de ribosomas que la célula está produciendo en un determinado momento. El nucleolo tiene tres zonas de morfología bien diferenciada (revisado en Dundr y Misteli, 2001): los centros fibrilares, de los que irradian densos componentes fibrilares, de los que a su vez irradian componentes granulares. Los genes para el ARNr se concentran en los 10 organizadores nucleolares presentes entre el brazo corto y zona satelitar de los cromosomas acrocéntricos; en el núcleo interfásico se sitúan en la periferia de los centros fibrilares. A partir de su síntesis en estos centros, el RNA sufre una serie de modificaciones a medida que se sitúa en los componentes fibrilares y finalmente granulares. Además de su importante papel en la biogénesis ribosómica el nucleolo también interviene en la síntesis de otros tipos de RNA y complejos RNA/proteína, la degradación y la exportación del ARNm. Es muy probable que tenga funciones adicionales ya que interactúa con los cuerpos de Cajal descritos más adelante y existe un compartimento perinuclear de función desconocida en un 10-50% de las células (el porcentaje varía según el tipo celular) (Lamond y Earnshaw, 1998).

Estudios inmunoquímicos realizados con anticuerpos contra la Bromodeoxiuridina (BrdU), un análogo de la Timidina, han mostrado casi 150 *foci* o puntos de incorporación de BrdU durante la fase S. Estos *foci* son visibles al microscopio electrónico con técnicas especializadas (Hozak y col., 1993) y aparecen como puntos a principio de la fase S para irse volviendo más difusos debido a la aparición de nuevo ADN con BrdU incorporado que difunde desde el centro del *foci* y se mantiene unido a la matriz nuclear. Se ha visto que la síntesis de ADN es un proceso altamente ordenado, que se inicia en zonas adyacentes a las de transcripción, lo que hace suponer que la conformación abierta de la cromatina necesaria para la transcripción también lo es para el inicio de la replicación (Nakamura y col., 1986).

Los genes activos y las factorías de transcripción tienden a situarse cerca de la superficie de los territorios cromosómicos. El procesamiento final y el transporte del ARN se producen en los dominios intercromosómicos o canales que separan los territorios cromosómicos. Unos segmentos especializados de ADN, las regiones de unión a la matriz nuclear, fijan los genes que se expresan a la matriz celular y separan

entre sí regiones cromosómicas que se regulan de forma independiente (McKnight y col. , 1992).

Los cuerpos enrollados o cuerpos de Cajal (CBs) son estructuras fibrilares de 0.15 a 1.5 μm de diámetro con una alta concentración de factores de transcripción y pequeñas ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs) (Carmo-Fonseca y col. , 1992). Su morfología es la de una madeja de fibras helicoidales enredadas. Los CBs pueden conectarse físicamente a la periferia nucleolar mediante fibras o incluso situarse ocasionalmente en su interior. La interacción entre nucleolo y CBS puede estar regulada por fosforilación y la proteína del tumor de Wilms parece jugar algún papel en el proceso (Lamond y Earnshaw, 1998). Frecuentemente los CBS aparecen acompañados de unas estructuras muy similares denominadas “gem” (nombre derivado de Géminis) que contienen la SMN (Survival of Motor Protein), proteína cuya malfunción provoca la atrofia muscular espinal. Las interacciones entre CBs y gems pueden tener que ver con el transporte de snRNP, las modificaciones finales que sufren estas moléculas o bien ser lugares donde se recicla el RNA procedente de la eliminación de intrones durante el proceso de ajustación.

Los cuerpos PML formados principalmente por la oncoproteína de la leucemia promielocítica son estructuras anulares de 0.2-1.0 μm que se reparten en un número de 20 a 30 por el nucleoplasma. En la leucemia promielocítica una translocación entre los cromosomas 15 y 17 produce la fusión del gen para dicha oncoproteína con el gen del ácido retinoico y los cuerpos PML se disgregan. Los PML se asocian a veces con los CBs y los ayustosomas. Su función es desconocida, pero los CB podrían ser cuerpos donde se almacenan provisionalmente cierto número de proteínas nucleares (revisado en Dundr y Misteli, 2001).

Las pequeñas proteínas nucleolares U1, U2, U4/6 y U5 (Small Nucleolar Ribonucleoproteins o snRNPs) tienen un importante papel en la maduración del ARNr. Los anticuerpos que marcan los snRNPs producen un característico patrón punteado sobre un fondo de tinción difusa del nucleoplasma. El patrón difuso se debe a los SNRps que interactúan con el RNA recién sintetizado. El patrón punteado se debe a varios cuerpos nucleares. Hay gránulos intercromatínicos formados por agregados de SNRps y otras proteínas que se sitúan en los espacios donde la cromatina es menos densa. En las zonas asociadas a los gránulos intercromatínicos la única snRNPs que se encuentra es U1. Hay también fibrillas pericromáticas estrechamente asociadas con la cromatina activa y que contienen ARNm procesado y sus precursores. En estos

momentos aún se ignora si los gránulos intercromatínicos son el resultado de un proceso pasivo de almacenamiento de factores inactivos o si realmente tienen un papel activo en los procesos de ajustación y transporte del ARNm.

Modelos de organización del núcleo celular

El modelo tradicional de organización del núcleo celular considera que la cromatina se distribuye de manera difusa ocupando la totalidad del volumen nuclear y que el único orgánulo que se reconoce es el nucleolo (Brachet, 1961). La microscopía electrónica permite observar una envoltura nuclear que aísla el contenido nuclear del citoplasma. Se distingue una membrana externa que tiene continuidad con el retículo endoplasmático rugoso (al que están unidos ribosomas) y una membrana interna que se asocia a una red fibrosa (lámina) compuesta por tres proteínas (proteínas laminares A, B y C). La membrana externa se continua con una membrana interna a través de los poros nucleares (Figura 1.9).

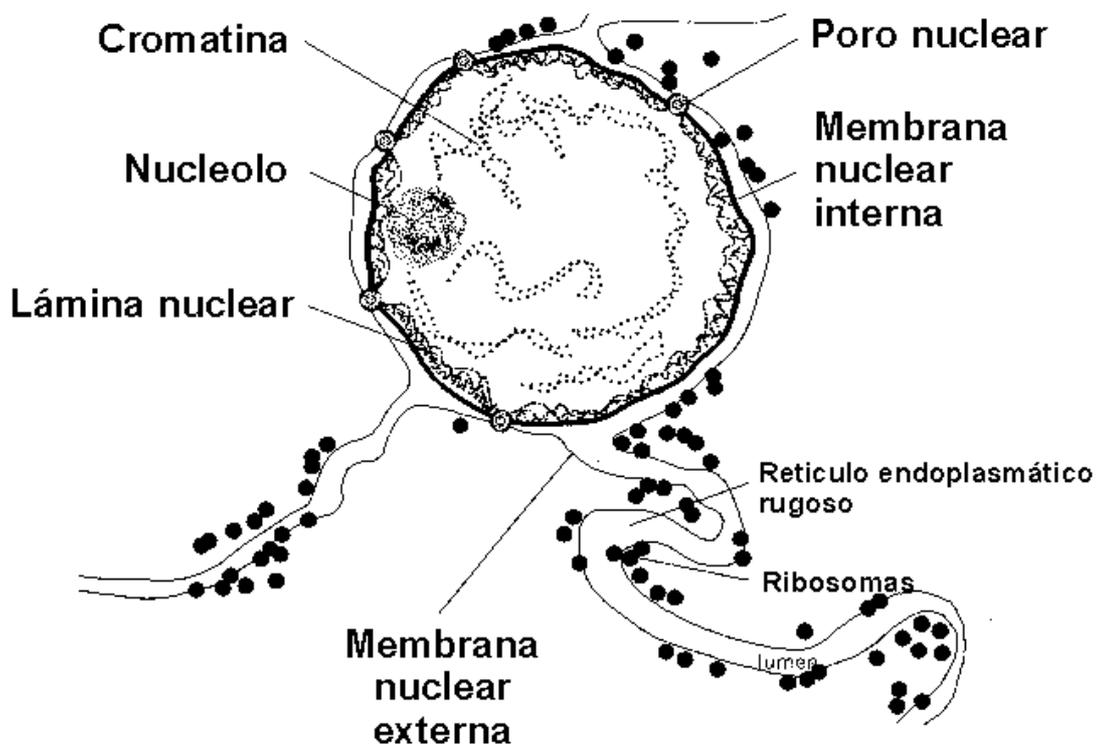


Figura 1.9: Modelo tradicional del núcleo de una célula animal.

Los poros nucleares no son simples agujeros en la envoltura nuclear, sino estructuras muy complejas formadas por un gran número de proteínas y que regulan el transporte de moléculas entre el núcleo y el citoplasma. Están embebidos en la envoltura nuclear y se componen de tres zonas: el interruptor central, los radios y los anillos (Figura 1.10).

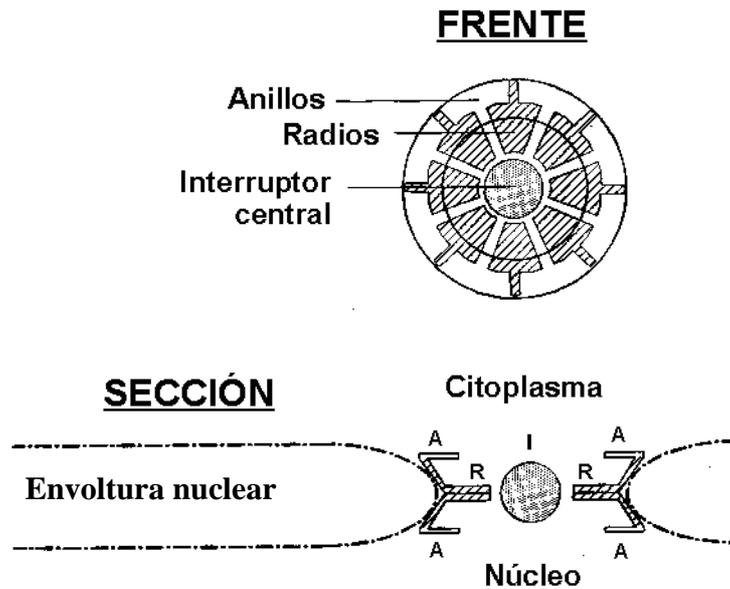


Figura 1.10: Componentes del poro nuclear.

I: Interruptor central; R: radio; A: anillo

La heterocromatina se visualiza como una estructura grumosa, con frecuencia en la periferia nuclear, pero respetando los poros nucleares (Figura 1.11). Se ha propuesto que la cromatina inactiva que rodea las zonas en transcripción está unida a la lámina, sujetando las zonas activas sobre el poro y permitiendo su comunicación con el citoplasma (Blobel 1985).

Jackson y col. (1992) han propuesto un modelo que considera que la matriz nuclear está formada por una densa red de filamentos esqueléticos que sostienen de la arquitectura nuclear y permiten su compartimentalización

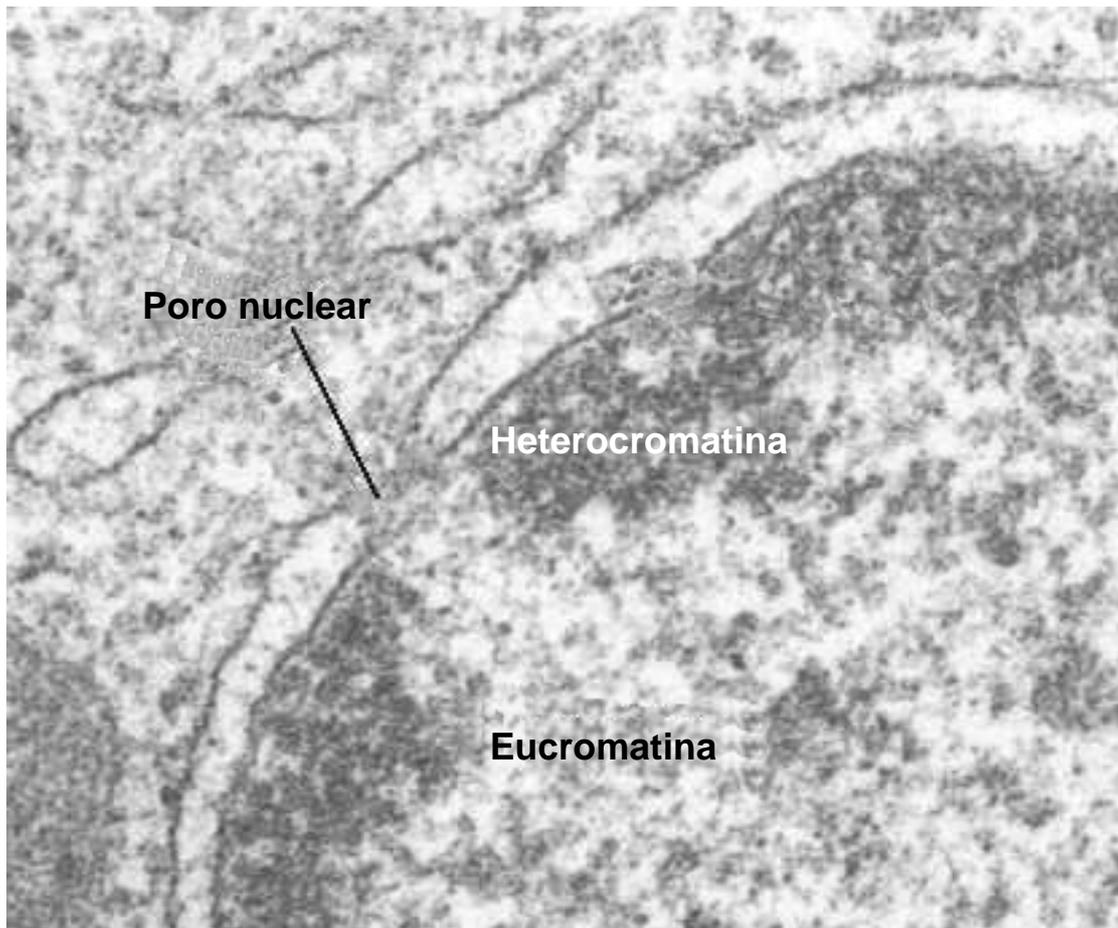


Figura 1.11: Fotografía al microscopio electrónico de un poro nuclear.

Razin y Gromova (1995) han propuesto un nuevo modelo en el que el andamio cromosómico al que se unen los lazos de ADN forma un canal conectado con un poro nuclear (Figura 1.12). La matriz nuclear interna es una intrincada red de canales que permiten el transporte desde el citoplasma de precursores de ADN y ARN, enzimas implicados en su replicación y proteínas reguladoras y el transporte al citoplasma del ARN mensajero. En algunos puntos, los canales se ensanchan formando cavidades donde se sitúan, grupos de replicones y puntos de ayustación del ARN. En este modelo, la matriz nuclear añade a las funciones del modelo anterior la organización del transporte de macromoléculas dentro del núcleo celular.

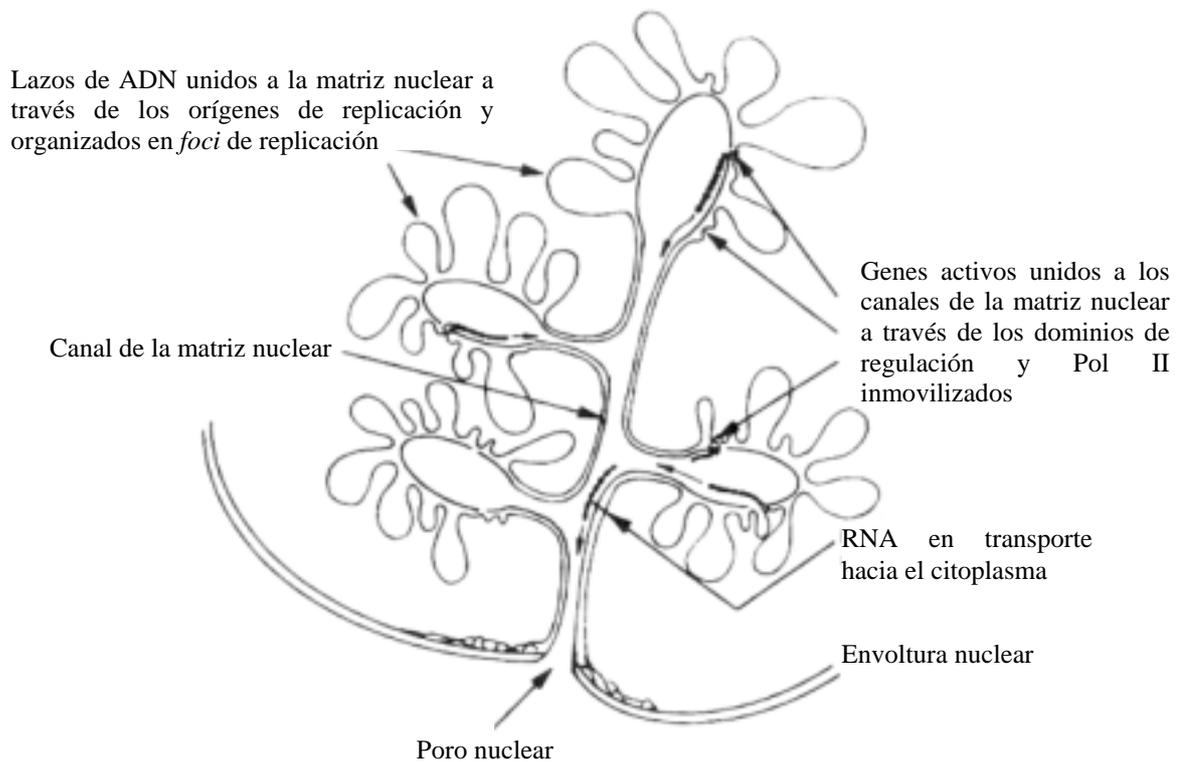


Figura 1.12: Modelo del núcleo basado en la matriz nuclear (Razin, 1997).

Los estudios de FISH permiten visualizar territorios cromosómicos bien diferenciados y son el origen de dos tipos de modelos que tratan de explicar esta observación.

Por un lado hay modelos de organización de la cromatina nuclear que se basan en simulaciones informáticas que asumen únicamente características simples de los polímeros. Así el modelo del lazo gigante/paseo aleatorio (Giant Loop/Random Walk) asume lazos de cromatina de gran tamaño (3 a 5 millones de pares de bases) que se unen al azar a la matriz nuclear (Sachs y col. , 1995). Una modificación, el compartimento multilazo produce compartimentos discretos (Münkel y Langowski, 1998).

Otro tipo diferente de modelos se basa en la organización funcional de los territorios cromosómicos. El modelo del compartimento del dominio intercromosómico (Interchromosome Domain Compartment, ICD) postula que los cromosomas ocupan territorios cromosómicos discretos sin solaparse los unos con los otros (Figura 1.13). La similitud de cargas crearía fuerzas de repulsión (fuerzas de Debye- Huckel) entre los diversos territorios que provocarían su separación y la creación de un espacio o dominio intercromosómico (ICD) a través del cual el ARNm es transportado desde los puntos de transcripción y ayustación hasta la periferia nuclear.

Este modelo considera que el ADN activo está situado en la periferia de los territorios cromosómicos y algunos lazos de ADN pueden adentrarse en el dominio ICD. De esta forma los productos de la transcripción se verterían directamente al dominio ICD. Los factores de transcripción se concentrarían en el espacio ICD, reduciendo el volumen en el que deben buscar sus secuencias diana (Cremer y col. , 1993; Cremer y Cremer, 2001).

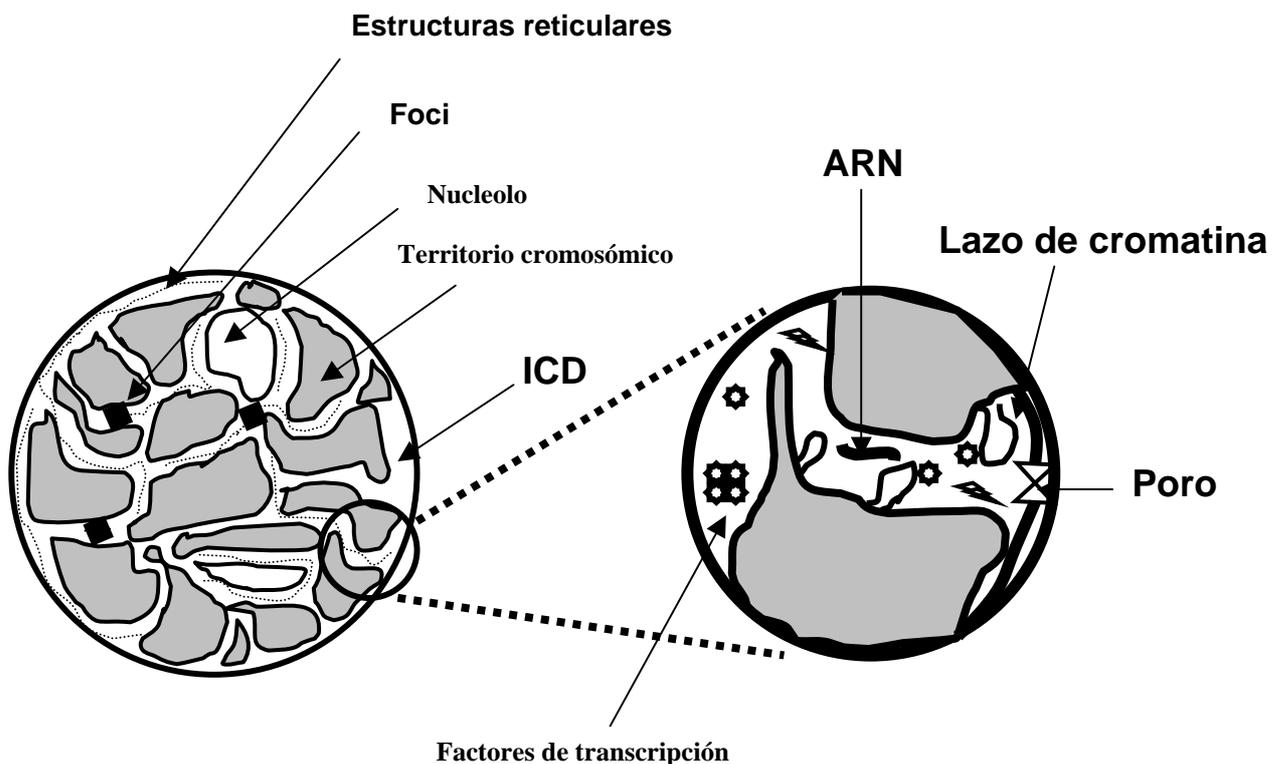


Figura 1.13: Modelo del núcleo basado en los territorios cromosómicos.

1.3 LOS DOBLECES CROMOSÓMICOS

Revisión histórica

En 1984 Flejter y colaboradores analizaron preparaciones cromosómicas convencionales pertenecientes a dos cultivos de líquido amniótico y a uno de sangre periférica, anotando la localización cromosómica de los dobleces cromosómicos con un ángulo igual o superior a los 45°. A partir de los datos obtenidos (Tabla I y figura 1.14) estos autores concluyeron que los dobleces no centroméricos de los cromosomas metafásicos no se distribuyen de forma aleatoria sino que se concentran en algunas bandas, especialmente Xq13-q21. Observaron este doblez en un 63% de las metafases femeninas analizadas, pero sólo en un 2% de las masculinas. Por otra parte, no hallaron

células con un doblez en ambos cromosomas X. En el resto de las zonas cromosómicas observaron una distribución de dobleces de difícil interpretación: su número parecía correlacionarse con el tamaño del cromosoma y brazos implicados, con la posición del centrómero y con la densidad de bandas G (Figura 1.14).

TABLA I: Dobleces centroméricos hallados por Flejter y col. (1984).

Cromosoma	Amniocitos XX	Amniocitos XY	Linfocitos XX	TOTAL
1	37	34	28	99
2	31	25	22	78
3	26	32	28	86
4	18	12	18	48
5	21	13	14	48
6	24	23	15	62
7	20	22	24	66
8	15	25	19	59
9	20	22	19	61
10	16	17	14	47
11	21	11	19	51
12	15	14	16	35
13	3	0	0	3
14	4	1	1	6
15	3	0	0	3
16	19	18	18	55
17	17	19	14	50
18	8	7	12	27
19	10	11	21	42
20	10	14	16	40
21	0	0	0	0
22	1	0	0	1
X	16	10	10	36
Y	---	0	---	---
Total	355	330	328	1013

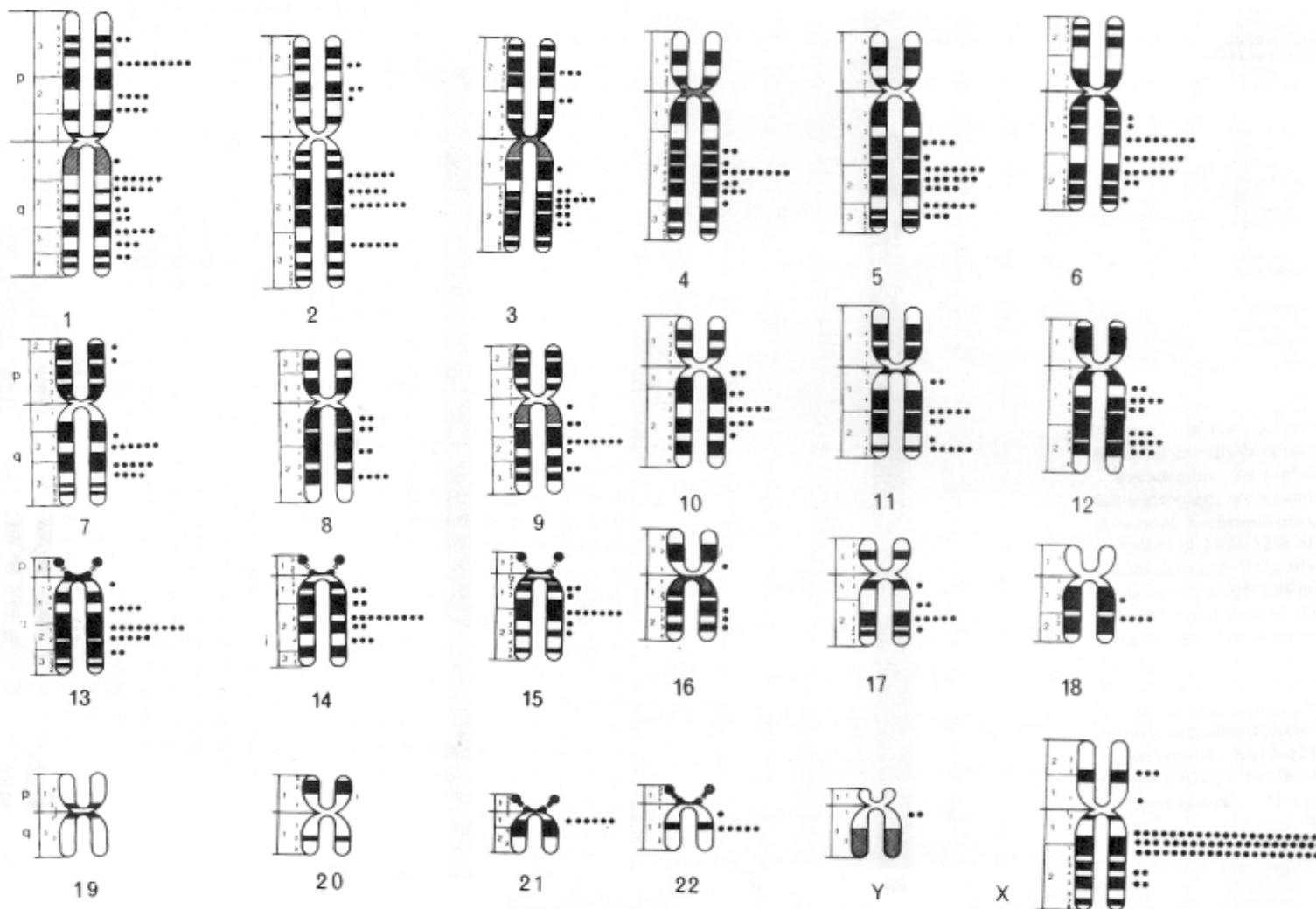


Figura 1.14: Dobleces detectados por Flejter y col. (1984).

Flejter y col. (1984) observaron que el doblez del cromosoma X se sitúa en las bandas Xq13.3 y Xq21.1. Mediante técnicas de incorporación de BrdU, observaron que un 11-32% de los cromosomas X de replicación tardía (el cromosoma X inactivo o lionizado) y sólo un 0.25% de los cromosomas X de replicación temprana estudiados presentaban dobleces en q13-q21 (el artículo original no detalla el tejido analizado). Los dobleces centroméricos no presentaron estas diferencias (45/300 cromosomas X inactivos frente a 63/100 cromosomas activos). Basándose en estos datos, Flejter y col. (1984) propusieron que estos dobleces podrían tratarse de remanentes del corpúsculo de Barr presente en la interfase.

En el caso de los dobleces autosómicos, los autores no presentaron mas datos experimentales pero sí dos hipótesis alternativas. Los dobleces pueden ser remanentes de la asociación de telómeros, centrómeros y replicones con la envoltura nuclear durante la interfase o bien ser puramente puntos de mayor elasticidad que tienden a doblarse al ser sometidos a fuerzas mecánicas durante el proceso de obtención de las preparaciones cromosómicas.

Flejter y col. (1984) también analizaron los dobleces del cromosoma X en sujetos con anomalías numéricas y estructurales de este cromosoma. Los dobleces se localizaron casi exclusivamente en los cromosomas inactivos pero curiosamente la frecuencia de dobleces en el cromosoma X fue menor en los sujetos con aneuploidias del cromosoma X que en los controles. Los autores interpretaron que esto se debía a la menor resolución media obtenida en los cultivos de los sujetos con aneuploidias del cromosoma X: sus estudios en controles mostraron que el cromosoma X se doblaba en un 21-40% de las metafases de resolución media, pero solo un 6-21% de las metafases de baja resolución. La mayoría de los estudios posteriores se han centrado en el doblez asociado al cromosoma X, que ha sido utilizado como marcador del cromosoma X inactivo en diversos individuos, normales y con cariotipos patológicos (Van Dyke y col. 1985, 1986; Avalos y col. , 1989; Munn y col., 1991; Monaghan y col., 1998) y en otras especies de primates (Flejter y col. , 1986). Se ha demostrado su presencia en la metafase temprana, prometafase y profase (Van Dyke y col. 1987).

Flejter y col. (1984) hallaron un 63% de las células femeninas con dobleces en Xq13-Xq22 una cifra extraordinariamente elevada en comparación al 7,8% hallado en el amplio estudio realizado por Munn y col. (1985). Mientras Flejter y col. (1984) realizaron su estudio en datos agrupados procedentes de dos cultivos de líquido amniótico y uno de sangre periférica, Munn y col. (1985) realizaron su estudio

exclusivamente en cultivos de sangre periférica. Una posible explicación, sugerida por Van Dyke y col. (1986), es que el cromosoma X se dobla con mas frecuencia en los cultivos de amniocitos que en los de linfocitos.

Mientras, los dobleces autosómicos quedaron relegados al olvido con una única posible excepción del estudio realizado por Fuster y col. 1988. Estos autores observaron que los entrecruzamientos de cromátides hermanas (frecuentemente un doblez cromosómico) se correspondían en mas de un 50% de las veces con la localización de lugares frágiles, sugiriendo que podían tratarse de algún tipo de prelesión cromosómica. Finalmente, estudios basados en la aplicación de técnicas de FISH en combinación con microscopía confocal parecieron sugerir que el corpúsculo de Barr es un cromosoma X doblado con sus telómeros en asociación (Walker y col. 1991). Esta configuración no se observó en el cromosoma X activo. En principio estos resultados constituyeron una fuerte evidencia a favor de las tesis de Flejter y col (1984) en lo que el cromosoma X se refiere, pero Dietzel y col. (1998a) no pudieron confirmar los hallazgos de Walker y col. (1991), pese a utilizar una tecnología bastante similar.

Métodos de estudio de los dobleces cromosómicos

Desde el punto de vista estadístico, el estudio de los dobleces en los cromosomas mitóticos presenta las mismas complejidades que el estudio de los sitios frágiles cromosómicos. En ambos casos se trata de determinar si un suceso (rotura o doblez cromosómico) que se observa un determinado número de veces en una banda cromosómica es fruto del azar o no.

Los estudios más antiguos basan la identificación de un sitio frágil en la presencia de una frecuencia de roturas superior a un valor arbitrario o en la aplicación del test de χ^2 (hay una buena revisión histórica en Jordan y col. , 1990). Ambas aproximaciones son inadecuadas ya que diferentes decisiones arbitrarias pueden llevar a interpretaciones opuestas de los mismos datos, carecen de validación teórica o experimental y el test de χ^2 no es aplicable a este tipo de problemas por que existe un gran número de clases (las bandas cromosómicas) y un pequeño número (en muchos casos 0) de sucesos (roturas o dobleces) (Smith, 1986).

Un método usual es agrupar varias clases a fin de obtener un número suficiente de sucesos, pero esto lleva a decisiones arbitrarias sobre que clases agrupar y asume la independencia estadística de los datos, lo cual no tiene por que ser verdad. Smith (1986)

propuso utilizar los valores aproximados de la media y la varianza de $\sqrt{\chi^2}$ para comprobar la no aleatoriedad.

Otros métodos estadísticos más sofisticados se basan en el ajuste de los datos a una distribución de Poisson (Mariani, 1989), una distribución binomial, y simulaciones de tipo Monte Carlo (De Braekeleer y Smith, 1988). En estos casos se consideran sitios frágiles no al azar aquellos que se sitúan dentro de una determinada fracción extrema de la distribución. Estas distribuciones no se ajustan bien a los datos observados (Jordan y col. , 1990; Dahm y Grenbaum, 1994) y no son adecuados al estudio de individuos aislados (Böhm y col. , 1995).

En 1995, Böhm y col. presentaron un modelo basado en una distribución multinomial. En esencia, se trata de comprobar secuencialmente la homogeneidad de los subgrupos de datos cada vez más pequeños bajo un modelo multinomial que asigna probabilidades iguales al mayor grupo posible de sitios no frágiles y probabilidades sin ningún tipo de restricción al resto de los sitios considerados como frágiles. La bondad del ajuste se comprueba con la χ^2 estandarizada de Pearson y la razón de probabilidad (G2). Los mismos autores han desarrollado el programa FSM, que efectúa de forma automatizada el análisis descrito por Böhm y col. (1995). Hasta el momento sólo existe una crítica a esta metodología (Hou y col. , 1999) según la cual el modelo es aplicable si se asume que la probabilidad de una rotura es independiente del tamaño de las bandas cromosómicas (modelo de equiprobabilidad), pero no si se asume que el número de roturas es proporcional al tamaño de las bandas (modelo de probabilidad proporcional). Böhm y col., (1995) y McAllister y Greenbaum (1997) han mostrado como la práctica de agrupar los datos de varios individuos en uno solo (utilizada por algunos autores cuando la frecuencia de los cromosomas mostrando sitios frágiles en un estudio es baja) lleva a una sobrestima en el número y frecuencia de los sitios frágiles. Greenbaum y col. (1997) han generando grupos de roturas cromosómicas mediante simulaciones de tipo Monte Carlo. El estudio de estas bases de datos ficticias a diferentes niveles de resolución con la metodología FSM les ha permitido determinar que para este tipo de pruebas a un nivel de significación $\alpha = 0.05$, el mínimo número de roturas necesarias para la identificación de sitios frágiles en un individuo es $n \leq 0.5 k$, siendo k el número de bandas del cariotipo haploide (que varía según el nivel de resolución utilizado en un determinado estudio). En el caso más común, esto es $k = 400$, el mínimo número de roturas necesarias es de 200.

2 OBJETIVOS

1. Confirmar que los dobleces de los cromosomas mitóticos son un fenómeno que muestra una distribución no aleatoria.
2. Determinar con la máxima precisión posible la localización de los dobleces cromosómicos.
3. Analizar si existen diferencias en la frecuencia con que se observan los dobleces cromosómicos dependientes de la resolución de las metafases o del tipo de tejido analizado.
4. Estudiar si los dobleces cromosómicos observados en la metafase son un remanente de la organización de los cromosomas en la interfase precedente.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 SUJETOS Y MUESTRAS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO.

Este estudio se realizó en pacientes referidos a la Unitat de Genètica del Hospital Materno-Infantil “Vall d’Hebron” por diversos motivos. Los datos más relevantes y el tipo de muestras analizadas se detallan en la Tabla II.

TABLA II: Sujetos y muestras incluidos en el presente estudio.

Sujeto	Sexo	Cariotipo / diagnóstico citogenético	Tejido
1	Hembra	Anemia de Fanconi	Sangre periférica
2	Hembra	PCD + Aneuploidia variegada	Sangre periférica
3	Hembra	Normal	Sangre periférica
4	Hembra	Normal	Sangre periférica
5	Hembra	Normal	Sangre periférica
6	Varón	PCD	Sangre periférica
7	Varón	PCD	Sangre periférica
8	Varón	Normal	Sangre periférica
9	Varón	Normal	Sangre periférica
10	Varón	Ataxia telangiectasia	Sangre periférica
11	Varón	Normal	Sangre periférica
12	Hembra	Normal	Líquido amniótico
13	Hembra	Normal	Líquido amniótico
14	Varón	Normal	Líquido amniótico
15	Varón	Normal	Líquido amniótico
16	Hembra	Normal	Vellosidad corial
17	Hembra	Normal	Vellosidad corial
18	Varón	Normal	Vellosidad corial
19	Varón	Normal	Vellosidad corial
20	Hembra	Polimorfismo 15q11 simulando deleción	Sangre periférica
21	Varón	Prader Willi por deleción	Sangre periférica
22	Varón	Translocación Yqh/15p	Sangre periférica

El sujeto 1, con un diagnóstico de Anemia de Fanconi, muestra una hipersensibilidad al efecto clastogénico del diepoxibutano (DEB) típica de dicho síndrome (Auerbach y col. , 1989). El sujeto 10, con un diagnóstico de ataxia telangiectasia, muestra una alta frecuencia de reorganizaciones en los cromosomas 7 y 14 (7p14, 7q34-35, 14q12 y 14q32) típica de dicho síndrome (Aurias y col. , 1986; Howell y col. , 1992). Ambos pacientes han permitido explorar la posible relación entre dobleces y roturas cromosómicas.

El sujeto 2 está afecto de aneuploidía variegada asociada a separación prematura de los centrómeros (PCD), mientras que los sujetos 6 y 7 muestran una separación prematura de los centrómeros (PCD) no asociada aneuploidía variegada (Plaja y col., 2001). En estos pacientes se exploró la posible influencia sobre los dobleces cromosómicos de un defecto celular que implica una separación prematura de las cromátides.

El sujeto 20 presenta un polimorfismo de la banda 15q11 que implica su práctica desaparición y simula una deleción 15q11q13 (Hoo y col. , 1990). El paciente presentaba obesidad y un ligero retraso mental pero las pruebas moleculares y de FISH descartaron un síndrome de Prader Willi por disomía uniparental o deleción. El sujeto 21 es un paciente con un síndrome de Prader Willi por deleción 15q11q13 diagnosticado mediante estudios de FISH. El sujeto 22 posee un polimorfismo cromosómico diagnosticado fortuitamente en el transcurso de un diagnóstico prenatal realizado en su mujer: tanto en el feto como en el sujeto 22 se observó un cromosoma 15 con un aumento en el tamaño del brazo p debido a la presencia de material heterocromático procedente del cromosoma Y. La identidad del exceso de material se determinó mediante un pintado cromosómico. Estos tres casos nos han permitido realizar un estudio detallado del doblez situado en 15q11q13 en diferentes situaciones.

El resto de los sujetos son individuos o fetos con cariotipo normal.

A excepción de los individuos 2 y 7 (hermanos) y sus padres (sujetos 3 y 6) no existen relaciones de parentesco entre los sujetos estudiados.

3.2 TÉCNICAS DE CITOGENÉTICA CONVENCIONAL.

Las extensiones cromosómicas a partir de cultivos de sangre periférica, líquido amniótico y vellosidades coriales se obtuvieron de acuerdo a los protocolos detallados en el Apéndice 1. En el caso del líquido amniótico y vellosidades cultivadas, las células se hicieron crecer directamente sobre el portaobjetos en el que posteriormente se realizó

la observación al microscopio a fin de tratar de reducir al mínimo los posibles artefactos producidos durante el proceso de extracción.

Las bandas G se obtuvieron mediante tinción con colorante de Wright de acuerdo a los protocolos detallados en el Apéndice 1. Esta técnica preserva la morfología cromosómica mucho mejor que las técnicas basadas en el tratamiento con tripsina, facilitando la detección de dobleces sutiles.

3.3 TÉCNICAS DE FISH

Los estudios de FISH para el diagnóstico de la delección asociada al síndrome de Prader Willi se realizaron mediante la utilización simultanea de las sondas SNRPN y D15S10 (Vysis) marcadas con FITC y un marcador localizado en la zona distal del brazo q del cromosoma 15 (Apéndice I). La localización por FISH de la zona crítica de los síndromes de Prader Willi y Angelman dentro del doblez más proximal identificado en el cromosoma 15 se realizó en portaobjetos de sujetos normales hibridados en las condiciones que se acaban de describir.

3.4 TÉCNICAS DE GENÉTICA MOLECULAR

Los estudios moleculares de disomía uniparental del cromosoma 15 fueron realizados mediante el estudio de los dinucleótidos polimórficos D15S11, GABRB3, D15S128, D15S210 y D15S122.

3.5 CRITERIOS DE ANÁLISIS DE LOS DOBLECES CROMOSÓMICOS

Nivel de resolución de las metafases.

El estudio se realizó en metafases halladas de forma consecutiva a fin de minimizar posibles desviaciones debidas a la selección de un determinado tipo de metafase.

La resolución de una determinada metafase se evaluó de forma aproximada basándose en algunas bandas de los cromosomas 7 y 10 (Figura 3.1). Estos cromosomas muestran los patrones de bandas más estables en estudios de perfiles densitométricos (Lundsteen y col. , 1980) y la máxima precisión en la determinación de la calidad de bandas de una metafase (Huret y col. , 1987). En breve, si las bandas 7q33 y 7q35 no se pueden discriminar en al menos uno de los dos cromosomas 7, la puntuación es 0 (menos de 400 bandas). Si las bandas anteriores se pueden discriminar, pero no

10q21.1/10q23.1/10q25.1 de 10q21.3/10q23.3 /10q25.3 la puntuación es 1 (aproximadamente 400 bandas). Finalmente, si todas estas bandas se pueden discriminar, la puntuación es de 2 (igual o superior a las 550 bandas).

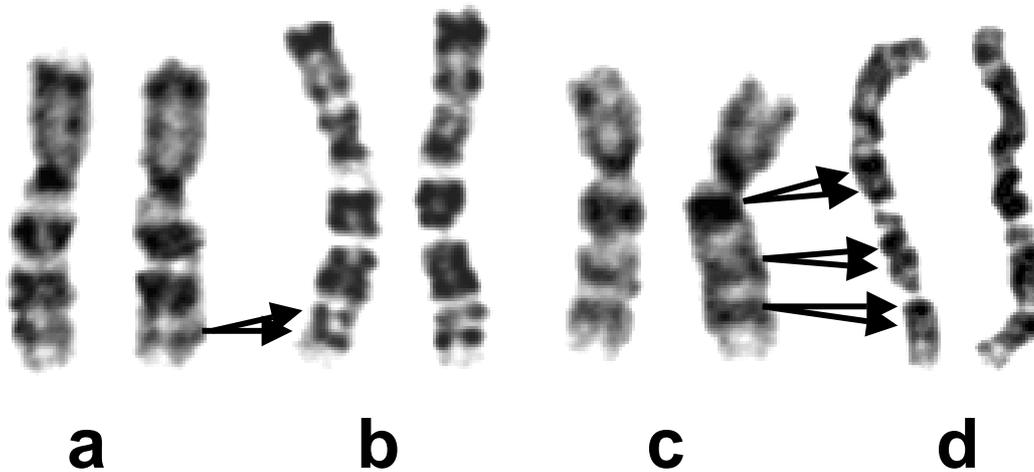


Figura 3.1: Evaluación de la resolución de una metafase.

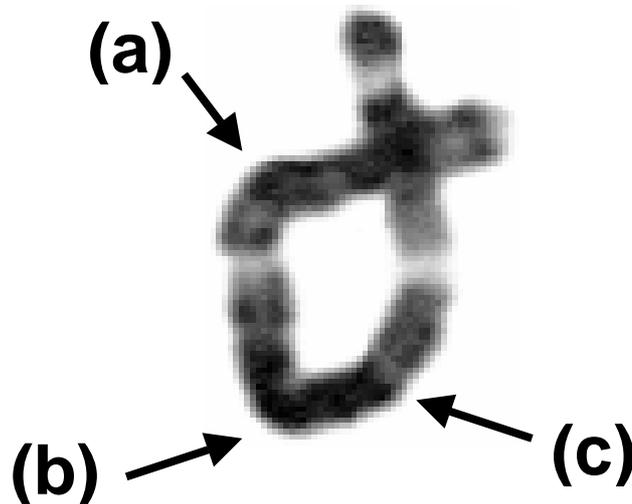
(a) Cromosomas 7 con resolución inferior a las 400 bandas, (b) cromosomas 7 con resolución aproximadamente igual a las 400 bandas (se discriminan las bandas 7q33 y 7q35), (c) cromosomas 10 de resolución inferior a las 550 bandas, (d) cromosomas 10 con resolución aproximadamente igual a las 550 bandas (se discriminan las bandas 10q21.1, 10q21.3, 10q23.1, 10q23.3, 10q25.1 y 10q25.3)

Observación de los dobleces cromosómicos.

Un doblez cromosómico fue definido como un cambio en la dirección del eje longitudinal de un cromosoma que afecta a ambas cromátides y se circunscribe a una única banda cromosómica. Se siguió un criterio restrictivo, y los dobleces dudosos por alguna causa (morfología cromosómica de baja calidad, artefactos de tinción, etc.) no fueron incluidos en el estudio. La identificación de las bandas se realizó de acuerdo a los ideogramas publicados por el ISCN (1985).

La definición anterior o criterio amplio difiere de la empleada por otros autores. Los estudios anteriores los definían como dobleces del eje longitudinal de 45° o más (Figura 3.2). Esta definición o criterio restringido obliga a descartar numerosos dobleces y es de muy difícil aplicación en los dobleces situados muy cerca de otros dobleces o en las zonas centromérica o teloméricas de los cromosomas. Por todo ello, esta definición

clásica puede llevar a infravalorar el número de dobleces detectados en los extremos proximales y/o distales de los brazos cromosómicos.



***Figura 3.2: Cromosoma 3 mostrando diferentes tipos de doblez cromosómico.
(a) Dobleces que cumplen los criterios amplio y restringido (b) doblez centromérico y (c)
dobleces que sólo cumple el criterio amplio.***

Se analizaron metafases consecutivas haciendo un esfuerzo para evitar cualquier tipo de selección excepto el de tratarse de una metafase completa (estudios generales) o no haber perdido los cromosomas a estudio (estudios de frecuencia de dobleces). En el caso concreto de los análisis de alta resolución, las metafases incluidas en el estudio cumplen los tres criterios siguientes: resolución igual o superior a 1 (400 bandas), presencia de los dos cromosomas homólogos en estudio y presencia de un patrón de bandas bien definido.

Análisis estadístico de los dobleces no centroméricos.

Los datos originales del estudio en sangre periférica, detallando la localización de los dobleces en bandas a diferentes grados de resolución, se tradujeron a un nivel uniforme de 400 bandas (ISCN, 1985). Una simplificación adicional se realizó agrupando bandas que son difíciles de discriminar en cromosomas de baja resolución (Tabla III). Estos grupos se definieron agrupando aquellas bandas en que la asignación del doblez fue dudosa en nuestro estudio en al menos cuatro ocasiones (considerado por el programa FSM mas adelante descrito como punto de corte para decidir que un determinado doblez no es aleatorio en nuestros datos no simplificados). Finalmente, se descartaron los dobleces cuya localización es dudosa o asignados con una resolución inferior al nivel de las 400 bandas.

TABLA III: Denominación común de grupos de bandas de difícil discriminación a baja resolución.

Bandas agrupadas	Denominación común
1p33, 1p34.1, 1p34.2, 1p34.3, 1p35	1p33p35
1q22, 1q23, 1q24	1q22q24
2p14, 2p15, 2p16	2p14p16
2q14.1, 2q14.2, 2q14.3	2q14
2q22, 2q23, 2q24	2q22q24
3p22, 3p23, 3p24	3p22p24
3q13.1, 3q13.2, 3q13.3	3q13
3q26.1, 3q26.2, 3q26.3	3q26
4p15.1, 4p15.2, 4p15.3	4p15
4q22, 4q23, 4q24	4q22q24
4q31.1, 4q31.2, 4q31.3	4q31
6p21.1, 6p21.2, 6p21.3	6p21
8q21.1, 8q21.2, 8q21.3	8q21
11q14, 11q21, 11q22	11q14-22
15q11.1, 15q11.2, 15q12, 15q13	15q11q13
16q12.1, 16q12.2, 16q13	16q12q13
Xp11.1, Xp11.2, Xp11.3, Xp11.4	Xp11
Yp11.3, Yp11.2, Yp11.1, Yq11.1, Yq11.2, Yq12	Y

A fin de permitir comparaciones en el estudio de los dobleces no centroméricos en líquido amniótico y vellosidad corial se han utilizado las mismas denominaciones comunes utilizadas en el estudio en sangre periférica.

Tras la aplicación de las conversiones de la Tabla III el cariotipo haploide resultante contiene 351 bandas en las hembras y 352 en los varones, ya que el cromosoma Y se consideró como una única banda (Böhm y col. , 1995).

Siguiendo las indicaciones de Greenbaum y col. (1997) se anotaron los dobleces presentes en los cromosomas de metafases consecutivas hasta que el número de dobleces no centroméricos fue igual o superior a 175 (la mitad del número de bandas considerado en las hembras). En cada metafase se anotó la localización de los dobleces centroméricos y no centroméricos y la puntuación asignada a la metafase (0, 1 o 2) para evaluar su nivel de resolución.

Se consideró que todas las bandas presentan una contribución similar al genoma, ya que los dobleces en una determinada metafase usualmente están bastante espaciados y por tanto es improbable la coincidencia de dos dobleces en una misma banda.

Las bandas cromosómicas que manifestaron en nuestro estudio una frecuencia de dobleces no aleatoria ($\alpha=0.05$) se identificaron mediante el programa estadístico FSM (versión 995) (Böhm y col. , 1995) tal como se detalla en el Apéndice II. Ambos sexos se analizaron de forma separada, y sólo se tomaron en cuenta los dobleces considerados como no debidos al azar tanto por la prueba estadística de χ^2 como por la de G^2 . Los dobleces estadísticamente significativos sólo por una de las dos pruebas o sólo agrupando los datos de todos los individuos también fueron desechados. McAllister y Greebaum (1997), han hecho notar que la agrupación de datos pertenecientes a diferentes individuos puede producir una sobrestima en el número y frecuencia de los dobleces considerados como no debidos al azar.

Análisis estadístico de los dobleces centroméricos.

A fin de permitir comparaciones, se ha utilizado la misma metodología que Flejter y col. (1984). Todos los dobleces centroméricos fueron agrupados y comparados con la longitud cromosómica relativa y el índice centromérico (longitud del brazo corto dividido por la longitud total del cromosoma y multiplicado por 100) mediante el coeficiente de correlación del producto de momentos r (Fórmula 1) (Parker, 1976):

$$r = \frac{\Sigma xy - \frac{(\Sigma x)(\Sigma y)}{n}}{\sqrt{[\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{n}] [\Sigma y^2 - \frac{(\Sigma y)^2}{n}]}}$$

Fórmula 1: Coeficiente de correlación del producto de momentos r .

x es el número de dobleces en una determinada banda e y la longitud cromosómica relativa o el índice centromérico.

En los cálculos se han utilizado datos del ISCN (1985) basados en las medidas realizadas en 20 células por el Dr. Pearson, en 10 células por el Dr. Caspersson y col. y en 95 células por el Dr. Lubs y col. (Tabla IV). Como el número de células analizadas es muy diferente entre los tres grupos la media de todas los datos se calculó de acuerdo a la Fórmula 2.

$$\text{Media} = \frac{(\text{Pearson} * 20) + (\text{Caspersson} * 10) + (\text{Lubs} * 95)}{125}$$

Fórmula 2: Cálculo del valor medio global de los datos ISCN (1985) basados en las medidas realizadas en 20 células por el Dr. Pearson, en 10 células por el Dr. Caspersson y col. y en 95 células por el Dr. Lubs y col.

TABLA IV: Media y desviación estándar de la longitud relativa e índice centromérico de cada cromosoma (basado en ISCN 1985)

Cromo soma	Longitud relativa				Índice centromérico			
	A	B	C	D	A	B	C	D
1	9.08	9.08 ± 0.611	9.11 ± 0.53	8.44 ± 0.433	48.0	49.4 ± 3.04	48.6 ± 2.6	48.36 ± 1.166
2	8.45	8.17 ± 0.250	8.61 ± 0.41	8.02 ± 0.397	38.1	39.4 ± 2.05	38.9 ± 2.6	39.23 ± 1.824
3	7.06	6.96 ± 0.352	6.97 ± 0.36	6.83 ± 0.315	45.9	47.6 ± 2.10	47.3 ± 2.1	46.95 ± 1.557
4	6.55	6.62 ± 0.403	6.49 ± 0.32	6.30 ± 0.284	27.6	29.2 ± 2.97	27.8 ± 3.3	29.07 ± 1.867
5	6.13	6.34 ± 0.366	6.21 ± 0.50	6.08 ± 0.305	27.4	29.2 ± 3.03	26.8 ± 2.6	29.25 ± 1.739
6	5.84	6.19 ± 0.516	6.07 ± 0.44	5.90 ± 0.264	37.7	39.1 ± 2.63	37.9 ± 2.5	39.05 ± 1.665
7	5.28	5.60 ± 0.435	5.43 ± 0.47	5.36 ± 0.271	37.3	35.3 ± 2.90	37.0 ± 4.2	39.05 ± 1.771
X	5.80	5.45 ± 0.377	5.16 ± 0.24	5.12 ± 0.261	36.9	41.4 ± 6.16	37.5 ± 2.7	40.12 ± 2.117
8	4.96	5.13 ± 0.307	4.94 ± 0.28	4.93 ± 0.261	35.9	32.7 ± 2.80	32.8 ± 2.8	34.08 ± 1.975
9	4.83	4.81 ± 0.194	4.78 ± 0.39	4.80 ± 0.244	33.3	37.0 ± 3.04	32.7 ± 4.1	35.43 ± 2.559
10	4.68	4.66 ± 0.512	4.80 ± 0.58	4.59 ± 0.221	31.2	35.4 ± 3.81	32.3 ± 2.9	33.95 ± 2.243
11	4.63	4.70 ± 0.289	4.82 ± 0.30	4.61 ± 0.227	35.6	40.7 ± 3.07	40.5 ± 3.3	40.14 ± 2.328
12	4.46	4.66 ± 0.410	4.50 ± 0.26	4.66 ± 0.212	30.9	30.5 ± 3.64	27.4 ± 4.0	30.16 ± 2.339
13	3.64	3.22 ± 0.310	3.87 ± 0.26	3.74 ± 0.236	14.8	-	16.6 ± 3.6	17.08 ± 3.227
14	3.55	3.09 ± 0.212	3.74 ± 0.23	3.56 ± 0.229	15.5	-	18.4 ± 3.9	18.74 ± 3.596
15	3.36	2.83 ± 0.262	3.30 ± 0.25	3.46 ± 0.214	14.9	-	17.6 ± 4.6	20.30 ± 3.702
16	3.23	3.46 ± 0.353	3.14 ± 0.55	3.36 ± 0.183	40.6	42.2 ± 3.57	42.5 ± 5.6	41.33 ± 2.74
17	3.15	3.06 ± 0.377	2.97 ± 0.30	3.25 ± 0.189	31.4	36.6 ± 5.86	31.9 ± 3.3	33.86 ± 2.771
18	2.76	2.98 ± 0.316	2.78 ± 0.18	2.93 ± 0.164	26.1	31.5 ± 4.15	26.6 ± 4.2	30.93 ± 3.044
19	2.52	2.55 ± 0.269	2.46 ± 0.31	2.67 ± 0.174	42.9	48.1 ± 2.48	44.9 ± 4.0	46.54 ± 2.299
20	2.33	2.61 ± 0.144	2.25 ± 0.24	2.56 ± 0.165	44.6	46.5 ± 3.59	45.6 ± 2.5	45.45 ± 2.526
21	1.83	1.34 ± 0.189	1.70 ± 0.32	1.90 ± 0.170	25.7	-	28.6 ± 5.0	30.89 ± 5.002
22	1.68	1.53 ± 0.178	1.80 ± 0.26	2.04 ± 0.182	25.0	-	28.2 ± 6.5	30.48 ± 4.932
Y	1.96	1.82 ± 0.353	2.21 ± 0.30	2.15 ± 0.137	16.3	-	23.1 ± 5.1	27.17 ± 3.182

A: Datos Denver-Londres (sin identificación previa con bandas Q)

B: Datos a partir de 20 células con identificación previa con bandas Q y teñidas con orceina (Dr. Pearson)

C: Datos a partir de 10 células con identificación previa con bandas Q y teñidas con orceina (Dr. Caspersson, Dr. Hulten, Dr. Lundsten y Dr. Zech)

D: Datos a partir de 95 células con identificación previa con bandas Q y teñidas con orceina o Giemsa 9 (Dr. Lubs, Dr. Hostetter y Dr. Ewing) a partir de 11 sujetos normales (6-10 células por individuo). Longitud total media de los cromosomas 176 µm.

Nota: La longitud relativa se da en % de la longitud total de la dotación haploide y el índice centromérico se calcula con la fórmula longitud del brazo p / (longitud del cromosoma *100).

Los coeficientes de correlación se han calculado con nuestros datos y los de Flejter y col. (1984) de dos maneras diferentes: a) incluyendo todos los cromosomas y b) excluyendo los acrocéntricos y el cromosoma Y debido a la dificultad de detección de los dobles centroméricos en estos cromosomas debido al pequeño tamaño de su brazo p y la ausencia de cromosoma Y en las hembras.

Finalmente, aunque Flejter y col. (1984) presumiblemente utilizaron datos menos precisos (Denver-Londres, también reproducidos en ISCN, 1985) los resultados son esencialmente los mismos.

4 RESULTADOS

4.1 FRECUENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE LOS DOBLECES CROMOSÓMICOS EN CULTIVOS DE SANGRE PERIFÉRICA

Se analizaron 308 metafases consecutivas con al menos un doblez cromosómico pertenecientes a 11 individuos diferentes (sujetos 1 a 11 de la Tabla II) La resolución es de cero en 232 de las metafases, de uno en 42 de las metafases y de dos en 34 de las metafases.

Dobleces centroméricos en sangre periférica

En total se han contabilizado 2262 dobleces centroméricos (Tabla V). Los dobleces centroméricos se distribuyen en todos los cromosomas, con una frecuencia de uno a 26 dobleces por metafase (las metafases sin dobleces no han sido incluidas en el presente estudio). La media de dobleces es de cinco en las metafases con resolución 0 (rango 1-23), 14 en las metafases de resolución 1 (rango 2-26) y 16 en las de resolución 2 (rango 5-24). Se realizó el análisis estadístico de acuerdo a lo descrito en material y métodos y se halló que la frecuencia de dobleces se correlaciona de forma positiva con la longitud relativa de los cromosomas tanto en los datos de Flejter y col. (1984) (Tabla I) como en los nuestros (Tabla V), con unos valores de correlación de 0,81 y 0,82 respectivamente. La frecuencia de dobleces se correlaciona en menor grado con el índice centromérico (0,76 y 0,61 respectivamente). Si se excluyen los acrocéntricos y los cromosomas sexuales, las correlaciones son muy similares a las anteriores en el caso de la longitud cromosómica (0,80 y 0,79) pero menores en el caso de los índices centroméricos (0,55 y 0,22).

El cromosoma 19 es una notable excepción a la tendencia general, ya que presenta un número de dobleces centroméricos comparable al de los cromosomas del grupo C (cromosomas 6 a 12 mas el X) y de prácticamente el doble que el cromosoma 20, de un tamaño muy similar.

TABLA V: Número de dobleces centroméricos detectados en sangre periférica.

Cromosoma	Número de dobleces centroméricos
1	167
2	148
3	129
4	95
5	104
6	150
7	124
8	117
9	131
10	96
11	103
12	128
13	44
14	57
15	51
16	81
17	92
18	67
19	108
20	55
21	46
22	56
X	103
Y	10

Dobles no centroméricos en sangre periférica

Se han contabilizado un total de 2718 dobles no centroméricos, que se localizan en 255 bandas diferentes. El número de dobles no centroméricos es de 1 a 74 por metafase (las metafases sin dobles no han sido incluidas en el presente estudio). La frecuencia del fenómeno está relacionada con la resolución de las metafases, ya que la media es de 6 dobles (rango 1-41) en metafases de resolución 0, 20 (rango 1-74) en metafases de resolución 1 y 32 (rango 5- 71) en metafases de resolución 2.

La frecuencia de dobles no centroméricos no se correlaciona con el tamaño de la banda implicada medido a partir de los diagramas normalizados ISCN (1985) en nuestros datos y los publicados por Flejter y col. (1984) (coeficientes de correlación de -0,24 y 0,07, respectivamente).

El análisis estadístico realizado por el programa FSM (descrito en el Apéndice II) identifica que 69 de las 255 bandas se doblan con una frecuencia superior a la esperada por el azar (Tabla VI). Los datos incluidos en la Tabla VI incluyen las bandas con un número de dobles igual o superior a un valor crítico $C-\alpha=4$ suministrado por FSM y que se define como el mínimo número de dobles necesarios para catalogar una banda como punto de doblez no al azar (Böhm y col. 1995). Los valores que superan el valor crítico se marcan con un asterisco. Las bandas identificadas únicamente al analizar todos los casos de forma conjunta han sido excluidas debido a las observaciones de McAllister y Greebaum (1997).

La frecuencia de los dobles no centroméricos identificados como no debidos al azar no se correlaciona con el tamaño de la banda (medidas directas a partir de los diagramas ISCN, corregidas con el tamaño relativo de cada cromosoma (ISCN, 1985) ya que el coeficiente de correlación es de 0,08. Por tanto, nuestros datos parecen seguir el modelo de la equiprobabilidad y las objeciones de Hou y col. (1995) al uso de la metodología FSM no son aplicables a nuestro estudio.

TABLA VI: 69 bandas que se doblan con frecuencia superior al azar en metafases de cultivos de sangre periférica.

SUJETO	HEMBRAS					VARONES					Total	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		11
BANDA												
15q11q13	7*	6*	7*	9*	3	5*	7*	8*	5*	7*	3	67
2q22q24	7*	6*	5*	4*	3	4*	7*	6*	1	9*	7*	59
11q14q22	4*	2	6*	4*	3	4*	1	4*	5*	5*	5*	43
15q21	2	7*	3	5*	4*	7*	2	3	3	3	3	42
1q31	4*	3	7*	3	4*	2	6*	4*	2	6*	1	42
1p33p35	6*	5*	3	2	4*	3	1	3	4*	8*	1	40
7q21	4*	4*	2	2	3	5*	7*	2	5*	3	1	38
7q31	2	3	1	1	5*	3	5*	2	3	4*	7*	36
10q21	3	4*	7*	2	2	4*	4*	3	0	4*	3	36
2q32	5*	3	1	2	8*	2	4*	2	1	2	5*	35
2p14p16	3	0	4*	6*	4*	1	3	3	3	3	4*	34
1q22q24	2	1	2	3	3	4*	4*	2	4*	4*	5*	34
13q21	2	4*	1	3	4*	2	1	5*	1	6*	4*	33
10q23	1	5*	1	1	5*	4*	0	0	3	6*	6*	32
17q11.2	1	2	4*	4*	3	7*	2	2	4*	2	1	32
12q21	3	2	4*	0	3	5*	3	5*	5*	1	1	32
1p32	0	3	2	4*	3	2	4*	4*	2	5*	2	31
3p22p24	1	3	1	1	2	4*	5*	2	5*	5*	2	31
18q12	3	4*	4*	1	1	1	3	1	4*	4*	2	28
13q12	2	10*	2	4*	1	2	1	2	1	0	2	27
4q28	3	3	5*	2	3	3	3	2	1	2	0	27
6q16	2	1	2	0	4*	2	4*	3	1	5*	2	26
3q13	3	2	3	1	1	4*	2	1	4*	5*	0	26
4q22q24	6*	2	3	3	2	1	3	2	0	2	2	26
21q21	1	3	3	0	1	3	1	2	1	6*	4*	25
6q22	2	1	0	6*	2	0	6*	1	2	1	4*	25
14q12	4*	3	0	0	2	2	3	2	5*	3	1	25
7q11.2	0	3	1	3	0	0	2	8*	0	6*	1	24
1q21	2	4*	0	1	4*	2	2	2	2	5*	0	24
8q21	1	3	2	2	1	3	3	2	4*	2	0	23

11q13	4*	2	2	1	2	2	2	3	1	3	1	23
5q21	2	3	1	0	2	2	3	4*	2	4*	0	23
14q31	0	2	0	2	4*	1	1	2	3	4*	3	22
14q23	1	1	1	2	1	3	4*	1	3	2	3	22
Xq22	1	0	2	1	6*	2	1	1	2	4*	2	22
1p31	6*	1	1	2	2	1	2	1	0	4*	2	22
3p14	2	1	1	3	2	6*	1	2	2	2	0	22
17q22	3	2	0	1	2	1	1	2	5*	2	2	21
9q31	5*	1	2	1	2	4*	1	0	2	0	3	21
13q13	0	0	0	3	4*	4*	1	0	2	6*	0	20
3q24	2	2	5*	0	1	0	5*	0	0	3	2	20
1q41	0	0	2	1	0	3	2	4*	3	3	0	18
5q14	0	2	1	1	0	3	3	0	1	4*	2	17
22q12	1	2	2	1	4*	1	2	1	0	1	2	17
9q21	1	1	3	2	1	4*	1	1	0	2	1	17
6q24	1	1	0	4*	1	3	1	2	2	0	2	17
Xq21	5*	2	3	0	1	1	0	1	1	1	2	17
4q21	0	0	0	2	1	3	7*	1	1	1	0	16
3q26	0	4*	1	0	1	2	2	3	1	2	0	16
2q34	1	1	2	0	4*	0	0	1	1	3	3	16
20q12	1	1	2	2	1	2	0	2	0	4*	1	16
9q22	0	2	0	3	4*	1	1	1	1	0	2	15
4q13	0	2	2	1	1	4*	0	0	2	1	2	15
12p12	0	5*	4*	0	2	1	1	0	1	1	0	15
19q13.1	2	3	0	1	5*	2	2	0	0	0	0	15
12q14	1	1	0	2	1	1	1	1	3	4*	0	15
Xp21	3	2	1	1	1	1	0	0	4*	1	0	14
3q21	2	1	1	1	4*	1	0	1	0	2	0	13
1p13	1	3	2	0	0	1	1	0	0	4*	1	13
18q21	2	0	0	0	0	2	3	1	1	0	4*	13
8q22	4*	1	1	1	1	1	1	0	2	0	1	13
2q31	4*	1	1	0	2	0	0	1	3	0	0	12
7p14	0	4*	1	0	2	3	0	1	1	0	0	12
5q34	1	1	0	0	1	1	1	0	1	4*	2	12
12p11.2	1	1	1	0	0	1	4*	1	1	2	0	12
16q12q13	2	0	0	0	2	0	5*	0	1	0	1	11
1q12	1	1	0	0	1	1	1	1	0	4*	0	10
10q24	1	0	5*	1	0	0	0	0	0	0	0	7
2p23	0	4*	1	0	0	0	0	0	0	1	0	6

Los asteriscos indican los valores superiores al valor crítico $C-\alpha=4$

En la tabla anterior se observa que el doblez 15q11q13 es el doblez autosómico mas frecuente. Las bandas 2q22q24, 11q14q22, 1q31, 1p33p35, 7q21, 10q21, 1q22q24, 13q21 y 10q23 presentan frecuencias de doblez estadísticamente significativas en al menos 5 sujetos. Los dobleces en el cromosoma X, muy frecuentes en los datos de Flejter y col. (1984), se observan con una frecuencia mucho menor, estadísticamente significativa en Xq21 únicamente en una hembra y en Xq22 en un varón y una hembra.

4.2 FRECUENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE LOS DOBLECES CROMOSÓMICOS EN CULTIVOS DE LÍQUIDO AMNIÓTICO Y VELLOSIDAD CORIAL

Se analizaron 50 metafases consecutivas con al menos un doblez cromosómico pertenecientes a cuatro cultivos de líquido amniótico (sujetos 12 a 15 de la Tabla II) y 50 pertenecientes a cuatro cultivos de vellosidad corial (sujetos 16 a 19 de la Tabla II).

En los líquidos amnióticos la resolución es de 0 en 38 metafases, de 1 en seis metafases y de 2 en seis metafases. En las vellosidades coriales la resolución es de 0 en 43 de las metafases, de 1 en seis de las metafases y de 2 en una de las metafases.

Dobleces centroméricos en líquido amniótico y vellosidad corial

Se hallaron un total de 867 dobleces centroméricos en metafases de cultivos de líquido amniótico y 731 en metafases de cultivos de vellosidad corial (Tabla VII). Los dobleces centroméricos se encuentran en todos los cromosomas.

En los cultivos de líquido amniótico los dobleces presentan una frecuencia de tres a 34 dobleces por metafase (las metafases sin dobleces se descartaron). La media de dobleces es de 16 en las metafases con resolución 0 (rango 3-28), 18 en las de resolución 1 (rango 8-25) y 26 en las de resolución 2 (rango 19-34). Las metafases de resolución 0, 1 y 2 contabilizan 604, 109 y 154 dobleces respectivamente.

En los cultivos de vellosidad corial los dobleces centroméricos presentan una frecuencia de uno a 29 dobleces por metafase (las metafases sin dobleces se descartaron). La media de dobleces es de 13 en las metafases con resolución 0 (rango 1-24) y 25 en las de resolución 1 (rango 22-29). La única metafase de resolución 2 tiene 21 dobleces. Las metafases de resolución 0 y 1 contabilizan 562 y 148 dobleces respectivamente.

TABLA VII: Número de dobleces centroméricos detectados en líquido amniótico (LA) y vellosidad corial (VC).

Cromosoma	Número de dobleces centroméricos	
	LA	VC
1	54	54
2	50	39
3	52	46
4	42	37
5	35	33
6	49	40
7	42	46
8	44	39
9	50	42
10	46	29
11	41	49
12	34	25
13	27	12
14	26	7
15	26	7
16	44	31
17	36	27
18	25	30
19	39	42
20	27	25
21	13	13
22	27	20
X	34	36
Y	4	2

Los resultados son comparables a los obtenidos en el estudio en sangre periférica (Tabla V), incluyendo la notable excepción del cromosoma 19 (que presenta un número de dobleces centroméricos muy superior al del cromosoma 20, de un tamaño muy similar).

Dobleces no centroméricos en líquido amniótico y vellosidad corial

El número de dobleces no centroméricos contabilizados es de 1118 en líquido amniótico y 874 en vellosidad corial. En la tabla VIII se resumen los datos que relacionan el número de dobleces con la resolución de las metafases.

TABLA VIII: Relación entre el número de dobleces y la resolución de las metafases de líquido amniótico y vellosidad corial.

	Resolución	Metafases	Número de dobleces	Media	Rango
Líquido	2	6	280	47	28-61
Amniótico	1	6	240	40	16-59
	0	38	598	16	1-58
Vellosidad corial	2	1	52	-	-
	1	6	269	45	27-63
	0	43	553	14	1-49

El análisis estadístico realizado por el programa FSM (descrito en el Apéndice II) identifica que 76 bandas se doblan con una frecuencia superior a la esperada por el azar (Tabla IX). Los datos incluyen las bandas con un número de dobleces igual o superior a un valor crítico $C-\alpha$ suministrado en cada caso por FSM y que se define como el mínimo número de dobleces necesarios para catalogar una banda como punto de doblez no al azar (Böhm y col. 1995). Se han tomado en cuenta los puntos identificados en cada caso con el estadístico (G^2 o χ^2) que de unos resultados mas restrictivos (G^2 en los varones e indiferentemente G^2 y χ^2 en las hembras). Los valores que superan el valor crítico se marcan con un asterisco. Las bandas identificadas únicamente al analizar todos los casos de forma conjunta han sido excluidas debido a las observaciones de McAllister y Greebaum (1997). La frecuencia de los dobleces no centroméricos identificados como no debidos al azar no se correlaciona con el tamaño de la banda

(medidas directas a partir de los diagramas ISCN, corregidas con el tamaño relativo de cada cromosoma (ISCN, 1985)) ya que el coeficiente de correlación es de 0,07. Por tanto, nuestros datos parecen seguir el modelo de la equiprobabilidad y las objeciones de Hou y col. (1995) al uso de la metodología FSM no son aplicables a nuestro estudio. Tal como se detalló en el apartado de material y métodos se han utilizado las mismas denominaciones comunes de bandas de difícil discriminación utilizadas en el estudio en sangre periférica (Tabla III). Esto implica que se pierden los dobleces en 3q22-24, 11p11, 16p11, 18q11, 20q11 y 22q11 (todos con frecuencia superior a 3).

TABLA IX: 76 bandas que se doblan con frecuencia superior al azar en metafases de cultivos de líquido amniótico (LA) y vellosidad corial (VC).

Tejido	HEMBRAS				VARONES				Total
	LA	LA	VC	VC	LA	LA	VC	VC	
C-α	4	4	4	3	4	3	3	3	
SUJETO	12	13	16	17	14	15	18	19	
BANDA									
11q14q22	3	4*	3	5*	4*	4*	7*	9*	39
1q31	1	4*	4*	4*	2	6*	6*	2	29
1p31	3	3	1	7*	2	2	5*	5*	28
1p32	3	7*	2	1	4*	6*	3*	2	28
2q22q24	4*	7*	4*	5*	3	2	0	3*	28
3p22p24	5*	4*	1	3*	3	7*	1	4*	28
7q31	2	5*	4*	2	2	5*	4*	4*	28
1p33p35	4*	4*	3	2	4*	3*	3*	4*	27
13q21	3	2	4*	5*	2	5*	2	3*	26
15q21	3	2	1	5*	2	3*	6*	3*	25
2q32	2	3	6*	3*	3	2	4*	1	24
8q23	1	4*	3	9*	1	2	2	2	24
Xq21	6*	7*	4*	1	1	1	1	2	23
3q26	1	4*	3	3*	1	5*	2	3*	22
6q22	2	1	3	4*	2	2	4*	3*	21
21q21	2	1	1	2	8*	2	2	1	19

4q31	6*	1	1	0	9*	2	0	0	19
5q23	1	1	2	2	4*	2	2	5*	19
10q23	1	4*	1	3*	1	2	4*	3*	19
Xq22	4*	5*	2	4*	1	1	1	1	19
1q22q24	4*	6*	1	1	1	2	2	1	18
2q34	1	1	3	4*	0	2	2	5*	18
3p21	9*	0	1	2	1	1	2	2	18
7q21	2	1	1	0	3	2	4*	5*	18
8q21	2	1	3	2	4*	0	1	5*	18
15q11q13	3	1	2	2	5*	2	1	2	18
1p21	0	1	4*	3*	2	2	3*	2	17
6q16	4*	1	2	5*	1	0	2	2	17
12q21	2	4*	5*	6*	0	0	0	0	17
1q21	1	0	4*	1	4*	1	3*	2	16
4q22q24	2	1	3	2	2	4*	2	0	16
4q28	2	3	2	4*	0	1	2	2	16
14q23	3	4*	3	2	0	1	1	2	16
2p14p16	1	1	2	3*	0	4*	1	3*	15
6p21	2	0	0	4*	4*	2	1	2	15
8q22	4*	0	1	0	7*	2	1	0	15
1q43	0	0	0	0	1	5*	4*	4*	14
3q13	1	1	1	3*	2	0	2	4*	14
5q31	5*	1	1	0	4*	0	2	1	14
10q21	1	1	4*	0	3	2	1	2	14
15q22	5*	0	0	1	4*	2	1	1	14
2q33	4*	1	2	1	1	2	1	1	13
7q22	4*	0	1	0	5*	0	2	1	13
1q32	2	2	1	0	4*	2	0	1	12
2q31	1	0	3	0	5*	0	1	2	12
3p14	0	6*	2	0	1	0	2	1	12
5q14	2	1	3	0	0	3*	2	1	12
5q21	1	2	1	3*	0	2	3*	0	12
14q21	0	2	2	0	2	1	2	3*	12
1q41	1	2	2	3*	1	1	0	1	11
9q22	3	1	1	0	5*	1	0	0	11
10q22	4*	0	0	1	3	2	0	1	11
12q21	0	0	0	0	3	3*	2	3*	11
13q22	0	0	0	0	6*	3*	0	2	11
13q31	1	2	2	1	0	4*	1	0	11
14q31	0	0	0	0	1	4*	4*	2	11

18q12	1	2	0	2	1	1	1	3*	11
Xp21	1	3	0	3*	0	3*	1	0	11
4q32	1	1	0	3*	2	2	0	1	10
18q21	4*	1	1	1	1	2	0	0	10
4q13	0	0	0	0	2	1	4*	2	9
7p15	0	0	3	1	2	3*	0	0	9
8q24.1	4*	0	1	0	1	1	2	0	9
15q14	1	1	0	3*	2	0	1	1	9
9q31	0	0	0	0	1	3*	3*	1	8
2p24	0	0	1	3*	0	2	0	1	7
6p12	0	0	0	0	1	0	5*	1	7
17q21	0	0	0	0	5*	0	2	0	7
3q21	0	0	0	0	1	0	2	3*	6
7q32	0	0	0	0	4*	2	0	0	6
12q22	4*	1	1	0	0	0	0	0	6
12q23	0	0	0	0	0	2	4*	0	6
Xq25	0	0	1	5*	0	0	0	0	6
5q34	0	0	0	0	0	3*	0	2	5
16q11.2	0	0	0	0	0	0	4*	0	4
Y	0	0	0	0	4*	0	0	0	4

Los asteriscos indican los valores superiores al valor crítico $C-\alpha=4$

En la tabla IX se observa que los dobleces 11q14q22, 1q31, 1p32, 2q22q24, 3p22p24, 7q31, 1p33p35, 13q21, 15q21, 3q26 y 10q23 presentan frecuencias de doblez estadísticamente significativas en al menos 4 sujetos. Con la excepción de 1p32, 3p22p24 y 7q31 también son estadísticamente significativos en la mitad de los sujetos incluidos en el estudio en sangre periférica (Tabla VI). Las dobleces 7q21, 10q21 y 1q22q24, identificados como muy frecuentes en sangre periférica, también son estadísticamente significativos en algunos sujetos del presente estudio, si bien con frecuencias inferiores. En cambio, si que se observan diferencias importantes en el doblez autosómico más frecuente en sangre periférica, 15q11q13, con una frecuencia muy discreta en líquido amniótico y vellosidad corial, estadísticamente significativa sólo en un sujeto. También se observan diferencias importantes en los dobleces Xq21 y Xq22, más frecuentes en líquido amniótico y vellosidad corial que en sangre periférica. No hay diferencias evidentes en la frecuencia de los dobleces entre líquido amniótico y vellosidad corial, si bien el número de sujetos analizados es demasiado pequeño para permitir un análisis en profundidad. Si, en cambio, se observan diferencias entre sexos

en lo que al cromosoma X se refiere (con una mayor frecuencia de dobleces del cromosoma X en los sujetos femeninos).

4.3 EL DOBLEZ 15q11q13

Análisis de la frecuencia de los dobleces en 15q11q13 en cultivos de sangre periférica.

A fin de tratar de obtener información que pudiera sugerir el mecanismo de formación de los dobleces cromosómicos se realizó un estudio pormenorizado del doblez autosómico mas frecuente en sangre periférica, localizado en 15q11q13. Se analizaron 498 metafases pertenecientes a tres individuos con cromosomas 15 que tienen diversas características estructurales (Tabla X). El sujeto 20 presenta un polimorfismo en la banda 15q11 bien conocido (Hoo y col., 1990) que provoca su práctica desaparición.

TABLA X: Resolución de 498 metafases incluidas en los estudios del doblez 15q11q13 en sangre periférica.

Sujeto	Resolución 0	Resolución 1	Resolución 2	Total
20	121	16	17	154
21	96	12	11	119
22	201	11	13	225

En total se hallaron 89 dobleces en 15q11q13 (Tabla XI). En 13 metafases (siete pertenecientes al sujeto 21, con una delección 15q11q13) ambos cromosomas 15 estan doblados (Figura 4.1). En el sujeto 22 la presencia de heterocromátina de cromosoma Y en el brazo p de un cromosoma 15 permite diferenciar entre ambos homólogos, observándose.18 dobleces en cada uno (total 36 dobleces).

TABLA XI: Dobleces en 15q11q13.

Sujeto	Resolución 0	Resolución 1	Resolución 2	Total
20	8 (0)	4 (1)	12 (2)	24 (3)
21	11 (2)	7 (3)	11 (2)	29 (7)
22	19 (0)	7 (2)	10 (1)	36 (3)

Los números entre paréntesis indican las trece metafases en que ambos cromosomas 15 mostraron el doblez en q11q13.

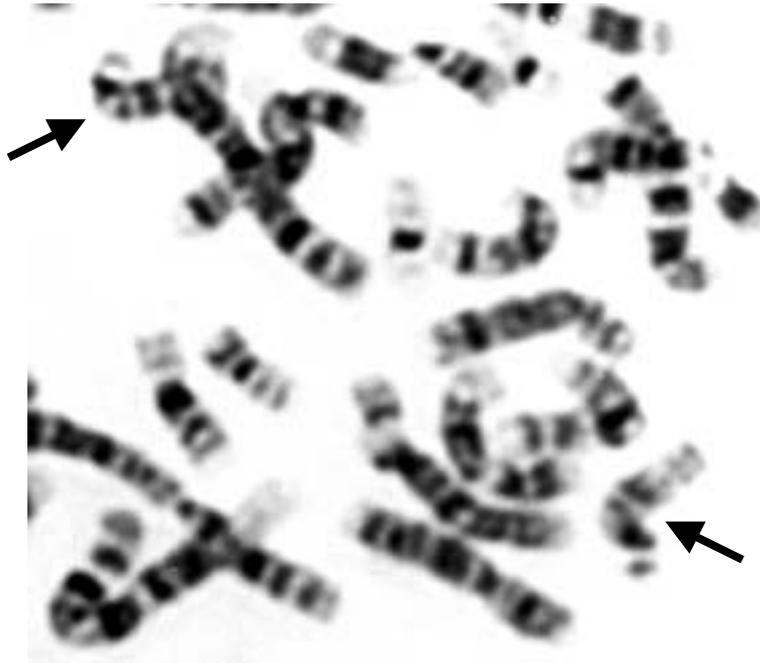


Figura 4.1: Doblez 15q11q13 en homocigosis en un paciente con síndrome de Prader Willi por delección.

Localización precisa del doblez 15q11q13 mediante la técnica de FISH y en metafases de alta resolución con bandas G.

Se demostró mediante hibridación con las sondas SNRPN y D15S10 (Vysis) que la zona crítica implicada en los síndromes de Prader Willi y Angelman se sitúa en el vértice del doblez 15q11q13 (Figura 4.2a, b).

También se determinó la localización precisa del doblez 15q11q13 en metafases con bandas G de alta resolución halladas durante el análisis citogenético de rutina realizado en pacientes del Hospital Materno Infantil "Vall d'Hebron". Se hallaron un total de 11 cromosomas con dobleces en 15q11q13 y un patrón de bandas suficientemente claro como para poder discriminar sin ambigüedades entre q11, q12 y q13. En diez cromosomas el doblez se situó en 15q12 (Figura 4.2c) y en uno en 15q11. Podemos concluir, por tanto, que el doblez se sitúa en 15q12 .

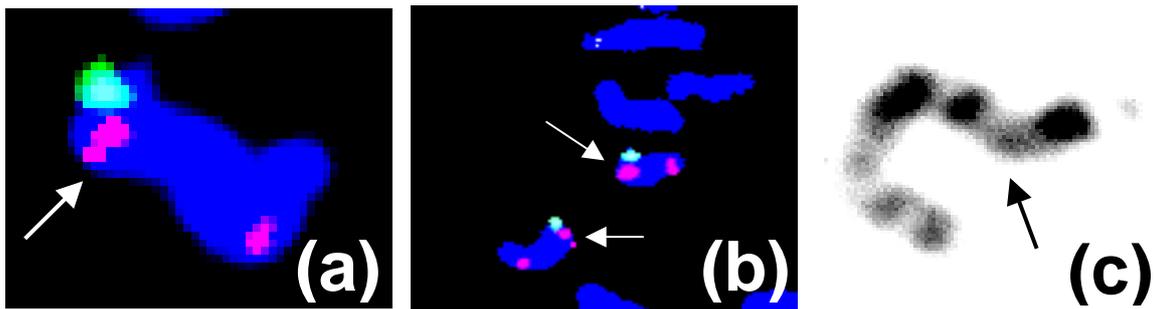


Figura 4.2: Asignación precisa del doblez 15q11q13 a la banda q12.

(a) y (b) FISH con sondas para la zona crítica de PW y AG en cromosomas 15 con el doblez y (c) Doblez en 15q12.

4.4 EL DOBLEZ Xq13q22

Análisis de la frecuencia de los dobleces en Xq13q22 en cultivos de sangre periférica

Debido a los resultados de Flejter y col. (1984) y la atención casi exclusiva que este doblez ha despertado en el resto de los autores que han investigado posteriormente los dobleces en los cromosomas metafásicos (Van Dyke y col. 1985; Van Dyke y col. , 1986; Flejter y col. , 1986; Van Dyke y col. 1987; Munn y col. 1991; Monaghan y col. 1998) hemos realizado un estudio centrado exclusivamente en el doblez Xq13-21.

Se analizaron 100 metafases consecutivas en cada individuo (dos hombres y dos mujeres), lo cual representa un total de 400 cromosomas X femeninos y 200 masculinos. Debido a que los dobleces se situaron con cierta frecuencia en Xq22, se decidió incluirlos en el estudio a fin de evitar problemas de interpretación en cromosomas de baja resolución. Los dobleces se clasificaron como “dobleces según el criterio restringido” si eran de 45° o “dobleces según el criterio amplio” si no llegaban a esta cifra. Se hallaron dobleces restringidos en Xq13q22 en un total de 6 cromosomas X de varón y 17 cromosomas X de mujer. Se hallaron dobleces amplios en 11 cromosomas X de varón y 11 de hembra. En dos de las metafases pertenecientes a sujetos femeninos ambos cromosomas X se doblan (uno de los cromosomas cumpliendo el criterio restringido y el otro sólo el amplio).

Análisis de la frecuencia de los dobleces Xq13q22 en cultivos de sangre periférica y líquido amniótico.

Debido a la discrepancia entre la frecuencia observada del doblez del cromosoma X por Flejter y col. (1984) (principalmente células de líquido amniótico) y las observadas por otros autores en sangre periférica hemos estudiado la frecuencia de los dobleces del cromosoma X y 15 en dos líquidos amnióticos de fetos masculinos, dos líquidos de fetos femeninos, dos sangres de sujetos masculinos y dos sangres de sujetos femeninos (Tabla XII).

TABLA XII: Dobleces en Xq13q21 y 15q11q13 en sangre periférica (SP) y líquido amniótico (LA).

Tejido		SP	SP	SP	SP	LA	LA	LA	LA
Individuo		3	4	8	9	12	13	14	15
Sexo		F	F	M	M	F	F	M	M
Sin doblez	Res 0	67	67	73	70	81	38	75	78
	Res 1	1	2	4	1	12	1	1	0
	Res 2	2	1	0	0	7	0	0	0
Xq13-21	Res 0	20	16	12	8	55	56	16	5
	Res 1	4	8	3	1	17	16	1	3
	Res 2	5	6	1	9	6	8	1	2
15q11q13	Res 0	4	8	7	13	8	4	10	6
	Res 1	4	4	3	1	1	2	4	1
	Res 2	1	2	4	11	1	3	0	0

A fin de facilitar el análisis la Tabla XIII muestra los datos agrupados por sexo y tejido, independientemente de su resolución y normalizados en la forma del % del total. Se confirman las diferencia observadas en las Tablas VI y IX: el cromosoma X se dobla en amniocitos de individuos de sexo femenino con una frecuencia de prácticamente el doble a la observada en los linfocitos de individuos de sexo femenino, siendo en los varones la diferencia muy pequeña y el doblez 15q11q13 es mas frecuente en las células

de los cultivos de sangre periférica. Tanto en las tablas VI y IX como en la Tabla XIII el doblez 15q13q15 es algo más frecuente en varones que en las hembras.

TABLA XIII: % de dobleces en Xq13q21 y 15q11q13 en sangre periférica (SP) y líquido amniótico (LA).

Tejido	SP	SP	LA	LA
Sexo	F	M	F	M
Sin doblez	63,06	66,97	43,99	75,86
Xq13-21	26,58	15,38	50,00	13,79
15q11q13	10,36	17,65	6,01	10,34

4.5 FRECUENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE LOS DOBLECES EN EL CROMOSOMA 12 (METAFASES DE RESOLUCIÓN ELEVADA EN CULTIVOS DE SANGRE PERIFÉRICA)

Debido a que el estudio de Nogami y col. (2000) analiza mediante técnicas de FISH la disposición del cromosoma 12 interfásico, se ha realizado un estudio de dobleces específico para este cromosoma. Se analizaron un total de 42 metafases de buena calidad pertenecientes a cultivos de sangre periférica de un hombre y una mujer. Los 282 dobleces detectados prácticamente se restringieron a las bandas 12p12, 12cen, 12q14, 12q21, 12q23 y 12q24.2, todas de tinción oscura con la técnica de bandas G (Figura 4.3).

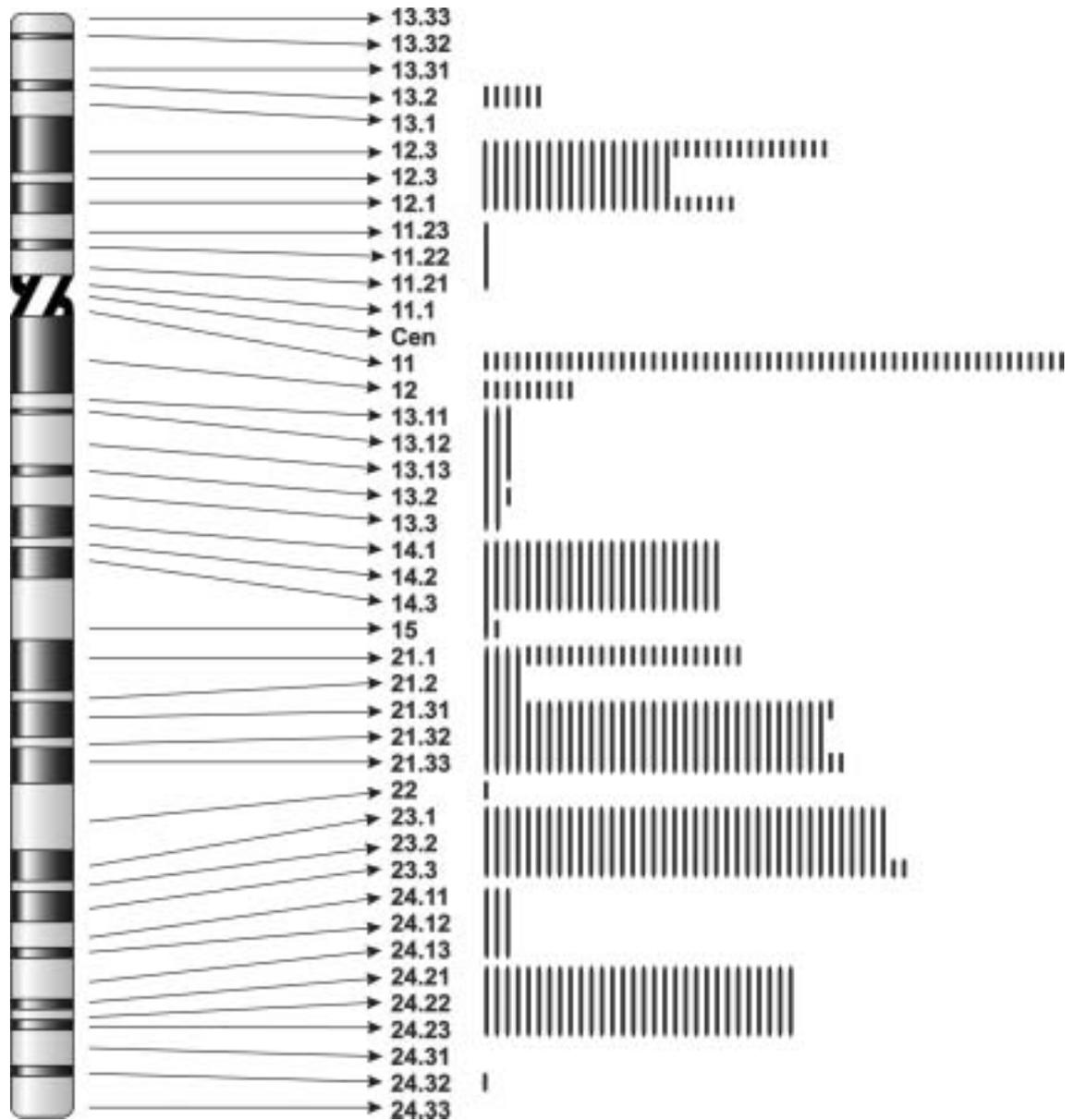


Figura 4.3: Dobleces detectados en cromosomas 12 con bandas G de resolución elevada.

4.6 FRECUENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE LOS DOBLECES EN EL CROMOSOMA 5 (METAFASES DE RESOLUCIÓN ELEVADA EN CULTIVOS DE SANGRE PERIFÉRICA)

Debido a que el estudio de Lemke y col. (2002) analiza mediante técnicas de FISH la disposición del cromosoma 5 interfásico, se ha realizado un estudio de dobleces específico para este cromosoma. Se analizaron un total de 46 metafases de buena

calidad pertenecientes a cultivos de sangre periférica de un hombre y una mujer. Se contabilizaron 278 dobleces, de los cuales se detectaron mas de 10 en las bandas 5p14, 5q12, 5q14, 5q21, 5q23, 5q31, 5q32 y 5q34 (Figura 4.4). Todas estas bandas, con excepción de 5q31, son de tinción oscura con la técnica de bandas G.

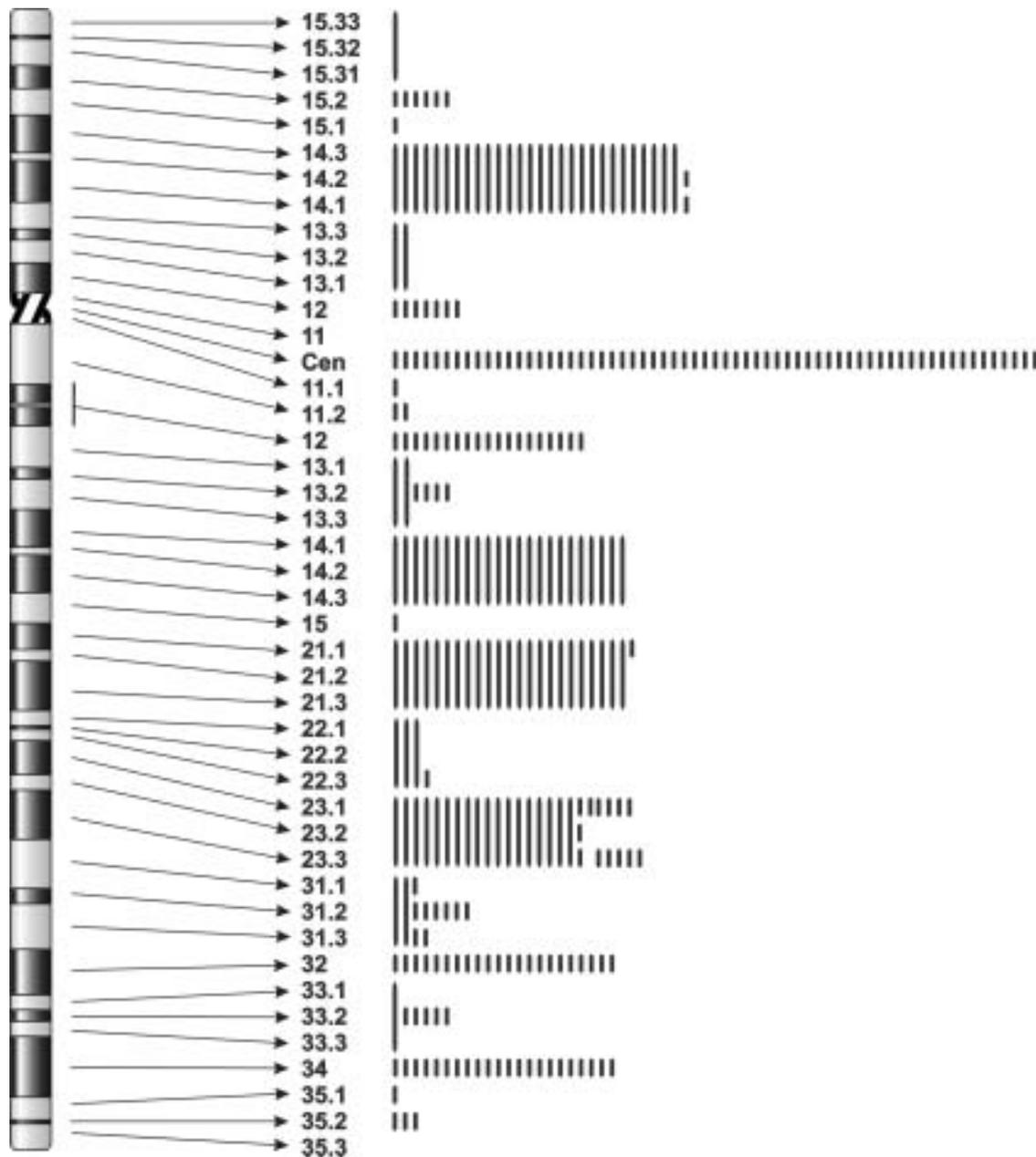


Figura 4.4: Dobleces detectados en cromosomas 5 con bandas G de resolución elevada.

Al analizar en detalle la distribución de los dobleces en 5q31 se observa que de las 9 ocasiones en que se puede asignar claramente la subbanda implicada, el doblez se localiza seis veces en 5q31.2 (una subbanda de tinción G oscura), una vez en 5q31.1 y dos veces en 5q31.3 (subbandas de tinción clara).

Al analizar las bandas que se doblan un número inferior a 10 veces, también se observa una clara tendencia a que los dobleces se concentren en las bandas G: 4 de los 6 dobleces que se han podido asignar a subbanda en q13 lo son en q13.2, 5/12 dobleces se asignan a 5q23.1, 5/12 a 5q23.3 y uno doble en 5q23.1/5q23.3. Por último, 3 de los 4 dobleces bien localizados en 5q35 se concentran en 5q35.2.

5 DISCUSIÓN

5.1 LOS CROMOSOMAS SE DOBLAN

En 1984 Flejter y colaboradores hallaron que los dobleces que se pueden observar en los cromosomas metafásicos humanos (Figura 5.1) presentan una distribución que no se debe al azar. Nuestro estudio confirma este hallazgo (Tablas VI y IX).

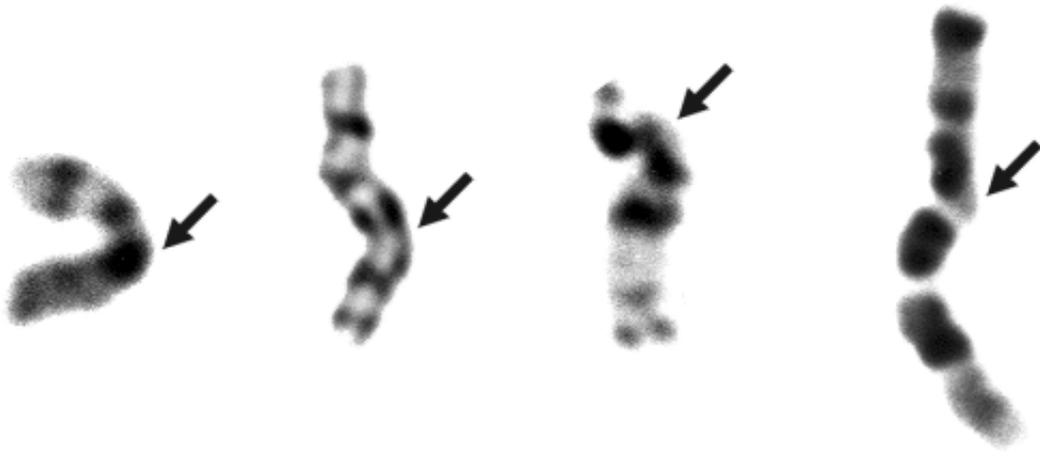


Figura 5.1: Algunos cromosomas con dobleces no aleatorios.

(a) Cromosoma X con un doblez en q21. (b) cromosoma X con un doblez en q22 (c) cromosoma 15 con un doblez en q11-13 (d) cromosoma 7 con un doblez en q11.21.

Nuestro estudio también revela que el número de dobleces presentes en una metafase depende su resolución, siendo mayor en las metafases tempranas y menor en las tardías. Este hecho ya fue apuntado en un estudio centrado en el cromosoma X por Van Dyke y col. (1987) (Tabla XIV).

5.2 LOS DOBLECES CENTROMÉRICOS

Excluyendo los cromosomas acrocéntricos, debido a que el pequeño tamaño del brazo p hace poco fiable la detección de dobleces, y los cromosomas sexuales, que son diferentes en los dos sexos, nuestro estudio y el de Flejter y col. (1984) presentan resultados muy similares. El número de dobleces que se observan en un centrómero se correlaciona claramente con el tamaño del cromosoma en ambos estudios. En cambio,

nuestros datos reflejan con menos claridad que los de Flejter (1984) la hipótesis de que dependen de la forma del cromosoma. Finalmente, nuestros datos muestran como el número de dobleces centroméricos es mayor en las metafases mas tempranas.

El significado preciso de los dobleces centroméricos es incierto, aunque pueden ser causados, o estar muy influidos, por las fuerzas físicas que actúan sobre los cromosomas durante el proceso de la mitosis celular, el sacrificio del cultivo y la preparación de las extensiones cromosómicas (Flejter y col. , 1984). Tampoco se puede descartar que sean un remanente de una disposición de los cromosomas en la anafase con agrupación de centrómeros en un polo nuclear y telómeros en el polo opuesto que se mantiene en la interfase. Sin embargo este modelo, conocido como configuración de Rabl, se ha observado se forma infrecuente en células de mamífero (revisado por Parada y Misteli, 2002).

En nuestro estudio el cromosoma 19 presenta un número de dobleces centroméricos muy superior al del cromosoma 20, de un tamaño muy similar pero contenido genético muy inferior. Esta diferencia es sorprendente y no se refleja en los datos de Flejter y col. (1984) quizás debido a diferencias en el tipo de dobleces incluidos en el estudio (el presente trabajo utiliza un criterio de selección de dobleces más amplio).

5.3 LOS DOBLECES NO CENTROMÉRICOS

Hemos realizado un estudio en sangre periférica en metafases consecutivas tratándo de evitar cualquier tipo de selección. Nuestro estudio y el de Flejter y col. (1984) coinciden globalmente en el caso de los dobleces no centroméricos, pudiéndose atribuir la mayor parte de las diferencias a la mayor sensibilidad que probablemente presenta nuestro criterio amplio de definición de doblez. Nuestro estudio muestra claramente que los dobleces no centroméricos son mas frecuentes en las metafases tempranas, idea que ya apuntada por Van Dyke y col. (1987).

Hay dos razones importantes para pensar que los dobleces no centroméricos no son un reflejo de las fuerzas físicas que actúan sobre los cromosomas. En primer lugar, la frecuencia de dobleces no se correlaciona con la anchura de la banda implicada. En segundo lugar, aunque las posibles fuerzas físicas que actúan sobre ambos cromosomas X en las células femeninas son probablemente bastante similares, hay diferencias muy notables entre el número de dobleces que se observan en los cromosomas X activos o inactivos (Flejter y col. , 1984).

Fuster y colaboradores (1988) sugirieron que los entrecruzamientos entre cromátides hermanas, un tipo particular de doblez cromosómico que se observa en cultivos expuestos a la afidicolina, podrían ser considerados como prelesiones y tener relación con la fragilidad cromosómica. Con el fin de explorar la relación entre dobleces y roturas cromosómicas, hemos examinado un cultivo de sangre perteneciente un paciente con un síndrome de fragilidad cromosómica, la Ataxia Telangiectasia, en el que se hallaron con alta frecuencia las clásicas anomalías cromosómicas implicando las bandas 7p14, 7q34-35, 14q12 y 14q32 (Aurias y col., 1986). Ninguna de estas bandas muestra una frecuencia de dobleces superior a la del azar en este paciente o en los demás sujetos estudiados. Tampoco hemos observado diferencias en el tipo y/o frecuencia de dobleces cromosómicos en los otros individuos patológicos, incluyendo el caso 1, un paciente con un diagnóstico de Anemia de Fanconi, otro síndrome que cursa con fragilidad cromosómica aumentada.

Finalmente, no hemos hallado diferencias atribuibles a algún tipo de heredabilidad o a la presencia de una alteración citogenética denominada separación prematura de cromátides en la frecuencia y/o tipo de dobleces observados en cultivos de sangre de los sujetos emparentados 2, 3, 6 y 7.

Los dobleces del cromosoma X y las diferencias en la frecuencia de algunos dobleces en diversos tejidos.

Flejter y col. (1986) y Van Dyke y col. (1987) propusieron que el doblez localizado en Xq13- q21 (Figura 5.1) son un remanente en la metafase del corpúsculo de Barr presente en la interfase precedente. Sin embargo, el intento de comprobar esta hipótesis mediante técnicas de hibridación "*in situ*" ha dado lugar a resultados conflictivos (Walker y col. , 1991). Por otro lado, Flejter y col (1984) agruparon los datos obtenidos a partir del estudio de dos cultivos de líquido amniótico de dotación cromosómica femenina y un cultivo de sangre periférica perteneciente a un varón, y hallaron este doblez en un 63% de las células femeninas. Nuestros datos en sangre muestran una frecuencia mucho mas baja (Tablas VI y IX).

Hemos realizado un estudio específicamente diseñado para clarificar estas diferencias obteniendo un 8.5% de células femeninas con dobleces clásicos en Xq13-Xq21, cifra similar al 7.8% obtenido en el extenso estudio de Munn y col. (1991) y muy inferior al 63% obtenido por Flejter y col (1984) (Tabla XIV). Estas discrepancias sugieren que el

cromosoma X se dobla con mas frecuencia en los cultivos de líquido amniótico que en los de sangre periférica (Van Dyke y col. , 1986). Nuestro estudio del doblez Xq13-Xq21 en metafases consecutivas de sangre y líquido amniótico (Tabla XIII) confirman esta hipótesis.

TABLA XIV: % células mostrando un doblez Xq13-Xq21 en diversos estudios.

Autor	Varón	Hembra	Tejido
Flejter y col. (1984)	2% (sangre)	63% (amniocitos)	Líquido amniótico + Sangre periférica
Flejter y col. (1986)	-	70%	Líquido amniótico
Van Dyke y col. (1986)		64%	Líquido amniótico
Presente estudio	3%	8.5%	Sangre periférica
Munn y col. (1991)	1.7%	7.8%	Sangre periférica
Van Dyke y col. (1987)	-	56% (metafases tempranas) 94% (prometafases)	Sangre periférica sincronizada
Avalos y col (1989)	-	45.4%	Médula ósea no estimulada

En cambio, al analizar las células masculinas los resultados son muy similares en todos los estudios: 2% (Flejter y col. , 1984), 3% (dobleses clásicos en el presente estudio) y 1.7 % (Munn y col. , 1991). Si en nuestros datos en sangre además de los dobleces clásicos contabilizamos los que cumplen nuestro criterio amplio las cifras son de un 8.5% de las células masculinas y un 14% de las femeninas mostrando un doblez. Como las células femeninas tienen dos comosomas X y las masculinas uno, esto significa que en nuestro estudio un 3% de los cromosomas masculinos y un 4.25% de los femeninos (criterio clásico) o bien un 8.5% de los cromosomas masculinos y un 7% de los

femeninos (criterio amplio) se doblan. En resumen, los cromosomas X se doblan en ambos sexos con frecuencias similares y sugieren que todos los cromosomas X (activos e inactivos, masculinos o femeninos) se doblan en interfase, si bien los estudios de Flejter y col. (1984) demuestran que el cromosoma X inactivo, de replicación tardía, podría retener su patrón de doblado durante un periodo mayor del ciclo celular que su homólogo activo. Esta interpretación explicaría con facilidad la existencia de células femeninas con ambos cromosomas doblados presentes tanto en nuestro estudio como en los de Van Dyke y col. (1987) y Munn y col. (1991). En cambio, estos hallazgos son muy difíciles de conciliar con la hipótesis del remanente del corpúsculo de Barr desarrollada por Flejter y col. (1986) y Van Dyke y col. (1987).

Munn y col. (1991) no hallaron diferencias entre pacientes con dos y tres centros de inactivación y McCorquodale y col. (1986) encontraron una disminución significativa en el número de estos dobleces en individuos con aneuploidías del cromosoma X. Mientras que en células con dos cromosomas X el doblez se sitúa generalmente en el de replicación tardía, lo cual lo convierte en un buen marcador indirecto para identificar el cromosoma X inactivo, esta relación no parece mantenerse en células con más de dos cromosomas X.

Finalmente, la tabla XIII demuestra que el cromosoma X se dobla en amniocitos de sexo femenino con una frecuencia de prácticamente el doble a la de los linfocitos femeninos. En cambio en los varones prácticamente no hay diferencia. Estas diferencias entre tejidos se deben probablemente a diferencias en la duración del ciclo celular, mucho más largo en los amniocitos: un cromosoma retrasado en el ciclo celular como es el cromosoma X de replicación tardía tendría menos tiempo para rectificar sus dobleces antes de entrar en metafase. A este respecto es interesante señalar que en el doblez autosómico en 15q11q13 se ha observado el efecto contrario: es más frecuente en sangre que en líquido amniótico o vellosidad corial. Se ha demostrado que esta zona se replica de forma tardía en linfocitos y temprana en otros tejidos embriológicamente más cercanos a los amniocitos como los neuroblastos (Guratne y col. , 1995). Estas diferencias de frecuencias entre tejidos (que no se observan en otros dobleces frecuentes como 11q14q22, 1q31, 2q22q24, 11q14p22, 1p33p35, 13q21, 15q21, 3q26 y 10q23) podrían sugerir la existencia de una relación entre el momento de replicación y la frecuencia con que se observa un determinado doblez en la metafase.

Los dobleces cromosómicos pueden ser un remanente de su estructura interfásica precedente

La sugerencia de Flejter y col. (1984) de que los dobleces con frecuencia superior al azar en el cromosoma X son un remanente de la organización interfásica de este cromosoma puede ser también aplicable a los dobleces autosómicos. Si este es el caso, debería poderse demostrar algún tipo de correlación entre los dobleces y fenómenos citogenéticos que se hayan originado en la interfase precedente. Para evitar distorsiones en los datos obtenidos, los fenómenos estudiados deberían implicar una sola banda de un cromosoma y no implicar varias divisiones celulares a fin de evitar problemas de diferencias de viabilidad. A continuación revisaremos alguna evidencia.

Dutrillaux y colaboradores (1987) estudiaron con detenimiento los isoacéntricos, una anomalía inestable ya que implica un fragmento acéntrico que se pierde con rapidez y por tanto que no es previsible que esté sujeta a los fenómenos de clonalidad y selección diferencial en cultivo. Hemos realizado el análisis FSM en los datos agrupados aportados por estos autores observando que los puntos de rotura de los isoacéntricos presentan una distribución claramente no debida al azar en al menos nueve bandas. Ocho de estas bandas han sido identificadas en nuestro estudio como puntos que se doblan con frecuencia superior al azar (Tabla XV), sugiriendo algún tipo de relación entre ambos fenómenos.



Figura 5.2: Cromosomas metafásicos mostrando dos tipos de doblez.

(a) Sin entrecruzamiento de cromátides y (b) con entrecruzamiento de cromátides.

En la fase G2 y M del ciclo celular, ambas cromátides se mantienen unidas mediante un complejo de cohesión (Micahelis y col. , 1997). Esto provoca una pérdida de la

flexibilidad lateral del conjunto que podría determinar que los dobleces cromosómicos que superen un determinado ángulo crítico se resuelvan en una disposición especial que provoca la estrecha aposición de ambas cromátides hermanas (Figura 5.2).

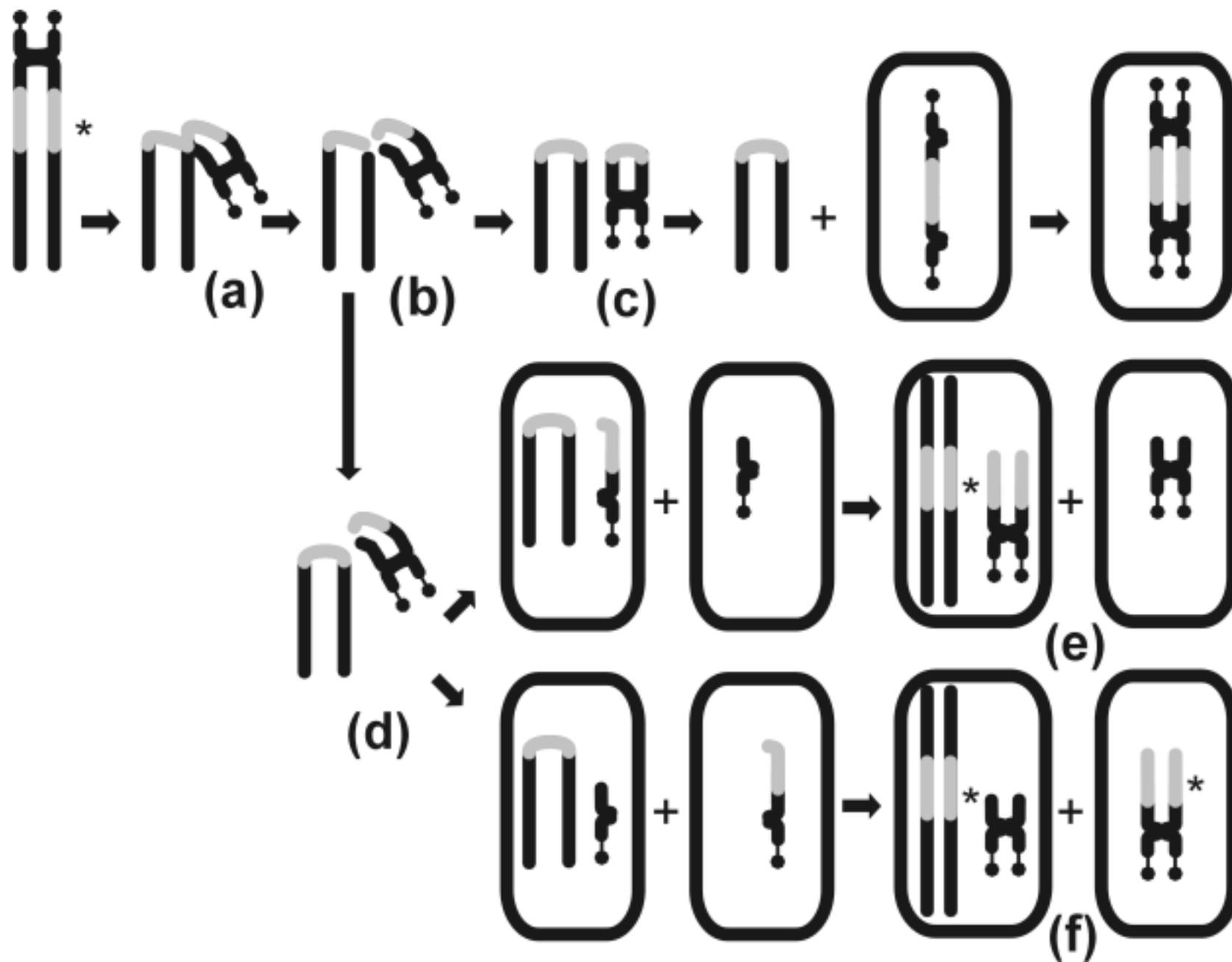
Se puede producir una rotura y reparación proximal incompleta y posteriormente una reduplicación. Esta situación se puede resolver finalmente en una célula con la formación de un pseudoisoacéntrico y un cromosoma deleciónado (Figura 5.3).

TABLA XV: Puntos de rotura no aleatorios identificados por el programa FSM implicados en la formación de isoacéntricos.

Banda	Nº Isoacéntricos	Doblez no aleatorio
1p31	4*	Si
1q12	11*	Si
2q22-24	6*	Si
4q22-24	3*	Si
8q21	3*	Si
9q12	5*	No
13q21	3*	Si
14q12	4*	Si
15q11-13	3*	Si

Figura 5.3 (página posterior): Modelo que explica la relación entre los dobleces cromosómicos y la formación de isoacéntricos.

En la fase G2 el dobléz de dos cromátides hermanas estrechamente unidas puede producir su estrecha aposición (a). Tras producirse una rotura (b) esta figura se puede resolver mediante una reparación completa (c) formándose un fragmento isoacéntrico y un fragmento dicéntrico que puede reduplicarse en una célula hija convirtiéndose en una duplicación isodicéntrica invertida y un fragmento acéntrico que se pierde rápidamente. Alternativamente, tras una reparación proximal incompleta (d) y una reduplicación posterior, se puede producir una célula hija con un fragmento pseudoisoacéntrico y un cromosoma deleciónado y otra célula hija con un cromosoma deleciónado (e) y (f). Según se realice el reparto, una célula puede presentar los cromosomas isoacéntrico y deleciónado con una banda del mismo tamaño (indicada con un asterisco) (e) o el isoacéntrico con la banda y el deleciónado sin ella (f).



Durante el análisis citogenético de rutina realizado en pacientes del Hospital Materno Infantil "Vall d'Hebron" hemos hallado de forma infrecuente isoacéntricos. En algunos casos la banda en el punto de rotura es aparentemente del mismo tamaño en el cromosoma normal, el isoacéntrico y el cromosoma deleciónado (figura 5.4). En otros, la banda en el punto de rotura es del mismo tamaño en el cromosoma normal y el isoacéntrico, pero no es visible en el cromosoma deleciónado. Estos hallazgos son el resultado esperado del mecanismo de formación de isoacéntricos propuesto en la figura 5.3.



Figura 5.4: Isoacéntricos.

(a) Fragmento isoacéntrico, cromosoma deleciónado y cromosoma 1 normal. La banda 1p21 tiene una anchura similar en los tres cromosomas (b) fragmento isoacéntrico, cromosoma deleciónado y cromosoma 3 normal. La banda 3q21 tiene una anchura similar en los cromosomas isoacéntrico y normal, pero no se observa en el cromosoma deleciónado.

En algún caso es posible estabilizar un fragmento isoacéntrico mediante la aparición de un neocentrómero. La revisión de 29 de estos cromosomas realizada por Rivera y col. (1999) mostró que en 26 casos se trataba de inversiones duplicaciones. El pequeño número de casos publicados y la fuerte interferencia que presumiblemente debería derivarse de la selección debida a la viabilidad de un individuo portador de la anomalía impide un análisis en profundidad. De todas maneras, en la mayoría de los casos el neocentrómero está en el punto de rotura o sus cercanías, sugiriendo algún tipo de relación entre los mecanismos de formación del isoacéntrico y el neocentrómero. Los puntos de rotura en 13q21, 13q32 y 15q25 han sido observados al menos en dos ocasiones. La banda 13q21, pero no 13q32 y 15q25, ha sido identificada como un punto que se dobla y está implicado en la formación de isoacéntricos con frecuencias superiores al azar. Mientras que la localización del neocentrómero es idéntica al punto de rotura en todos los casos que implican las bandas 13q32 y 15q25, esto sólo se cumple en uno de los tres casos que implican a 13q21, estando situados los otros dos neocentrómeros en 13q32. Una hipótesis atractiva es que mientras que el marcador con el neocentrómero en 13q21 puede tener un origen relacionado con la formación del neocentrómero, los dos casos con roturas en 13q21 y neocentrómero en 13q32 pueden ser isoacéntricos relacionados con los dobleces no al azar estabilizados por un neocentrómero vecino.

Hemos demostrado que el doblez en 15q11q13 es el doblez autosómico mas frecuente en sangre periférica y se dobla de forma estadísticamente significativa, aunque con menos frecuencia, en otros tejidos (Tablas VI, IX y XII). Es tentador especular con la idea de que este doblez es un fenómeno que puede favorecer situaciones como las descritas en la figura 5.3. y contribuir a la alta frecuencia de reorganizaciones cromosómicas que implican esta región cromosómica: la delección intersticial en 15q11q13 se observa en el 70-75% de los síndromes de Prader Willi y Angelman (Robinson y col. , 1998) y la inversión duplicación de esta zona se puede hallar en un 0.02% de los recién nacidos (Buckton y col. , 1985). La observación de que ambas anomalías comparten alguno de sus puntos de rotura preferentes implica que tienen en común algún tipo de factor de predisposición o formación de la anomalía. Clásicamente se han propuesto tres mecanismos de formación de la delección: a) una recombinación homóloga intercromosómica entre zonas de ADN que flanquean la zona crítica en las que habría un bajo número de repeticiones del ADN espaciadas (Chen y col. , 1997), una reorganización intercromosómica (LeGuern y col. , 1996) y un sitio frágil asociado

a la expansión de una zona con repeticiones de un determinado triplete (Jones y col. , 1995). La evidencia que apoya las reorganizaciones inter cromosómicas en el síndrome de PW es conflictiva. Los datos de Carrozzo y col. (1997) sugieren un intercambio desigual entre cromosomas homólogos en cinco de las siete familias estudiadas, siendo los datos compatibles con un evento intracromosómico en las dos restantes. Robinson y col. (1998) hallaron una incidencia de intercambios meióticos no superior a la esperada por azar en sus pacientes (2/6). Por otra parte la duplicación 15q11q13, el fenómeno complementario a la delección y que se produciría de forma paralela en el curso de un intercambio desigual entre cromosomas no homólogos, es compatible con la vida pero sólo ha sido descrita de forma muy infrecuente (Pettigrew y col. 1987, Clayton- Smith y col. 1993; Mutirangura y col. 1993; Abeliovich y col. 1995, Browne y col. 1997, Repetto y col. 1998). Robinson y col. (1998) observaron recombinación entre los alelos que flanquean la zona crítica en los tres únicos pacientes que estudiaron pero no pudieron determinar, debido al bajo número de casos estudiados, si la proporción entre los eventos intra e inter cromosómicos es diferente de forma significativa en los síndromes de PW y AG. Finalmente, se han descrito duplicaciones segmentarias (LCRs) con orientación invertida flanqueando la zona delecionada en ambos síndromes (Christian y col. , 1999). Los LCRs son regiones cromosómicas de estructura muy compleja consistentes en bloques de 10 a 400 Kb con una identidad igual o superior al 97% que han surgido de la duplicación de determinados segmentos cromosómicos. Pueden contener genes, fragmentos de genes, pseudogenes, secuencias retrovirales endógenas, etc. Se ha identificado un número creciente de patologías cromosómicas en cuyo origen hay una probable implicación de los LCRs favoreciendo diversos tipos de recombinación (Figura 5.5). Según el tamaño de la reorganización, la patología producida será de tipo mendeliana, genómica (incluyendo los síndromes de genes contiguos) o cromosómica. En el caso concreto de los síndromes de PW y AG, la orientación invertida de los LCRs favorecería, mediante un lazo intracromosómico, la formación de delecciones intersticiales (Stankiewicz y Lupski, 2002).

En resumen, toda esta evidencia apoya la existencia de un predominio de las reorganizaciones intracromosómicas, por ejemplo un doblez en 15q11q13, que facilitaría las delecciones intersticiales favoreciendo los intercambios entre ambas cromátides con formación de un pequeño anillo acéntrico inestable en G1 y una inversión duplicación isodidéncica de la región 15q11q13. Los dobleces también

podrían favorecer una reunión en "U" entre las cromátides hermanas (Figura 5.3). Este mecanismo no implica la producción de una duplicación recíproca.

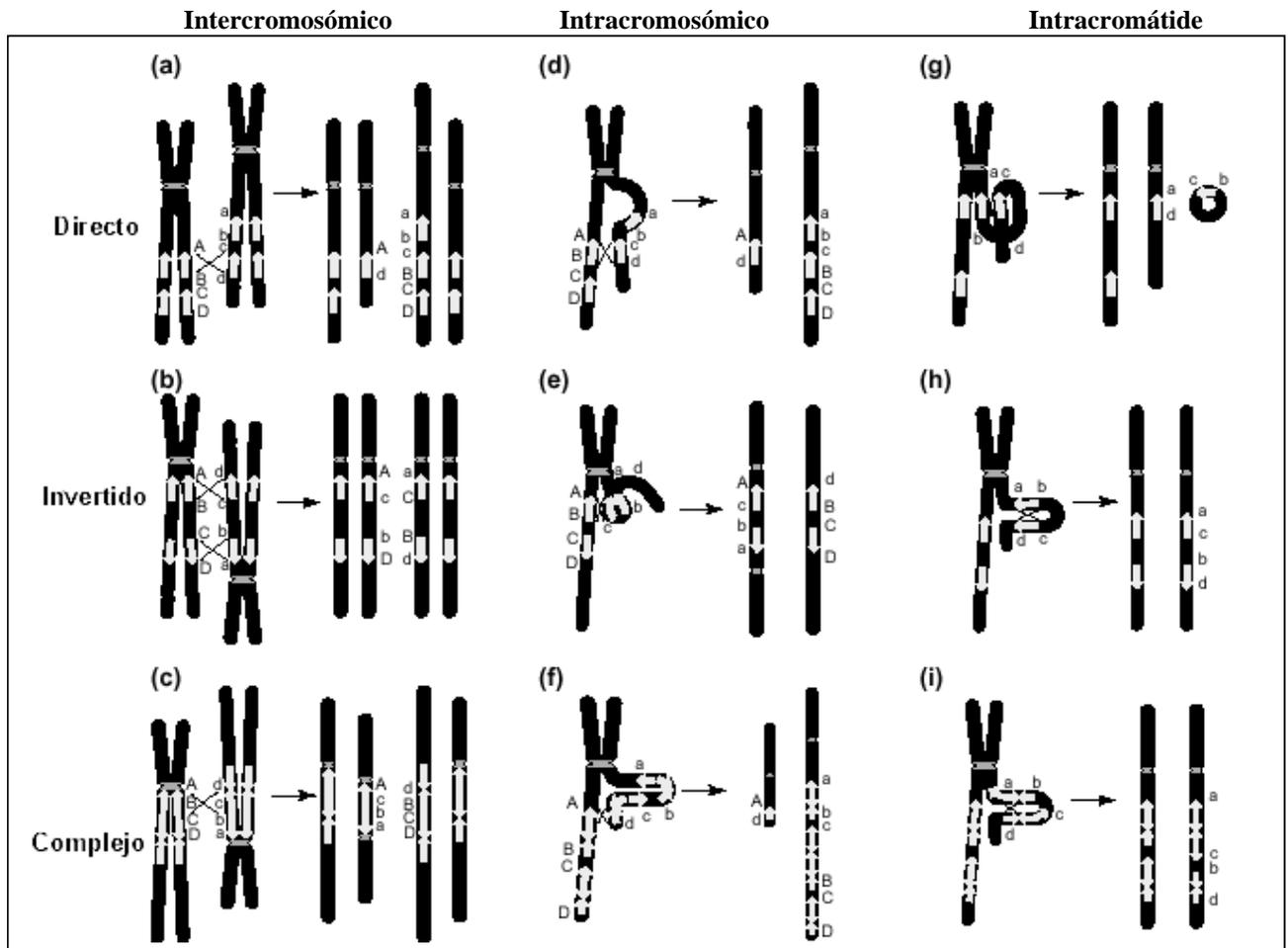


Figura 5.5 (página anterior): Representación esquemática de los tipos de reorganizaciones genómicas (Stankiewicz y Lupski, 2002).

Las flechas grises representan los LCRs y su orientación. Se pueden producir (a) (c) (d) y (f) deleciones y duplicaciones como consecuencia de un mal apareamiento y posterior recombinación, (b) y (h) inversiones, (g) deleción con producción de acéntrico y (e) formación de inversiones duplicaciones.

La banda 7q11.2 también ha sido identificada como un punto que se dobla con frecuencia superior al azar en nuestro estudio. Sin embargo, el hallazgo de algunos cromosomas de alta resolución localiza este doblez en la región 7q11.21q11.22, y por tanto impide relacionar este doblez con la deleción en 7q11.23 presente en los pacientes con síndrome de Williams (Osborne y col. , 1997). Nuestro análisis tampoco ha detectado dobleces con frecuencia superior a la del azar en la zona 22q11.2, delecionada en mas del 90% de los pacientes con el síndrome de DiGeorge (Carey y col. , 1992). Estos hallazgos son coherentes con la evidencia experimental de los estudios moleculares de Baumer y col. (1998), que hallaron que los sucesos intercromosómicos son mucho más frecuentes que los intracromosómicos en la génesis de las deleciones 7q11.23 y 22q11.2. También se han hallado LCRs con diversas orientaciones flanqueando la zona crítica de este síndrome. Sin embargo, la reorganización suele darse entre LCRs de idéntica orientación, que no favorece la formación de lazos cromosómicos (Stankiewicz y Lupski, 2002).

La notable correspondencia entre los dobleces detectados en metafase en el cromosoma 12 y los asumidos en el modelo elaborado por Nogami y col. (2000) a partir de estudios de FISH en núcleos interfásicos motivó un estudio en cromosomas con bandas G de resolución elevada (Figura 4.3). El resultado es una correspondencia aún mayor entre el modelo elaborado por Nogami y el que se deriva de nuestro análisis de dobleces, suministrando evidencia directa sobre un patrón de doblado no al azar en el núcleo interfásico que se corresponde con el visible en los cromosomas metafásicos (Figura 5.6).

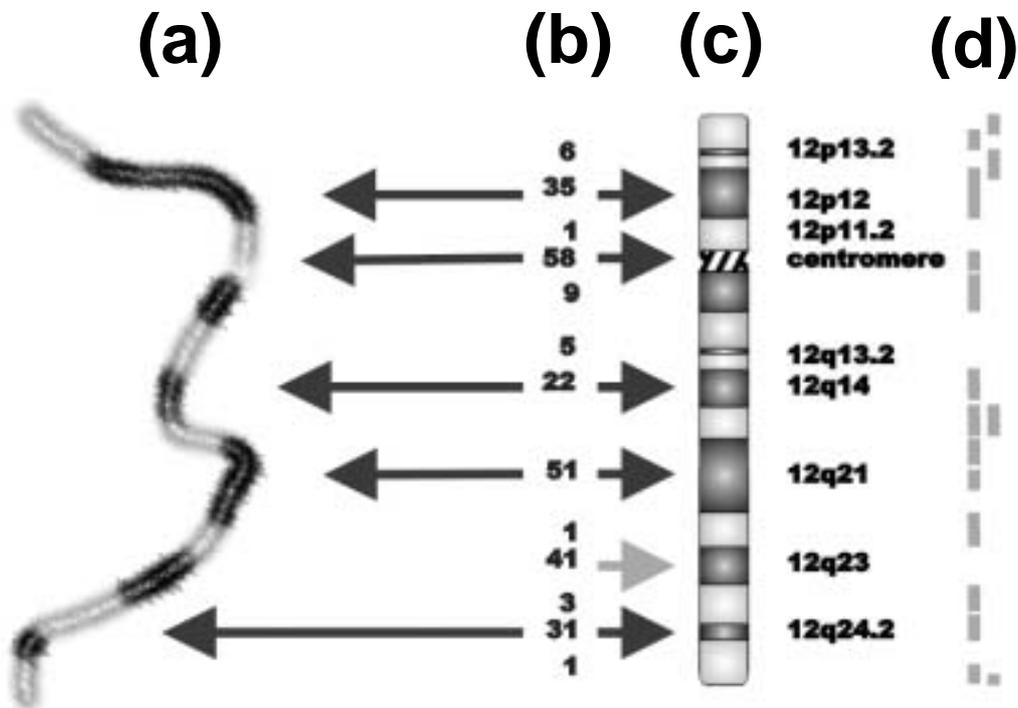


Figura 5.6: Correspondencia entre los dobleces metafásicos y el cromosoma 12 interfásico.

(a) Modelo de cromosoma 12 interfásico de Nogami y col. (2000), (b) número de dobleces detectados en nuestro estudio, (c) ideograma ISCN de un cromosoma 12 a una resolución de las 400 bandas con la adición de las bandas 12p13.2 y 12q13.2 y (d) localización de los diferentes cósmidos utilizados por Nogami.

La banda 12q11.2, identificada en nuestro estudio general en sangre periférica como doblez de frecuencia superior al azar, muestra en el estudio de alta resolución una frecuencia de dobleces baja a intermedia, inferior al resto de las bandas con dobleces no al azar. Una posible explicación es la asignación errónea de dobleces centroméricos a esta banda en metafases de patrón de bandas poco definido.

El estudio de alta resolución ha detectado un doblez en 12q24.2 que el de baja resolución fue incapaz de demostrar. Cabe destacar que 12q24.2 es una banda muy fina, invisible en cromosomas de baja resolución.

Existen dos grandes diferencias entre nuestro estudio y el de Nogami y col. (2000). Primero, el estudio de Nogami y col. (2000) no detectó un doblez en 12q23, banda que presenta una elevada frecuencia de dobleces en nuestro estudio. Nogami y col. (2000) utilizaron en su trabajo cósmidos localizados en 12q22 y 12q24 pero no en 12q23. En estas condiciones experimentales es imposible la detección de dobleces en 12q23

La segunda gran diferencia entre ambos estudios se refiere a la asignación por Nogami y col. (2000) de un doblez en 12q14-15, incluyendo dobleces en ambas bandas. Sin embargo, el estudio de Nogami y col (2000) no incluye cósmidos localizados en 12q13 o que diferencien entre las bandas 12q14 y 12q15. Por tanto, en estas condiciones experimentales no se pueden realizar inferencias precisas sobre la región cromosómica 12q12-14 y la asignación de dobleces a 12q14 o 12q15 es difícil o imposible.

Pese a las diferencias antes comentadas, podemos concluir que estos resultados son una fuerte evidencia en apoyo de la existencia de un patrón no aleatorio y relativamente fijo de dobleces cromosómicos en interfase.

Los dobleces cromosómicos no dependen de factores presentes en el vértice del doblez

Existen dos posibles modelos para explicar un doblez en cualquier estructura. En un modelo el doblez se produciría exclusivamente a causa de factores presentes en su vértice, que actuarían como una bisagra (Figura 5.7a). El modelo alternativo implica que el doblez se produciría debido a la unión de los extremos del segmento doblado (con participación o no del vértice) (Figura 5.7b).

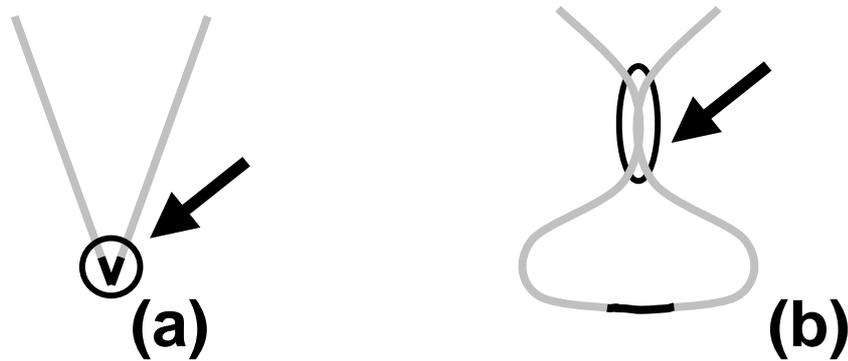


Figura 5.7: Dos modelos de estabilización de un doblez cromosómico.

(a) Doblez dependiente de factores presentes en su vértice y (b) doblez dependiente de factores presentes en ambos extremos del segmento doblado

Hemos realizado la localización precisa del doblez 15q12 mediante estudios de alta resolución y técnicas de FISH. Los pacientes con síndrome de Prader Willi por deleción de esta zona (paciente 21) constituyen un experimento natural que permite diferenciar entre ambas hipótesis, ya que si la deleción incluye la zona cromosómica responsable del doblez se imposibilitará su formación. En el paciente 21 hemos hallado cromosomas 15 en los que el patrón de bandas es suficientemente preciso como para poder comprobar que el cromosoma 15 doblado era el delecionado (Figura 5.8).

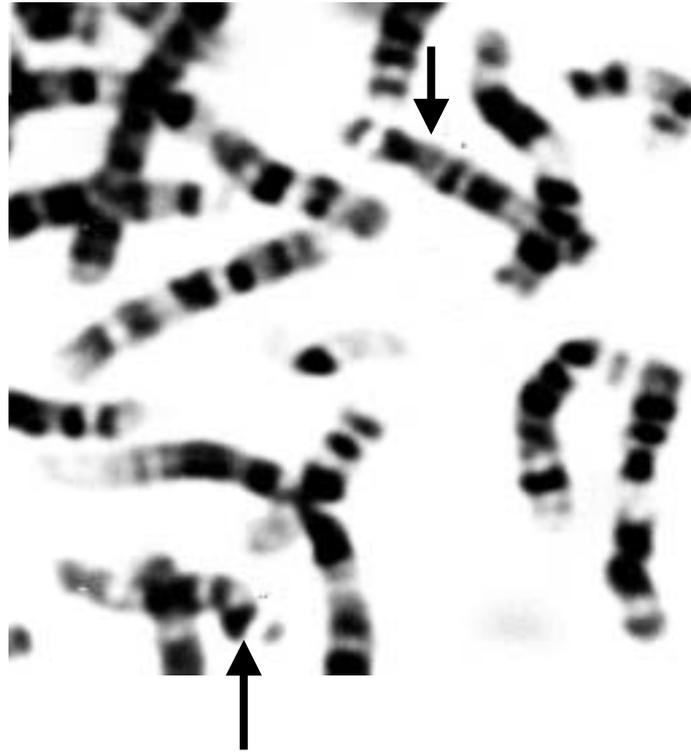


Figura 5.8: Doblez en un cromosoma 15 delecionado (flecha inferior) en un paciente con síndrome de Prader Willi.

Una comprobación adicional es que se han hallado en el mismo paciente siete metafases con ambos cromosomas 15 mostrando el doblez (Figura 4.1). Por tanto, nuestros datos experimentales apuntan a la existencia de factores responsables de la inducción y/o mantenimiento del doblez fuera de su vértice.

Todas las bandas de G oscuras pueden ser puntos de doblez.

Los estudios de resolución elevada realizados en los cromosomas 5 y 12 (Figuras 4.4 y 4.3) sugieren que los dobleces se restringen a las bandas G de tinción oscura.

Las reorganizaciones cromosómicas tienden a localizarse en las bandas claras.

A diferencia de lo que ocurre en los dobleces cromosómicos, las reorganizaciones cromosómicas analizadas con técnicas de bandas G tienden a localizarse en las bandas de tinción clara (Stoll, 1980; Fuster y col. , 1989; Warburton, 1991). También las roturas cromosómicas, ya sean detectadas en pacientes con Anemia de Fanconi o inducidas por virus (Von Koskull y Aula, 1977), endonucleasas o radiaciones ionizantes (Folle y col. , 1998) se localizan preferentemente en las bandas claras.

Hay autores han hallado un exceso de roturas en la interfase entre las bandas claras y oscuras (Aurias y col. , 1978; Buckton, 1976; Dutrillaux y col. , 1977; Dubos y col. , 1978) y han observado un efecto óptico que hace que exista una tendencia a asignar los puntos de rotura a las bandas mas claras (Dutrillaux y col. , 1977; Savage, 1977) A fin de aclarar estos hallazgos Nakagome y col. (1983) realizaron un estudio en anomalías cromosómicas (duplicaciones invertidas, isodicéntricos y anillos cromosómicos) particularmente adecuadas para decidir si un punto de rotura se sitúa en una banda oscura, clara o la interbanda y confirmaron que, pese a los artefactos que posiblemente existen, las reorganizaciones cromosómicas realmente tienden a localizarse en las bandas de tinción clara con bandas G

Un modelo de cromosoma interfásico compatible con los datos derivados del estudio de los dobleces en los cromosomas metafásicos.

Un modelo de cromosoma interfásico ha de adecuarse a los datos experimentales existentes sobre la organización nuclear, incluyendo los resultados derivados del presente estudio. Resumiendo lo ya explicado, el desempaquetamiento de los cromosomas en el núcleo interfásico es muy limitado y los cromosomas mantienen su integridad formando territorios bien delimitados y no solapantes (Manuelidis, 1985; Bischoff y col. , 1993; Elis y col. , 1995). Dentro de los territorios los cromosomas interfásicos no adoptan una configuración rectilínea, sino con dobleces (Nogami y col. 2000; Lemke y col. , 2002).

Nuestro estudio sugiere la posibilidad de que las bandas G sean puntos de inflexión, por tanto un posible modelo de cromosoma interfásico seria el zigzag mostrado en la Figura 5.9a. Este modelo produce un territorio cromosómico interfásico con una zona

euromática central genéticamente activa rodeada de dos zonas heterocromáticas. Esto no se ajusta con las observaciones experimentales de que (a) las zonas genéticamente activas están en la periferia del territorio cromosómico (Cremer y col. , 1993; Moen y col. , 1995; Cremer y Cremer 2001) y (b) el ADN de replicación tardía (correspondiente a las bandas G) se localiza preferentemente en la periferia nuclear mientras que el ADN de replicación temprana (bandas R) lo hace en el interior del núcleo. Si modificamos nuestro modelo doblando el zigzag por la mitad obtenemos una nueva estructura que cumple estos requisitos (Figura 5.9b).

El presente estudio demuestra que la presencia de dobleces no depende de factores presentes en el vértice, por lo que dicha estructura debería estabilizarse con conectadores presentes en las bandas euromáticas (Figura 5.9 c).

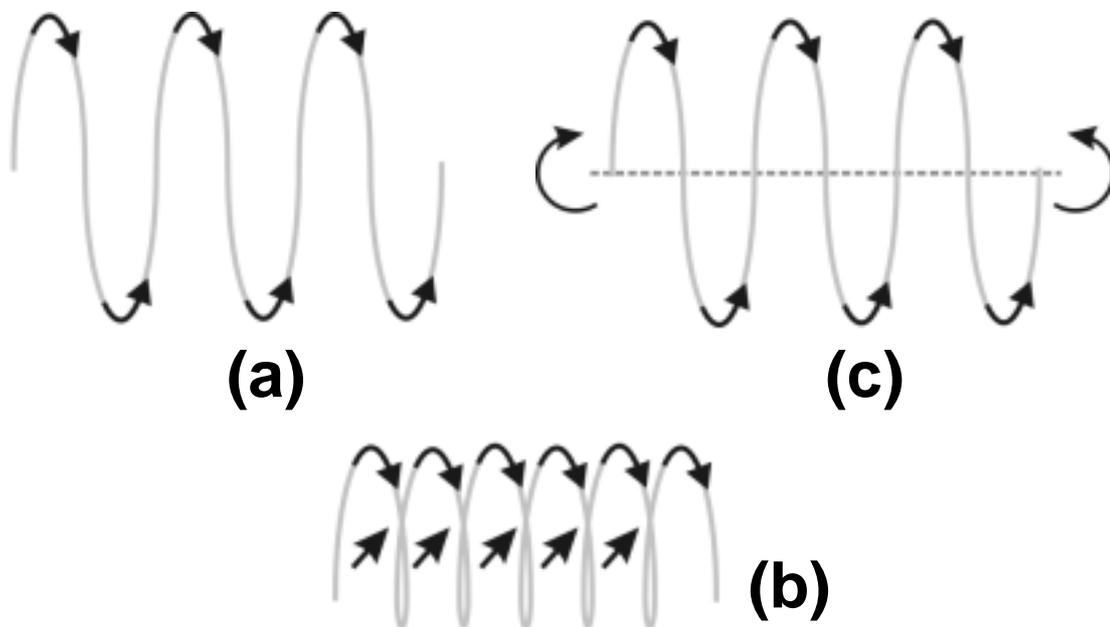


Figura 5.9: Modelo de cromosoma interfásico

(a) Representación esquemática de un cromosoma interfásico con dobleces alternos en las bandas G (flechas de color negro, (b) si la estructura se dobla por la mitad (c) se observa una única zona con bandas G. Dicha estructura podría estabilizarse mediante uniones localizadas en las bandas G claras (flechas inclinadas)).

En contra de la idea tradicionalmente aceptada, las variaciones de tamaño debido a la condensación y descondensación cromosómica se dan principalmente en sentido perpendicular al eje cromosómico, y no en el longitudinal (Weise y col. , 2002). Sin embargo, en una preparación cromosómica los cromosomas prometafásicos son mucho más largos que los metafásicos. Nuestro modelo resuelve esta aparente contradicción, ya que si la compactación cromosómica se produce de forma simultánea a la rectificación del zigzag postulado en nuestro modelo la longitud aparente del cromosoma interfásico puede ser aproximadamente igual a la del metafásico (Figura 5.10).

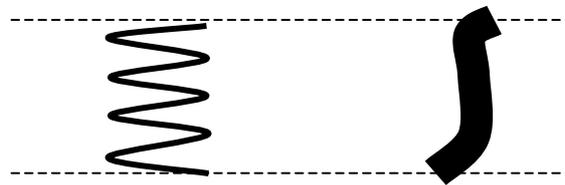


Figura 5.10: Comparación de las longitudes aparentes de un cromosoma interfásico (izquierda) y uno metafásico (derecha).

Las bandas oscuras podrían ser puntos de unión a la matriz nuclear y la periferia nuclear, rodeando los poros nucleares (Figura 1.11).

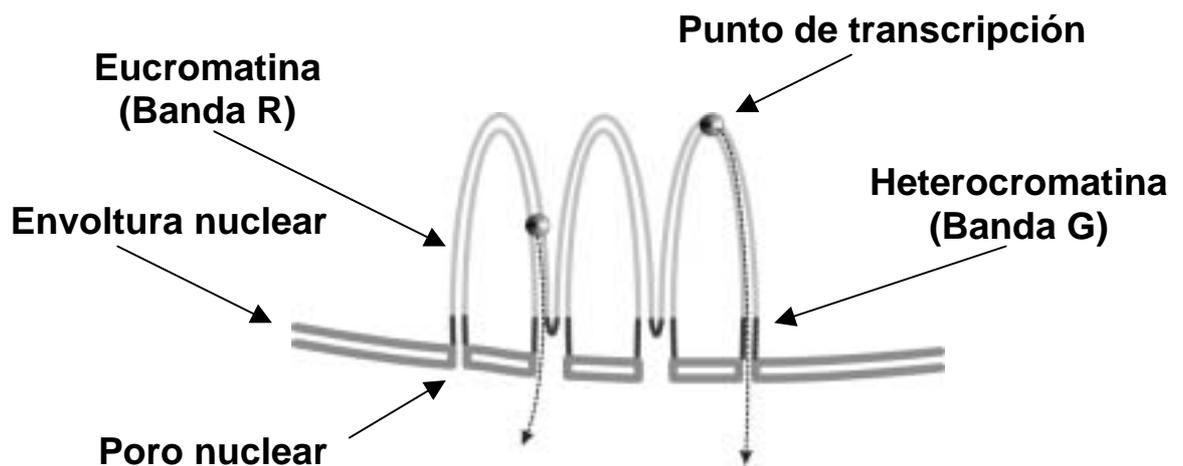


Figura 5.11: Modelo de cromosoma interfásico mostrando el transporte del ARNm dentro del cromosoma, desde el punto de transcripción hasta el citoplasma.

Durante la interfase la mayoría de las bandas de replicación tardía se localizan en la periferia nuclear, con una fracción menor rodeando el nucleolo y repartido por la matriz nuclear (Sadoni y col. , 1999). Se ha observado que la cromatina interacciona directa o indirectamente con los componentes de la lámina de la envoltura nuclear y, si bien no existe evidencia aún de la unión de la cromatina a los poros nucleares en células de mamíferos, sí que se ha demostrado en otros organismos. (revisado por Parada y Misteli, 2002). Las uniones se realizan con las láminas de la envoltura nuclear y otras proteínas de la envoltura nuclear y no parecen existir en las regiones centroméricas (Pyrpasopoulou y col. , 1996; Vlcek y col. , 1999; Kourmouli y col. , 2000). Todo esto podría tener un significado funcional de cara al transporte del ARNm desde los puntos de transcripción y ayustación hasta la periferia nuclear. El modelo de territorios cromosómicos de Cremer y col. (1993) y Cremer y Cremer (2001) asume que este transporte se realiza en un hipotético compartimento intercromosómico. Su formación debido a fuerzas de repulsión es poco compatible con la estructura altamente organizada y reproducible que un proceso de vital importancia como es el transporte de ARNm exige. Si este transporte se realiza dentro del cromosoma, quizás a través de alguna estructura formada por el andamio cromosómico al estilo de la postulada por Razin y Gromova (1995) (Figura 1.12) existe el problema de que los ARNm producidos en la parte central de los cromosomas de mayor tamaño tendrán que realizar un trayecto a veces muy largo hasta el exterior, superior a los producidos en los cromosomas de menor tamaño. Si asumimos salidas al hipotético conducto intracromosómico en cada banda G (que podrían estar conectadas a los poros nucleares) los diferentes trayectos serían mucho más igualados y, sobre todo, mucho más cortos.

La posición más central en el núcleo del cromosoma 19 (con muy pocas bandas G) (Croft y col. , 1999) y, en general, de los centrómeros de cromosomas con menor contenido de bandas G (Boyle y col. , 2001; Carvalho y col. , 2001) podría deberse a la existencia de uniones de las bandas G oscuras en zonas interiores del núcleo celular (Sadoni, 1999). Hemos observado que el cromosoma 19 presenta un mayor número de dobleces centroméricos que otros cromosomas de similar tamaño pero con un mayor número de bandas G oscuras. Pyrpasopoulou y col. (1996) aportan evidencia que sugiere que el centrómero no está unido a la envoltura nuclear. La figura 5.12 muestra un posible mecanismo por el cual la proporción de material cromosómico unido a la

periferia nuclear (bandas G oscuras) y libre (bandas claras) puede influir en el número de dobleces de un centrómero que no está unido a la envoltura nuclear.

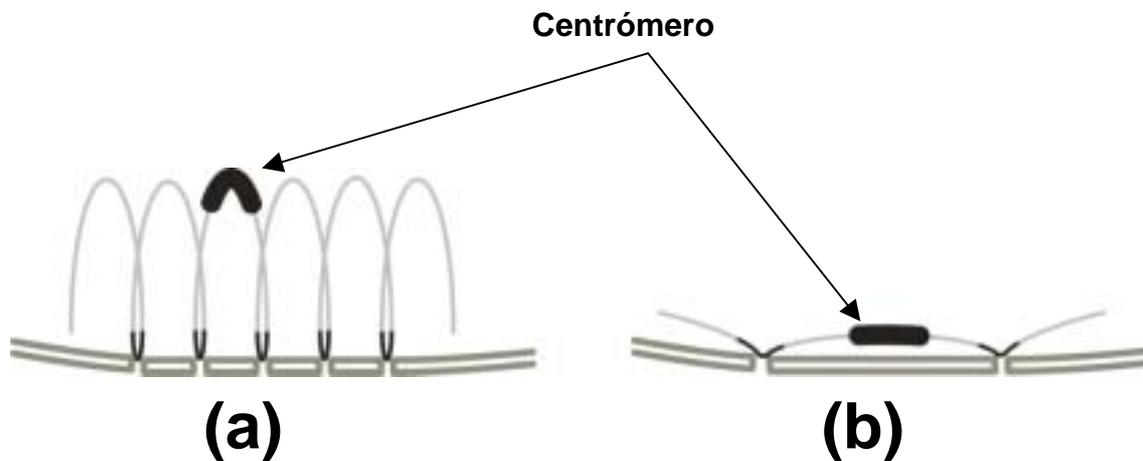


Figura 5.12: Modelo de cromosoma interfásico que muestra como el centrómero de un cromosoma con una pequeña parte de su material unido a la envoltura nuclear (a) se dobla más que el centrómero de un cromosoma con una mayor proporción de su material unido a la envoltura nuclear (b).

Se ha descrito el reposicionamiento de un centrómero situado frecuentemente en la periferia a una posición más central en el núcleo como consecuencia de una translocación que causa la desaparición de bandas G que le rodean (Carvalho y col. , 2001). Esta es exactamente la situación esquematizada en la figura 5.12.

Finalmente, los datos de la literatura sugieren que las reorganizaciones cromosómicas tienden a producirse en las bandas de tinción clara con más frecuencia que en las oscuras (Stoll, 1980; Fuster y col. , 1989; Warburton, 1991). Nuestro modelo implica un estrecho contacto entre una eucromatina bastante libre y un relativo aislamiento de las bandas oscuras fijadas a la envoltura nuclear. Bajo estas premisas las reorganizaciones cromosómicas con dos puntos de rotura han de darse preferentemente entre bandas claras.

6 CONCLUSIONES

1. Los cromosomas mitóticos muestran dobleces con una distribución no aleatoria.
2. El doblez autosómico más frecuente en sangre periférica está situado en 15q11-q13.
3. El doblez o dobleces más frecuentes en los cromosomas sexuales están situados en Xq11-q21.
4. El doblez o dobleces en Xq11-q21 no es un buen marcador de la inactivación del cromosoma X, especialmente en individuos con mas de un cromosoma X inactivo.
5. Los dobleces en Xq11-q21 son mas frecuentes en metafases de amniocitos cultivados que en las de linfocitos cultivados.
6. Los estudios con bandas G de resolución elevada sugieren que los dobleces cromosómicos se localizan mayoritariamente en las bandas G oscuras.
7. Los estudios en cromosomas 15 delecionados demuestran que los dobleces cromosómicos no dependen de factores presentes en el vértice del doblez.
8. Los dobleces de los cromosomas metafásicos muestran relación con fenómenos citogenéticos producidos en la interfase, como los isoacéntricos, lo cual sugiere algún tipo de correlación en el núcleo interfásico.
9. Los dobleces no aleatorios identificados en el cromosoma 12 tienen una buena correspondencia con la disposición de este cromosoma dentro del núcleo interfásico, tal como se deduce a partir de los estudios de FISH.
10. Los hallazgos derivados del estudio de los dobleces en los cromosomas metafásicos permiten elaborar un modelo de la organización del cromosoma metafásico que se adecua a los principales modelos experimentales desarrollados hasta el momento

7 BIBLIOGRAFÍA

- Abeliovich D, Dagan J, Werner M, Lerer I, Shapira Y, Meiner V (1995) simultaneous formation of inv dup (15) and dup(15q) in a girl with developmental delay: origin of the abnormal chromosomes. *Eur J Hum Genet* 3: 49- 55.
- Adolph K W, Cheng S M, Paulson Jr (1977) Isolation of a protein scaffold from mitotic HeLa cell chromosomes. *Proc Nat Acad Sci USA* 74: 4937-4941.
- Auerbach A D, Ghosh R, Pollio P C, Zhang M (1989) Diepoxybutane test for prenatal and postnatal diagnosis of Fanconi anemia. *Fanconi anemia: clinical, cytogenetic and experimental aspects*. Schroeder- Kurth T M, Auerbach A D, Obe G (ed). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Aurias A, Croquette M F, Nuyts J P, Griscelli C, Dutrillaux B (1986) New data on clonal abnormalities of chromosome 14 in ataxia telangiectasia: tct(14;14) and inv(14). *Hum Genet* 72: 22- 24.
- Aurias A, Prieur M, Dutrillaux B, Lejeune J (1978) Systematic analysis of 95 reciprocal translocation of autosomes. *Hum Genet* 45: 259-282.
- Avalos M R, Leonard C, Mielot F, Tchernia G (1989) Inactivated X chromosome fold in human leukemia and related clonal disorders. *Hum Genet* 82:386-388
- Avner P, Heard E (2001) X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat Rev Genet* 2: 59- 67
- Baskin Y (1995) Mapping the cell's nucleus. *Science* 268: 1564- 1565.
- Baumer A, Dutly F, Balmer D, Riegel M, Tükel T, Krajewska- Walasek and Schinzel A (1998) High level of unequal meiotic crossovers at the origin of the 22q11.2 and 7q11.23 deletions. *Hum Mol Genet* 5: 887- 894
- Baumgartner M, Dutrillaux B, Lemieux N, Lilienbaum A, Paulin D, Viegas-Pequignot E.(1991) Genes occupy a fixed and symmetrical position in sister chromatids. *Cell* 64: 761- 766.
- Belmont A S, Braunfeld M B, Sedat J W (1989) Large-scale chromatin structural domains within mitotic and interphase chromosomes in vivo and in vitro.. *Chromosoma* 98:129-143.
- Berezney R, Coffey D S (1974) Identification of a nuclear protein matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 60: 410-417.
- Bischoff A, Albers J, Kharboush I, Stelzer E, Cremer T, Cremer C (1993) Differences in size and shape of active and inactive X-chromosome domains in human amniotic cell

- nuclei. *Microsc Res Tech* 25: 68-77.
- Blobel G (1985) Gene gating: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 8527.
- Böhm U, Dahm P F, McAllister B F, Greenbaum I F (1995) Identifying chromosomal fragile sites from individuals: a multinomial statistical model. *Hum Genet* 95: 249-256.
- Boy de la Tour E, Laemmli U K (1988) The metaphase scaffold is helically folded: sister chromatids have predominantly opposite helical handedness. *Cell* 55: 937-944.
- Boyle S, Gilchrist S, Bridger J M, Mahy N L, Ellis J A, Bickmore W A (2001) The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Hum Mol Gen* 10: 211-219.
- Brachet J (1961) *The living Cell*. Reeditado en *Selecciones de Scientific American: La célula viva* (1969). Editorial Blume, Madrid.
- Bronze-da-Rocha E, Catita J A, Sunkel C E (1998) Molecular cloning of metaphase chromosome protein 1 (MCP 1), a novel human autoantigen that associates with condensed chromosomes during mitosis. *Chrom Res* 6: 85- 95
- Browne C E, Dennis N R, Maher E, Long F L, Nicholson J C, Sillibourne J, Barber J C (1997) Inherited interstitial duplications of proximal 15q: genotype-phenotype correlations. *Am J Hum Genet* 61: 1342-1352.
- Buckton K E (1976) Identification with G and R banding of the position of breakage points induced in human chromosomes by in vitro X-irradiation. *Int J Radiat Biol* 29: 475-488
- Buckton K E, Spowart G, Newton M S, Evans H J.(1985). Forty four probands with an additional “marker” chromosome. *Hum Genet* 69: 353- 370
- Carey A H, Kelly D, Halford S, Wadey R, Wilson D, Goodship J, Burn J, Paul T, Sharkey A, Dumanski J, Nordenskjold M, Williamson R, Scambler P J. 1992. Molecular genetic study of the frequency of monosomy 22q11 in DiGeorge syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 51: 964-970
- Carmo-Fonseca M, Pepperkok R, Carvalho M T, Lamond A I (1992) Transcription-dependent colocalization of the U1, U2, U4/U6, and U5 snRNPs in coiled bodies. *J Cell Biol* 117: 1-14
- Carozzo R, Rossi E, Christian S, L, Kittikamron K, Livieri C, Corrias A, Pucci L, Fois A, Simi P, Bosio L, Beccaria L, Zuffardi O, Ledbetter D H (1997). Inter- and

- intrachromosomal rearrangements are both involved in the origin of 15q11-q13 deletions in Prader-Willi syndrome. (Letter) *Am J Hum Genet.* 61: 228-231.
- Carvalho C, Pereira H M, ferreira J, Pina C, Mendonça D, Rosa A C, Carmo-Fonseca M (2001) Chromosomal G-dark bands determine the spatial organization of centromeric heterochromatin in the nucleus. *Mol Biol Cell* 12: 3563-3572.
- Chen K S, Manian P, Koeuth T, Potocki L, Zhao Q, Chinault A C, Lee Ch C, Lupski J R (1997) Homologous recombination of a flanking repeat gene cluster is a mechanism for a common contiguous gene deletion syndrome. *Nature Genet* 7: 154- 163.
- Christian S L, Fantes J A, Mewborn S K, Huang B, Ledbetter D H (1999) Large genomic duplicons map to sites of instability in the Prader-Willi/Angelman syndrome chromosome region (15q11-q13). *Hum Mol Genet* 8:1025-37.
- Clayton- Smith J, Webb T, Cheng X J, Pembrey M E, Malcolm S E (1993) Duplication of chromosome 15 in the region 15q11q13 in a patient with developmental delay and ataxia with similarities to Angelman syndrome. *J. Med Genet* 30: 529- 531.
- Compton D A, Cleveland D W (1994) NuMA, a nuclear protein involved in mitosis and nuclear reformation. *Curr Opin Cell Biol* 6: 343-346.
- Cremer M, von Hase J, Volm T, Brero A, Kreth G, Walter J, Fischer C, Solovei I, Cremer C, Cremer T. 2001) Non-random radial higher-order chromatin arrangements in nuclei of diploid human cells. *Chromosom res* 9: 541- 567.
- Cremer T y Cremer C (2001) Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nature reviews* 2: 292-301
- Cremer T, Kurz A, Zirbel R, Dietzel B, Rinke E, Schröck E, Speicher M R, Mathieu U, Jauch A, Emmerich (1993) Role of chromosome territories in the functional compartmentalization of the cell nucleus. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 58: 777-792
- Croft J A, Bridger J M, Boyle S, Perry P, Teague P, Bickmore WA (1999) Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J Cell Biol* 145: 1119-1131.
- Dahm P F, Greenbaum I F (1994) Reconsideration of the binomial and the F distribution relationship as a test of non-randomness of chromosomal breakage. *Cytogenet Cell Genet* 66: 214-215
- De Braekeleer M, Smith B (1988) Two methods for measuring the non-randomness of

- chromosome abnormalities. *Ann Hum Genet* 52: 63-67
- Dell'Orco R T, Whittle W L (1994) Nuclear matrix composition and in vitro cellular senescence. *Exp Gerontol* 29: 39-149.
- Dietzel S, Eils R, Sätzler K, Bornfleth H, Jauch A, Cremer Ch, Cremer T (1998a) Evidence against a looped structure of the inactive human X- chromosome territory. *Exp Cell Res* 240: 187-196.
- Dietzel S, Jauch A, Kienle D, Qu G, Holtgreve- Grez H, Eils R, Muenkel C, Bittner M, Meltzer P S, Trent J M, Cremer T (1998b) Separate and variably shaped chromosome arm domains are disclosed by chromosome arm painting in human cell nuclei. *Chromosome Res* 6: 25- 33.
- Dubos C, Viegas-Pequignot E, Dutrillaux B (1978) Localization of Y-rays induced chromatid breaks using three consecutivestaining technique. *Mut Reass* 49: 127-131
- Dundr M y Misteli T (2001) Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem J* 356: 297-310
- Dutrillaux B, Al Achkar W, Aledo R, Aurias A, Couturier J, Dutrillaux A M, Flüry-Herard A, Gerbault- Seureau M, Hoffschir F, Lamoliatte E, Lefrançois D, Lombard M, Mamuris Z, Muleris M, Prieur M, Ricoul M, Sabatier L, Viegas- Peqignot E (1987). Isoacentric and isocentric chromosomes originating after deletions of human chromosomes. *Hum Genet* 76: 244- 247.
- Dutrillaux B, Couturier J, Viegas-Péquignot E, Schaison G (1977) Localization of chromatid breaks in Fanconi's anemia, using three consecutive stains. *Hum Genet* 37: 65-71
- Eils R, Bertin E, Saracoglu K, Rinke B, Schrock E, Parazza F, Usson Y, Robert-Nicoud M, Stelzer EH, Chassery JM (1995) Application of confocal laser microscopy and three- dimensional Voronoi diagrams for volume and surfase estimates of interphase chromosomes. *J Microsc* 177: 150-161.
- Elis R, Dietzel S, Bertin E, Schröck E, Speicher M R, Ried T, Robert- Nicoud M, Cremer C, Cremer T (1996) Three-dimensional reconstruction of painted human interphase chromosomes: active and inactive X chromosome territories have similar volumes but differ in shape and surface structure. *J Cell Biol* 135: 1427- 1440.
- Flejter W L, Van Dyke D L, Weiss L. 1984. Bends in human mitotic metaphase chromosomes, including a bend marking de X- inactivation center. *Am J Hum*

- Genete 36: 218- 226.
- Flejter W L, Van Dyke D L, Weiss L (1986) Location of the X inactivation center in primates and other mammals. *Hum Genet* 74: 63- 66.
- Flemming W (1882) *Zell substanz. Kern und Zelltheilung*. Leipzig: Vogel.
- Folle G A, Martínez-López W, Boccardo E, Obe G (1998) Localization of chromosome breakpoints: implication of the chromatin structure and nuclear architecture. *Mut Res* 404: 17-26.
- Fuster C, Mirò R, Templado C, Barrios L, Egozcue J (1988) Can sister chromatid intercrossovers be considered as prelesions? *Hum Genet* 79: 179- 180.
- Fuster C, Mirò R, Templado C, Barrios L, Moreo V, Egozcue J (1989) Fragile sites and breakpoints in constitutional rearrangements and in human sperm chromosomes. *Hum Genet* 82: 330- 334.
- Greenbaum I, Fulton J, White E, Dam P (1997) Minimum sample sizes for identifying chromosomal fragile sites from individuals: Monte Carlo estimation. *Hum Genet* 101: 109-112.
- Gunaratne P H, Nakao M, Ledbetter D H, Sutcliffe J S, Chinault A C (1995) Tissue-specific and allele-specific replication timing control in the imprinted human Prader-Willi syndrome region. *Genes Dev* 9: 808-820.
- Heitz E (1928) Das heterochromatin der Moose. *Jb Wiss Bot* 69: 728.
- Hernandez-Verdun D, Gautier T (1994) The chromosome periphery during mitosis. *Bioessays* 16: 179-185
- Hirano, T, Mitchison, J. (1994). A heterodimeric coiled-coil protein required for mitotic chromosome condensation in vitro. *Cell* 79: 449–458.
- Hoo J, Chao M, Samuel I, Morgan A (1990) Proximal 15q variant as possible pitfall in the cytogenetic diagnosis of Prader-Willi syndrome. *Clin Genet*. 37: 161-166.
- Hou Ch-D, Chiang J, Tai J J (1999) Testing the nonrandomness of chromosomal breakpoints using highest observed breakages. *Hum Genet* 104: 350-355.
- Howell R, Taylor A (1992) Chromosome instability syndromes. In *Human cytogenetics. A practical approach*. Vol II. Ed by Rooney D and Czepulkowski B IRL Press, Oxford.
- Hozak P, Hassan A B, Jackson D A, Cook PR.(1993) Visualization of replication factories attached to a nucleoskeleton. *Cell* 73: 361- 373.
- Hozak P, Sasseville A M-J, Raymond Y Cook PR (1995) Lamin proteins form an internal nucleoskeleton as well as peripheral lamina in human cells. *J Cell Sci* 108: 635-644.

- Huret J L, Leonard C, Aurias A (1987) Proposal for a scoring of the quality of the banding of chromosomes. *Hum Genet* 75: 373- 377
- International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860- 921
- ISCN (1985) An international system for human cytogenetic nomenclature (1985), Harnden D G, Klinger H P (eds) (S Karger, Basel/ New York 1985). Published in collaboration with the March of Dimes Birth Defects Foundation and Cytogenet Cell Genet: Appendix 2 (1985).
- Jackson D A, Dolle A, Robertson G Cook PR(1992) The attachments of chromatin loops to the nucleoskeleton. *Cell Biol Int Rep* 16: 687-696.
- Jones C, Penny L, Mattina T, Yu S, Baker E, Voullaire L, Langdon W Y, Sutherland G R, Richards R I, Tunnacliffe A (1995) Association of a chromosome deletion syndrome with a fragile site within the proto-oncogene CBL2. *Nature* 376:145-149
- Jones C, Penny L, Mattina T, Yu S, Baker E, Voullaire L, Langdon W Y, Sutherland G R, Richards R I, Tunnacliffe A (1995) Association of a chromosome deletion syndrome with a fragile site within the proto-oncogene CBL2. *Nature* 376: 145-149
- Jordan D K, Burns T L, Divelbiss J E, Woolason R F, Patil S R (1990) Variability in expression of common fragile sites: in search of a new criterion. *Hum Genet* 85: 462-466
- Koshland D, Strunnikov A (1996) Mitotic chromosome condensation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 305- 333
- Kourmouli N, Theodoropoulos P A, Dialynas G, Bakou A, Politou A S, Cowell I G, Singh P B, Geortratos S D (2000) Dynamic associations of heterochromatin protein 1 with the nuclear envelope. *EMBO J* 19: 6558-6568.
- Kurz A, Lampel S, Nikolenko J E, Bradl J, Benner A, Zirbel R M, Cremer T, Lichter P (1996) Active and inactive genes localize preferentially in the periphery of chromosome territories. *J Cell Biol* 135: 1195-1205
- Lamond A I, Earnshaw W C (1998) Structure and function in the nucleus. *Science* 280: 547- 553.
- LeGuern E, Gouider R, Ravise N, Lopes J, Tardieu S, Gugenheim M, Abbas N, Bouche P, Agid Y, Brice A (1996) A de novo case of hereditary neuropathy with liability to pressure palsies (HNPP) of maternal origin: a new mechanism for deletion in 17p11.2?. *Hum Mol Genet* 5, 103- 106

- Lemke J, Claussen J, Michel S, Chudoba I, Mühlig P, Westermann M, Sperling K, Rubtsov N, Ulrich-Walter G, Ullmann P, Kromeyer-Hauschild K, Liehr T, Clausse U, (2002) The ADN-based structure of human chromosome 5 in interphase. *Am J Hum Genet* 71: 1051-1059.
- Lewis C y Laemmli U K (1982) Higher order metaphase chromosome structure: evidence for metalloprotein interactions. *Cell* 29: 171-181.
- Luger K, Mader A W, Richmond R K, Sargent DF, Richmond T J (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389: 251- 260.
- Lukášová E, Kozubek S, Kozubek M, Falk M y Amrichová J (2002) The 3D structure of human chromosomes in cell nuclei. *Chromosome Research* 10: 535-548.
- Lundsteen C, Phillip J, Granum E (1980) Quantitative analysis of 6985 digitized trypsin G- banded human metaphase chromosomes. *Clin Genet* 18: 355- 370.
- Lyon M F (1999) X-chromosome inactivation. *Curr Biol* 9: R235-237.
- Manuelidis L (1985) Individual interphase chromosome domains revealed by "in situ" hybridization. *Hum Genet* 71: 288- 293.
- Manuelidis L (1990) A view of interphae chromosomes. *Science* 250: 1533- 1540.
- Mariani T (1989) Fragile sites and statistics. *Hum Genet* 81. 319-322.
- McAllister B F, Greenbaum I F (1997) How common are common fragile sites: variation of aphidicolin-induced chromosomal fragile sites in a population of the deer mouse (*Peromyscus maniculatus*). *Hum Genet* 100: 182-188.
- McKnight R A, Shamay A, Sankaran L, Wall RJ, Hennighausen L. (1992) Matrix-attachment regions can impart position independent regulation of a tissue- specific gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 6943- 6947.
- Michaelis Ch, Ciosk R, Nasmyth K (1997) Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell* 91: 35-45.
- Miller O J, Therman E (2001) *Human Chromosomes*, 4th ed. The chemistry and packaging of chromosomes. Springer, Heidelberg.
- Mirkovitch J, Gasser S M, Laemli U k (1988) Scaffold attachment of DNA loops in metaphase chromosomes. *J Mol Biol* 200: 101-110.
- Moen P T, Smith K P, Laerence J B (1995) Compartmentalization of specific pre-mARN metabolism: an emerging view. *Hum Mol Genet* 4: 1779-1789.
- Moens P B, Earnshaw W C (1989) Anti-topoisomerase II recognizes meiotic chromosome cores. *Chromosoma* 98: 317-322.

- Monaghan K G, Van Dyke D L, Feldman G L (1998) Prader-Willi-like syndrome in a patient with an Xq23q25 duplication. *Am J Med Genet* 80: 227- 231
- Münkel C, Langowski J. (1998) Chromosome structure predicted by a polymer model. *Physical Rev. E* 57: 5888-5896.
- Munn Ch A, Wenger S L, Steele M W (1991) Assessment of X bends in patients with atypical X chromosome phenotypes. *Ann Génét* 34, n°. 2: 120- 124.
- Mutirangura A, Kuwano A, Robinson WP, Greenberg F, Malcolm S, Ledbetter D H (1993) Duplication of chromosome 15q Prader- Willi and Angelman syndromes: a gene dosage paradox. *Am J Hum Genet* 53: A584.
- Nagele R, Freeman T, McMorrow L, Lee HY (1995) Precise spatial positioning of chromosomes during prometaphase: evidence for chromosomal order. *Science* 270: 1831-1835.
- Nakagome Y, Matsubara T, Fujita H (1983) Distribution of break points in human structural rearrangements. *Am J Hum Genet* 35: 288-300.
- Nakamura H, Morita T, Sato C (1986) Structural organization of replicon domains during ADN synthesis phase in the mammalian nucleus. *Exp Cell Res* 165: 291- 297.
- Nogami M, Nogami O, Kagotani K, Okumura M, Taguchi H, Ikemura T, Okumura K (2000) Intranuclear arrangement of human chromosome 12 correlates to large-scale replication domains. *Chromosoma* 108: 514–522.
- Osborne L R, Soder S, Shi X-M, Pober B, Costa T, Scherer S W, Tsui L C (1997.) Hemizygous deletion of the syntaxin 1A gene in individuals with Williams syndrome. *Am J Hum Genet* 61: 449- 452
- Parada L A, Misteli T (2002) Chromosome positioning in the interphase nucleus. *Trends Cell Biol* 12: 425-432
- Parker RE (1976) *Estadística para biólogos*. Eiciones Omega, Barcelona
- Paulson J R, Laemmli U K, (1977) The structure of histone- depleted metaphase chromosomes. *Cell* 12: 817-828.
- Penderson T (2002) Half a century of “The nuclear matrix”. *Mol Biol Cell* 11: 799-805
- Pettigrew A L, Gollin S M, Greenberg F, Riccardi V M, Ledbetter D H (1987) Duplication of proximal 15q as a cause of Prader- Willi syndrome. *Am J Med Genet* 28: 791- 802
- Plaja A, Vendrell T, Smeets D, Sarret E, Gili T, Català V, Mediano C, Scheres JMJC (2001). Variegated aneuploidy related to premature centromere division (PCD) is

- expressed “in vivo” and is a cancer-prone disease. *Am J Med Genet*: 98: 216–23.
- Poirier M G, Sertac E, Chatenay >D, Marko J F (2000) Reversible and irreversible unfolding of mitotic newt chromosomes by applied force. *Mol Biol Cell*: 11: 269–276, January 2000.
- Poirier M G, Sertac E, Marko J F (2002) The Bending Rigidity of Mitotic Chromosomes. *Mol Biol Cell* 13: 2170–2179.
- Pyrpasopoulou A, Meier J, Maison C, Simos G, Georgatos S (1996) The lamin B receptor (LBR) provides essential chromatin docking sites at the nuclear envelope. *EMBO J* 15: 7108-7119.
- Razin S V (1997) The Nuclear Matrix and spatial organization of chromosomal ADN domains. Springer, Heidelberg.
- Razin S V, Gromova I I (1995) The channels model of the nuclear matrix structure. *Bioessays* 17: 443-450.
- Repetto G M, White L M, Bader P J, Johnson D, Knoll J H (1998) Interstitial duplications of chromosome region 15q11q13: clinical and molecular characterization. *Am J Med Genet* 79: 82- 89
- Rivera H, Vasquez A I, García Cruz D, Crolla J A (1999) Neocentromere at 13q32 in one of two stable markers derived from a 13q21 break. *Am. J. Med. Genet.* 85: 385-388.
- Robinson W P, Dutly F, Nicolls R D, Bernasconi F, Peñaherrera M, Michaelis R C, Abeliovich D, Schinzel A A (1998). The mechanisms involved in formaton of deletions and duplications of 15q11- q13. *J. Med Genet* 35: 130- 136
- Sachs R. K, van den Engh G, Trask B, Yokota H, Hearst J E (1995) A random-walk/giant-loop model for interphase chromosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 92: 2710-2714.
- Saitoh N, Goldberg I, Earnshaw W C (1995) The SMC proteins and the coming of age of the chromosome scaffold hypotehesis. *BioEssays* 17: 759- 766.
- Saitoh Y, Laemmli U K (1994) Metaphase chromosome structure: bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold. *Cell* 76: 609-622
- Sadoni N, Langer S, Fauth C, Bernardi G, Cremer T; Turner B M, Zink D (1999) Nuclear organization of mammalian genomes: polar chromosome territories build up functionally distinct higher order compartments. *J Cell Biol* 146: 1211-1226.
- Savage J R K (1977) Assignment of aberration breakpoints in banded chromosomes.

- Nature 270: 513-514
- Smith C A B (1986) Chi-squared tests with small numbers. *Ann Hum Genet* 50: 163-167
- Stankiewicz P and. Lupski J R (2002) Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends in Genet* 18: 74-82
- Stoll C (1980) Nonrandom distribution of exchange points in patients with reciprocal translocations. *Hum Genet* 56: 89-93
- Sun H B, Shen J, Yokota H (2000) Size-dependent positioning of human chromosomes in interphase nuclei. *Biophys J* 79: 184-190.
- Van Dyke D L, Flejter W L, Worsham M J, Roberson J R, Higgins J V, Herr H M, Knuutila S, Wang N, Babu V R, Weiss L. (1986). A practical metaphase marker of the inactive X chromosome. *Am J Hum Genet* 39: 88- 95.
- Van Dyke D L, Flejter W L, Worsham M J, Roberson J R, Weiss L. (1985) A practical metaphase marker of the inactive X chromosome. *Pediatr Res* 19: 255A.
- Van Dyke D L, Worsham M J, Weiss L. (1987). The human inactivated X chromosome folds in early metaphase, prometaphase, and prophase. *Hum Genet* 77: 57- 59.
- Visser A E y Aten J A (1999) Chromosomes as well as chromosomal subdomains constitute distinct units in interphase nuclei. *J Cell Sci* 112, 3353-3360
- Vlcek S, Just H, Dechat T, Foisner R (1999) Functional diversity of LAP2 α and LAP2 β in postmitotic chromosome association is caused by an α -specific nuclear targeting domain. *EMBO J* 18: 6370-6384.
- Von Koskull H, Aula P (1977) Distribution of chromosome breaks in measles, Fanconi's anemia and controls. *Hereditas* 87: 1-10.
- Walker Ch L, Cargile C B, Floy K M, Delannoy M, Migeon B R (1991) The Barr body is a looped X chromosome formed by telomere association. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 6191- 6195.
- Wang J C (1996) ADN topoisomerases. *Annu Rev Biochem* 65: 636-692.
- Warburton D (1991) De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. *Am J Hum Genet* 49: 995-1013.
- Weise A, Starke H, Heller A, U Claussen, Thomas Liehr T (2002) Evidence for interphase DNA decondensation transverse to the chromosome axis: A multicolor banding analysis. *Int J Mol Medicine* 9: 359-361.

- Yakota H, Singer M J, Van den Engh G J (1997) Regional differences in the composition of chromatin in human G₀/G₁ interphase nuclei. *Chrom res* 5: 157-166
- Zbarsky I B, Dmitrieva N P, Yermolaeva L P (1962) On the structure of tumour cell nuclei. *Exp Cell Res* 27: 573-576.
- Zhao K, Hart CM, Laemmli U K (1995) Visualization of chromosomal domains with boundary element associated factor beaf-32. *Cell* 81: 879- 889.
- Zink D, Cremer T, Saffrich R, Fischer R, Trendelenburg M F, Ansorge W, Stelzer E H K (1998) Structure and dynamics of human interphase chromosome territories in vivo. *Hum Genet* 102: 241- 251.