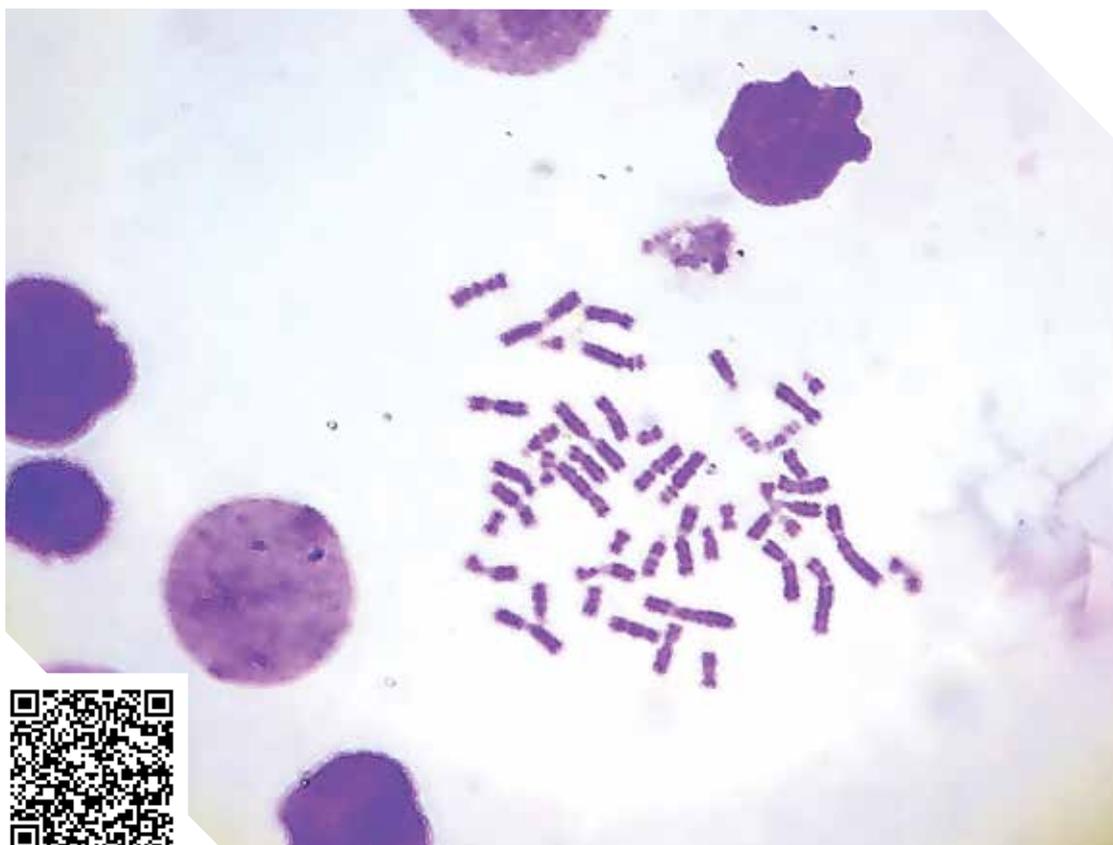


FUNDAMENTOS DE CITOGENÉTICA HUMANA Y ANIMAL

Myriam Janeth Ortega Torres - Julialba Angel Osorio - Jose Camilo Torres Romero

e-ISBN 978-958-651-651-8



Grupos de Investigación GICAFAT, CIAB



FUNDAMENTOS DE CITOGENÉTICA HUMANA Y ANIMAL

e-ISBN: 978-958-651-651-8

AUTORES

Myriam Janeth Ortega Torres

José Camilo Torres Romero

Julialba Ángel Osorio.

Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD

Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente

Línea de Investigación: Desarrollo rural

2018





GRUPOS DE INVESTIGACIÓN

GICAFAT

GIGASS

CIAB

Colección: Desarrollo rural

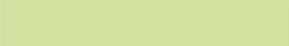
Serie: Discursos y prácticas del desarrollo

Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD

Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente

Línea de Investigación: Desarrollo rural

2018



UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA

Rector

Jaime Alberto Leal Afanador.

Vicerrectora Académica y de Investigación

Constanza Abadía García.

Vicerrector de Medios y Mediaciones Pedagógicas

Leonardo Yunda Perlaza.

Vicerrector de Desarrollo Regional

y Proyección Comunitaria

Leonardo Emeleth Sánchez Torres.

Vicerrector de Servicios a Aspirantes,

Estudiantes y Egresados

Edgar Guillermo Rodríguez Díaz.

Vicerrector de Relaciones Internacionales

Luigi Humberto López Guzmán.

Decana Escuela de Ciencias de la Salud

Myriam Leonor Torres.

Decana Escuela de Ciencias de la Educación

Clara Esperanza Pedraza Goyeneche.

Decana Escuela de Ciencias Jurídicas y Políticas

Alba Luz Serrano Rubiano.

Decana Escuela de Ciencias Sociales, Artes y Humanidades

Sandra Milena Morales Mantilla.

Decano Escuela de Ciencias Básicas,

Tecnología e Ingeniería

Claudio Camilo González Clavijo.

Decana Escuela de Ciencias Agrícolas,

Pecuarías y del Medio Ambiente

Julialba Ángel Osorio.

Decana Escuela de Ciencias Administrativas,

Económicas, Contables y de Negocios

Sandra Rocío Mondragón.



FUNDAMENTOS DE CITOGENÉTICA HUMANA Y ANIMAL

Myriam Janeth Ortega Torres
José Camilo Torres Romero
Julialba Ángel Osorio

Fundamentos de citogenética humana y animal / Ortega Torres, Myriam Janeth ... [et al.] -- [1.a. ed.]. Bogotá: Sello Editorial UNAD/2018. Colección: Desarrollo rural. Serie: Discursos y prácticas del desarrollo (Grupos de investigación GI-CAFAT – GIGASS - CIAB. Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente - ECAPMA)

ISBN: e-ISBN:978-958-651-651-8

1. GENÉTICA Y EVOLUCIÓN 2. BIOLOGÍA, CIENCIAS DE LA VIDA 3. CITOGENÉTICA I. Torres Romero, José Camilo II. Ángel Osorio, Julialba VI. Título.

576
OR77

Título de Libro

FUNDAMENTOS DE CITOGÉNÉTICA HUMANA Y ANIMAL

Autores

Myriam Janeth Ortega Torres, José Camilo Torres Romero, Julialba Ángel Osorio

Grupos de Investigación

GICAFAT

GIGASS

CIAB

e-ISBN: 978-958-651-651-8

Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente (ECAPMA)

Fotografía de la portada tomada y cedida por: Myriam Janeth Ortega Torres

©Editorial
Sello Editorial UNAD
Universidad Nacional Abierta y a Distancia
Calle 14 Sur No. 14-23
Bogotá D.C
Diciembre de 2018



Esta obra está bajo una licencia Creative Commons -
Atribución – No comercial – Sin Derivar 4.0 internacional.
https://co.creativecommons.org/?page_id=13.

Índice

Capítulo 1. Breve contexto histórico a modo de Introducción	9
Capítulo 2. Ciclo y cultivos celulares	14
Ciclo celular	20
Puntos de chequeo del ciclo celular	20
Importancia del chequeo durante G2 y las proteínas moduladoras ATM, ATR y p53	22
Punto de chequeo en G2/M	22
CULTIVOS CELULARES	23
Algunos tipos de cultivos celulares útiles en la obtención de cariotipos	24
CONDICIONES GENERALES DE UN CULTIVO CELULAR	26
Concentración de oxígeno	26
Otros gases	28
Fuerza iónica	28
Capítulo 3. Cariotipo humano	34
Cromosomas BR Cromosomas Bandas Q.	34
CROMOSOMAS HUMANOS	38
Inactivación del cromosoma X en hembras de mamíferos	39
Clasificación de los cromosomas humanos	42
BANDAS Y NOMENCLATURA DE LOS CROMOSOMAS	45
Algunas reglas de nomenclatura de cariotipos normales	46
Nomenclatura de polimorfismo	46
Nomenclatura de las anormalidades numéricas	46
ORIGEN DE LAS ANORMALIDADES NUMERICAS	47
ESPERMATOGÉNESIS NORMAL	49
Quimeras	50
ANORMALIDADES EN LA ESTRUCTURA DEL CROMOSOMA	51
INVERSIONES	51

TRANSLOCACIONES	54
TRANSLOCACIÓN ROBERSONIANA	55
ANORMALIDADES NO BALANCEADAS	57
DUPLICACIONES	58
DELECIONES	59
Nomenclatura	59
CROMOSOMA EN ANILLO	60
ISOCROMOSOMA	60
CITOGÉNÉTICA MOLECULAR	61
Hibridización genómica comparada	63

Capítulo 4. Citogenética animal **65**

Morfología de los cromosomas animales	67
Citogenética de algunas especies domésticas	67
Bovinos	70
Porcinos	73
Ovejas	75
Cabras	75
Protocolo general para la obtención de cromosomas de mamíferos	76
CULTIVO DE LINFOCITOS	77
Toma de muestra	77
Observaciones	79
Consejo	79
Literatura citada	80

Tablas

Tabla 1. Ciclinas, quininas, inhibidores de los complejos y fase del ciclo que regulan	19
Tabla 2. Morfología de cromosomas sexuales	69
Tabla 3. Translocaciones recíprocas en bovinos	71

Figuras

Figura 1. Etapas del ciclo celular.....	20
Figura 2. Diagrama de la cadena respiratoria y de la fosforilación oxidativa asociada	27
Figura 3. Proceso de fosforilación oxidativa	27
Figura 4. Aminoácido en condición Zwitterion	30
Figura 5. Estructura de los aminoácidos	32
Figura 6. Cromosomas humanos teñidos con Giemsa	33
Figura 7. Diferentes tipos de cultivos celulares	36
Figura 8. Cromosomas humanos, izquierda cromosomas BR, arriba derecha BQ	35
Figura 9. Estructura del cromosoma humano	38
Figura 10. Clasificación de morfológica de los cromosomas humanos	39
Figura 11. Cromosomas prometásicos humanos, muestra el cromosoma de replicación tardía	42
Figura 12. Cariotipo humano tinción G-, junto al Ideograma de cada cromosoma	43
Figura 13. Muestra la disposición de bandas dentro de un cromosoma metacéntrico, de acuerdo a la nomenclatura internacional	45
Figura 14. Anormalidades cromosómicas	47
Figura 15. Disyunción y no disyunción cromosómica	48
Figura 16. Espermatogénesis	49
Figura 17. No disyunción post cigótica	50
Figura 18. Inversión paracéntrica	52
Figura 19. Inversión pericéntrica	53
Figura 20. Cromosoma normal y derivado de inversión	54
Figura 21. Translocaciones recíprocas	54
Figura 22. Cuadivalente	55
Figura 23. Translocaciones robertsoniana	56
Figura 24. Duplicaciones	58
Figura 25. Deleción	59
Figura 26. Cromosoma en anillo	60
Figura 27. Isocromosoma	61
Figura 28. Muestra metafase con sondas Centroamérica para el cromosoma 1	63
Figura 29. Muestra un ejemplo de HGC (hibridización genómica comparada y FISH), con lo cual se puede observar que el paciente 5 tiene una microdeleción en la región subteloamérica del cromosoma 17	64
Figura 30. Cromosoma telocéntrico	67
Figura 31. Red de genes asociados con la diferenciación de sexo	68
Figura 32. Cariotipo bovino con Bandas G normal	70
Figura 33. Ejemplo de translocación bovina 13;26	72
Figura 34. Cariotipo normal de cerdo tinción Giemsa	74
Figura 35. Cariotipo normal de ovejas – tinción Bandas G.	75
Figura 36. Cariotipo normal de cabras teñido con bandas G.	76



CAPÍTULO 1

BREVE CONTEXTO HISTÓRICO A MODO DE INTRODUCCIÓN

La citogenética es una parte de la genética que estudia la estructura y cantidad de cromosomas de una célula, de un individuo o de una especie. Se ha utilizado para determinar la constitución cromosómica de especies animales y vegetales, y su aplicación en la clínica humana y veterinaria aún es de gran relevancia, debido al número importante de síndromes, patologías y anormalidades debidas a anormalidades cromosómicas.

La historia de la citogenética humana se remonta a los trabajos del profesor de anatomía Walther Flemming, quien publicó las primeras ilustraciones de los cromosomas humanos hacia el año 1882. Luego en el año 1888 Waldeyer, introduce el término cromosoma, el cual se deriva de la palabra griega “*cuerpo coloreado*”, ya que estos son observados al microscopio a partir de extensiones en láminas teñidas con colorantes específicos. Muchos científicos de la época tuvieron la idea de que la herencia podría estar contenida en estos cuerpos coloreados o cromosomas, lo que posteriormente dio lugar a la teoría cromosómica de la herencia formulada por Sutton y Boveri (1902-1903) (Martins, 1999).

En el año 1938, durante un simposio de medicina el endocrinólogo Henry Turner, describe el caso de siete jóvenes mujeres con tres rasgos típicos y comunes a todas, infantilismo sexual, cuello alado y *cubitus valgus*, el estudio citogenético desarrollado por Ford et al. (1959) demostró la ausencia de un cromosoma sexual y un cariotipo 45, X, dando origen a lo que se conoce como síndrome de Turner, el cual es un síndrome común de causa citogenética y que afecta a 1 de cada 2500 mujeres.

Las décadas de los 50, 60 y 70, se puede considerar prolíferas para el desarrollo de la citogenética humana. En 1956, aparece en la revista *Hereditas* el trabajo de Joe Hln Tijo e Illbert Levan, quienes a partir de cultivos de células embrionarias humanas, establecieron que el humano posee 46 cromosomas en las células somáticas normales. Hacia el año 1959 Jérôme Lejeune identifica la causa del Síndrome de Down como un pequeño cromosoma de más asociando directamente una particularidad cromosómica con una enfermedad, lo que hasta la fecha se había considerado como un defecto racial, se creía que los rasgos característicos del síndrome eran una regresión de ciertos rasgos inherentes a una raza particular. En años posteriores otros investigadores reportan otros síndromes relacionados con anomalías cromosómicas visibles en el microscopio Síndrome de Klinefelter (47, XXY), así como síndromes causados por trisomías como la del cromosoma 13 (síndrome de Patau) y el cromosoma 18 (síndrome de Edwards).

El año 1960 es de vital importancia para el desarrollo de la citogenética humana, ya que fue el año en que se publicó la técnica de cultivo de leucocitos de sangre periférica humana, lo que permitió obtener cultivos de cromosomas de muchas especies y observar sus cromosomas. Durante esa misma década fue posible estudiar el efecto mutagénico de algunas sustancias sobre la estructura de los cromosomas evidenciado a través de técnicas como el intercambio de cromátides hermanas (SCE), con la cual se puede observar que los cromosomas se pueden romper de manera espontánea o debido al efecto de ciertas sustancias sobre el ADN que los conforma, que sumado a problemas para reparar dichas alteraciones conlleva a la acumulación de modificaciones en la estructura y/o función de los cromosomas, que pueden ser visibles y detectables con técnicas de tinción de cromátides hermanas. Durante circunstancias normales SCE, no representa ningún cambio sobre el genoma, pero en condiciones anormales debidas a agentes químicos, físicos o virus, el número de SCE se aumenta considerablemente, respecto a células normales, de hecho, se reconoce la técnica de intercambio de cromátides hermanas como una de las técnicas más sensibles para reconocer posibles mutágenos y o cancerígenos.

Durante esta década se identificaron síndromes asociados a rupturas cromosómicas, así se identifican patologías como la anemia de Falconi y la ataxia telangiectasia, las cuales tienen considerable aumento en el conteo de SCE.

El reconocimiento de las bandas cromosómicas se inició hacia 1968, cuando Casperson y col. (1968) observaron el efecto de colorantes fluorescentes como

la Quinacrina, sobre los cromosomas metafásicos, los cuales al ser teñidos con dicho colorante produce bandas pálidas y brillantes. Este descubrimiento fue el comienzo de fructífera investigación, y como producto se obtuvieron protocolos, que a la fecha se utilizan para obtener los diferentes tipos de bandas como: Q, G, R, NOR y T.

En los años 70, el genetista colombiano Jorge José Yunis Turbay desarrolló las técnicas para obtener cromosomas en metafase temprana o prometafase, lo que aumento la longitud de los cromosomas observados en el microscopio y por ende el número de bandas, lo que brindó la posibilidad de identificar aberraciones cromosómicas de menor tamaño que las identificadas con cromosomas metafásicos (los cromosomas metafásicos permiten una resolución de cerca de 400 o 500 bandas en promedio, mientras que en cromosomas prometafásicos se pueden obtener más de 1000 bandas). La técnica de bandeado de los cromosomas tuvo gran impacto en la clínica, ya que se pudieron identificar un número importante de aberraciones cromosómicas con implicaciones en el fenotipo. Al aumentar el número de bandas obtenidas y detectadas por cromosoma, se hizo necesario un sistema universal de nomenclatura citogenética y hacia el año 1971 se realizó en Paris, la primera Conferencia, en donde se estableció un Sistema Internacional de Nomenclatura (ISCN- *International System Chromosome Nomenclature*), a partir de ese año se celebra una reunión cada determinado tiempo, para lograr acuerdos sobre las pautas de la nomenclatura cromosómica para describir todas las anormalidades, tanto numéricas y estructurales que se describen cada día en los laboratorios de citogenética. En especial a medida que las técnicas permiten identificar asociaciones cromosómicas complejas, que involucran múltiples cromosomas. La última edición de dicha reunión se llevó a cabo en el año 2016.

Durante la década de los ochenta y debido al auge de la biología molecular y el descubrimiento de técnicas como el *southern*, *northern blot* y otras técnicas de hibridación molecular, que permitían reconocer regiones específicas de los genomas de diferentes especies, utilizando sondas marcadas con diversos fluorocromos, comienza la fusión de la citogenética y la biología molecular, para dar paso a lo que en la actualidad se conoce como citogenética molecular. Una de las principales técnicas emergente, de dicha fusión es conocida como hibridación fluorescente in situ (FISH- *Fluorecent in situ hibridization*), cuyo mayor beneficio es obtener información de anormalidades estructurales y numéricas de los cromosomas, en cualquier fase del ciclo celular y por lo tanto permite reducir el

tiempo de emisión de resultados, aspecto muy importante en genética clínica, ya que permite confirmar síndromes específicos, sin tener que recurrir a un cultivo celular, que toma semanas y genera ansiedad en los pacientes. Inicialmente la técnica FISH se utilizó para reconocer genes o regiones específicas sobre los cromosomas, pero posteriormente se implementaron sondas de teñido de cromosoma completo, conocida como la hibridación multiplex *in situ* o M-FISH. Esta técnica se utiliza en el estudio de anomalías cromosómicas complejas, ya que define un cariotipo con veinticuatro colores, en donde cada uno de los cromosomas es detectado con una sonda de un color diferente.

En la década del 90 se plantea el proyecto Genoma Humano, cuya finalidad fue conocer la secuencia completa del genoma, titánica labor considerando la cantidad de nucleótidos que contiene, sin embargo, el proyecto se terminó con éxito y permitió utilizar la tecnología utilizada para obtener la secuencia completa genomas de plantas y animales. La gran cantidad de información de datos derivados de este proyecto permitió el desarrollo de la bioinformática, de la cual también se benefició la citogenética, ya que se necesitaban herramientas informáticas para el análisis de múltiples datos generados a partir de todos los proyectos genómicos. En el año 1999 investigadores del instituto Sanger, la Universidad de Oklahoma, la Universidad de Washington y la Universidad de Keio en Japón, reportaron la secuencia compuesta por 33.5 millones de nucleótidos que conforman el cromosoma 22 humano, el primero en ser secuenciado, de esta manera la humanidad contaba con la información de la secuencia completa de un cromosoma humano. A partir de allí los métodos de secuenciación han sido perfeccionados y reducidos costos.

En el año 2003, se conocieron los resultados del proyecto completo y a partir de ese momento comienza la era post genómica, con implicaciones muy importantes para la clínica y la investigación aplicada. Algunas técnicas desarrolladas en la era post genómica permiten obtener información del genoma completo, como la hibridación genómica comparada y los microarreglos. La hibridación genómica comparada detecta pérdidas y ganancias genómicas de regiones muy pequeñas. La tecnología de los microarreglos utiliza una superficie sólida que contiene una serie de fragmentos de ADN, los cuales se hibridan con ADN blanco o problema, y pueden determinar el nivel de expresión de genes específicos, como también variaciones específicas en sus secuencias. La posibilidad en la identificación está basada en medir los niveles de fluorescencia, a través de un analizador de imágenes.

En las siguientes décadas, seguido de la secuenciación del genoma humano, se han realizado muchos otros proyectos de secuenciación de los genomas completos de especies domésticas y de interés comercial, es así como en la actualidad se han secuenciado los genomas bovinos, porcinos, equinos, caninos y de algunas aves comerciales. Esta gran cantidad de información almacenada en bases de datos públicas genera la necesidad de tener herramientas para su análisis; es decir la información tiene que ser procesada y analizada, lo que permitió el desarrollo de la bioinformática, y colocó a disposición de la comunidad científica programas que permiten analizar y estudiar la información generada, no solo a nivel del ADN, sino también a nivel de RNA, de proteínas y metabolitos y rutas metabólicas, lo que nos posiciona en la era de las OMICAS.

Es así como los avances en bioinformática y genómica han permitido la reconstrucción de cariotipo de diferentes especies utilizando métodos bioinformáticos, construir sintenias ancestrales de secuencia dentro de diferentes grupos, utilizando secuencias ortólogas dentro de las especies. La citogenética *in silico* permitió la identificación de grupos de ligamiento entre grupos de animales muy distantes (Putnam et al. 2007).

Por lo anterior la citogenética sigue siendo importante para el estudio no sólo de las patologías humanas y animales, sino que aporta información fundamental sobre muchas especies aún no descritas las cuales necesitan ser caracterizadas desde la descripción en número y morfología de sus cromosomas, además, de acuerdo con muchos clínicos humanos y animales, el primer abordaje para las patologías genéticas debería ser de enfoque citogenético, ya que muchas de estas patologías se deben a micro deleciones, duplicaciones o involucran múltiples rearrreglos cromosómicos aún no descritos, los cuales pueden ser observados por técnicas citogenéticas, ya sea convencional o molecular.

Este libro tiene como objetivo exponer los conceptos principales que faciliten al lector la comprensión y análisis de resultados citogenéticos desde una perspectiva clásica y también desde una perspectiva moderna de la citogenética molecular.



CAPÍTULO 2

CICLO Y CULTIVOS CELULARES

Ciclo celular

La citogenética estudia la constitución cromosómica de una especie, de una célula o de un tejido particular, con el objetivo de determinar el número y la morfología de los cromosomas, estos son visibles en una etapa de la división celular, específicamente durante la metafase, ya que allí es donde ocurre la máxima condensación de los mismos. De tal manera, que para poder observarlos y describir sus particularidades, la mayoría de las veces se hace necesario realizar un cultivo celular y detener la división en metafase. La organización de los cromosomas, de acuerdo a su tamaño y posición del centrómero o constricción primaria se denomina cariotipo.

Para la realización de un cariotipo se utilizan células de diferente origen, de acuerdo al análisis a realizar y pretende establecer “*in vitro*” las condiciones necesarias para el metabolismo celular (reacciones catabólicas y anabólicas). La finalidad de un cultivo celular es que las células iniciales cumplan varios ciclos de divisiones celulares *in vitro*, para detener las divisiones en la etapa en que los cromosomas tienen mayor grado de compactación (metafase). De tal manera, el número de células iniciales en el cultivo cumplirán el ciclo celular y estarán bajo el complejo número de reacciones que lo regulan.

Un ciclo celular comprende el tiempo transcurrido entre una división y otra, durante este tiempo el citoplasma, los organelos celulares y el núcleo se modifican, duplican y crecen para alcanzar un tamaño definido a fin de dividirse. La duración del ciclo celular varía de acuerdo con el tipo de célula y durante este tiempo las células pasan de un estado de síntesis activa de proteínas, llamado interfase o G1 a uno en donde la maquinaria celular está concentrada básicamente en la duplicación del material genético, lo que garantiza que las dos células hijas contengan

la misma información genética en cantidad y calidad, este periodo es llamado fase de síntesis. Luego continua una etapa corta, en donde la célula corrige los posibles errores cometidos durante el proceso de síntesis, llamada fase G2, una vez culminada, la célula entra a la división celular (mitosis o meiosis) en donde los principales protagonistas son los cromosomas que sufren procesos de alta condensación y separación equitativa de sus cromátides.

En general las técnicas de rutina en los laboratorios de citogenética utilizan diversos tipos de tejidos como fuente primaria de células a cultivar. Así se pueden cultivar fibroblastos obtenidos de diferentes tipos de biopsias, médula ósea, restos ovulares, células del líquido amniótico y del trofoblasto, y, el más común; de sangre periférica. Además, como un cultivo celular es un reflejo de las condiciones in vivo, muchas veces es utilizado para purificar y cuantificar productos celulares y ARNs.

Todos los cultivos celulares buscan reflejar las condiciones naturales de la célula de la cual hace parte, además obtener un número importante de células con idéntico fenotípico y fisiología que las originales. Por lo tanto, cuando se realiza un cultivo celular las células metabolizan, crecen y se dividen in vitro, lo que equivale a realizar muchos ciclos celulares, como esta es una condición importante para obtener cromosomas de especies de mamíferos y otros animales, a continuación, se abordaran las principales características del ciclo celular y su regulación.

El ciclo celular, se puede definir como el proceso por el cual la célula monitorea las condiciones adecuadas para la división celular, por lo tanto, activa la maquinaria bioquímica para la replicación de ADN y la segregación cromosómica, regula cada uno de los momentos para que se pueda obtener, luego del ciclo, dos células genómicamente estables (Malumbres, 2011). Durante este tiempo se llevan a cabo todas las funciones metabólicas de la célula y la división celular, estas funciones pueden realizarse, gracias a una intrincada red de señalización celular, en donde interviene una estricta y compleja expresión de genes y proteínas.

De acuerdo con esta señalización, se determina el destino final de la célula cuando sale del ciclo celular; en este sentido la célula puede seguir cuatro vías posibles: senescencia (envejecimiento celular), apoptosis (muerte celular programada), diferenciación celular y proliferación celular, estas dos últimas importantes para el desarrollo y crecimiento embrionario.

Todas las células sufren divisiones celulares: las células somáticas, lo hacen constantemente, por ejemplo, la piel se renueva diariamente, las células sanguíneas periódicamente, los animales y las plantas crecen por divisiones celulares. De tal manera, que las divisiones celulares son un mecanismo natural, para producir nuevas células, tejidos e individuos. Las divisiones celulares pueden ser de dos tipos: divisiones mitóticas, se llevan a cabo en las células somáticas y divisiones meióticas, se llevan a cabo en células precursoras y formadoras de los gametos.

Dentro de un ciclo celular se identifican dos grandes periodos: la interfase y la división celular. La interfase se divide en varias etapas, G1 (esta G es derivada de la palabra inglesa gap, que significa espacio o intervalo entre), S de síntesis, G2 y división celular. La división celular a su vez tiene diferentes etapas: profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis.

Las etapas G1 y G2, son importantes para la célula, ya que este lapso se utiliza para monitorear las condiciones internas y externas, así la célula asegura, que las condiciones sean propicias para las etapas de síntesis y de división celular. Si las condiciones extracelulares no son favorables, la célula puede retrasar el comienzo de la G1 y de hecho puede mantener un estado de reposo conocido como G0, estado en el cual las células pueden permanecer por incluso años. Cuando las condiciones extracelulares son favorables, los nutrientes, las señales de actividad y división son reconocidas, entonces la célula activa el metabolismo hacia la fase G1 o de inicio, conocido como punto de restricción en las células de mamíferos.

El ciclo celular, es regulado por mecanismos muy precisos con el objetivo, por ejemplo, de prevenir el crecimiento maligno, pero de la misma manera necesita ajustar el mecanismo para producir células diferenciadas que formaran los tejidos y los órganos.

La regulación del ciclo celular tiene una alta precisión y especificidad a nivel de interacción entre proteínas y expresión diferencial de las mismas durante las diferentes fases del ciclo celular. El avance del ciclo celular en sus diferentes etapas es llevado a cabo por una serie de complejos proteínicos que se asocian en heterodímeros formados por dos tipos de proteínas denominadas ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), las proteínas CDKs son importantes reguladores del ciclo celular, las levaduras tienen una sola CDK (Cdk1), mientras que los metazoarios tienen nueve diferentes, cuatro de estas son críticas para la regulación del ciclo, para las demás

aún no se ha encontrado un rol específico dentro del ciclo celular. Así la regulación del ciclo está dada principalmente por la interacción entre quinasas y ciclinas. Este mecanismo activa o inactiva la progresión del ciclo celular.

Los procesos que se llevan a cabo durante el ciclo celular están altamente coordinados intracelular y extracelularmente. En cada ciclo de división las células monitorean las condiciones que garantizan una división exitosa. Un primer paso para que una célula entre en el ciclo celular es la activación de la transcripción y traducción de las proteínas necesarias para todos los procesos que involucra el ciclo. La maquinaria bioquímica para la replicación de ADN se activa, al igual se sintetizan las proteínas necesarias para hacer posible la segregación cromosómica, la cual se regula de manera estricta. Los mecanismos que aseguran la fidelidad del resultado de división celular se conocen como puntos de chequeo o *checkpoit*, se definen como una serie de eventos bioquímicos que “*verifican*” los procesos que finalizan cada una de las fases dentro del ciclo.

La regulación del ciclo celular, se estudió primero en levadura (Nurse, 2000), en estos organismos se encontró el gen denominado Cdc (división de ciclo celular); Cdc28 en *Saccharomyces cerevisiae* y Cdc2 en *Schizosaccharomyces pombe*, estos genes se expresan como una proteína quinasa, cuya función es fosforilar una serie de proteínas blanco, en los de residuos S (serina) y T (treonina) y de esta manera regular la actividad de las mismas (Gautier, 1988). En los mamíferos existen también estos genes, sin embargo, están ordenados en familias y además de la función de regulación, también están involucrados en la homeostasis de los tejidos y algunas enfermedades humanas (Malumbres, 2007).

En humanos y en general en organismos multicelulares, las quinasas se encuentran activas durante los primeros estados del desarrollo del embrión, con importantes funciones en la regulación de la organogénesis. Durante el desarrollo embrionario las células se encuentran en activa división mitótica, de tal manera que se entiende que los requerimientos primarios son la activación de la transcripción y traducción, con ello las células expresan, sintetizan genes necesarios para controlar las divisiones celulares, sin embargo, esta división celular debe mantenerse bajo un estricto control, ya que podría dar como resultado procesos patógenos. Generalmente los mecanismos de represión son tejido específico, sin embargo, existe uno general representado por la proteína denominada pRb (proteína de retinoblastoma), esta proteína junto con otras como p107 y la p130,

regulan negativamente varios genes que intervienen en el ciclo celular (Malumbres, 2011). La activación mediada por la pRb, actúa en colaboración con complejos proteínicos como SWI/SNF, proteínas del grupo *policoms*, proteínas de la familia de factores de transcripción E2F y utiliza procesos como desacetilación de histonas y metilasas.

Existe a su vez un mecanismo molecular de proteínas que son responsables de la inactivación de la Rb, esta represión es realizada a través de la activación de las quinasas dependientes de otras proteínas denominadas ciclinas (Cdks), que se activan solamente en momentos específicos del ciclo celular y son dependientes de quinasas. Al fosforilarse la pRb, se inactiva y por lo tanto permite la expresión de genes necesarios para que la célula se divida adecuadamente.

Acontece la activación de las ciclinas y la subsecuente fosforilación por parte de las quinasas de muchas proteínas necesarias para procesos como la replicación de ADN durante la fase S. Una quinasa necesaria para el proceso de S, es la Cdc7, que se requiere para la replicación de los cromosomas, indispensable para que el ciclo celular avance de G1 hacia S. Posteriormente, durante G2, otras Cdk (ciclinas dependientes de quinasas) y otras quinasas son necesarias para que el ciclo celular entre en mitosis, al regular la expresión de proteínas que intervienen en la formación del huso mitótico y condensación de los cromosomas, dentro de las cuales se encuentran familias de proteínas llamadas Aurora y semejantes a Polo. Sin embargo, la principal proteína para que la célula entre en mitosis es la ciclina Cdk1, esta proteína activa importantes proteínas necesarias para que la célula avance de G2 a M, ya que su acción permite cambios a nivel del citoplasma, desarticulación del aparato de Golgi, ruptura de la membrana nuclear y condensación de los cromosomas (Malumbres, 2005).

Las ciclinas, de otro lado, son un grupo de proteínas encontradas en la mayoría de los eucariontes y ampliamente descritas en humanos, son clasificadas según la fase del ciclo en que éstas funcionan. Se encuentran cuatro tipos básicos de ciclinas y cada una de ellas, asociados a una fase específica del ciclo celular así: ciclinas G1, ciclinas de G1/S, ciclinas de S y ciclinas de M. La expresión de las ciclinas es baja en general durante el ciclo celular, pero la máxima expresión de cada una de las mencionadas anteriormente se asocia con la fase del ciclo celular, en donde cumplirán su papel de regulación. La siguiente tabla muestra una lista de las principales ciclinas y quinasas y su función dentro del ciclo celular.

Tabla 1. Ciclinas, quinasas, inhibidores de los complejos y fase del ciclo que regulan. Fuente: Tomado de Rodríguez L y col. 2014. *El ciclo celular regulación e importancia en el cáncer. Biotecnología Aplicada 2004,21:60-69.*

Ciclinas	Quinasas	Inhibidores	Fase del ciclo que regulan
Ciclina A	Activa CDK2 Y CDC2	p21, p27	S a M
Ciclina B1	Activa CDC2	p21, p27	Progresión a M
Ciclina B2	Desconocido	Desconocidos	Progresión a M
Ciclina C	Activa CDK8	p21, p27	Progresión G1
Ciclina D1	Activa CDK4	p15, p16, p18, p19, p21, p27	G1
Ciclina D2 y D3	Activa CDK6	p15, p16, p21, p27	G1
Ciclina G1 y G2	Reparación de ADN	Desconocidos	S
Ciclina H	Activa CDK7, regula la Transcripción y reparación del ADN	Desconocidos	S
Ciclina I	Desconoce	Desconocidos	Desconocido
Ciclina K	Regulación de la transcripción y reparación del ADN	Desconocidos	Desconocido
Ciclina T1 y T2	Activa CDK9	Desconocidos	Desconocido

En G1 la célula es activa en procesos celulares y metabolismo, por lo tanto, sintetiza proteínas activamente, ya sean enzimas o proteínas estructurales, por lo tanto, también se sintetizan las ciclinas A, E y D, las cuales se unen específicamente a sus respectivas proteínas dependientes de ciclina (CDKs), los complejos de unión A, E y D1 se mantienen en el núcleo. La progresión de G1 a S, está determinada por la formación de los complejos de heterodimeros: ciclina D/CDK4 o 6 y el complejo ciclina E/CDK, seguido del complejo ciclina A/CDK2, una vez formados estos complejos, la célula avanza a fase S. Existe, además, una proteína adicional que regula la progresión G1-S denominada proteína Rb o del retinoblastoma (Rb), descubierta en individuos con tumor maligno de la retina o retinoblastoma, la cual es una proteína supresora de tumor que juega un papel importante en el control de las divisiones celulares.

Todos los organismos tienen como fin biológico reproducirse y transmitir su información genética a la siguiente generación, por lo tanto, las células durante un periodo de tiempo de su ciclo celular reservan su potencial para sintetizar la molécula de ADN, que contiene la información genética y que va a ser transmitida idéntica a la siguiente generación. Una vez sintetizado todo el material genético

de la célula, esta cuenta con un corto periodo de tiempo en donde revisa lo sintetizado y corrige errores; periodo conocido como G2. El ciclo celular completo se ilustra en la siguiente gráfica.

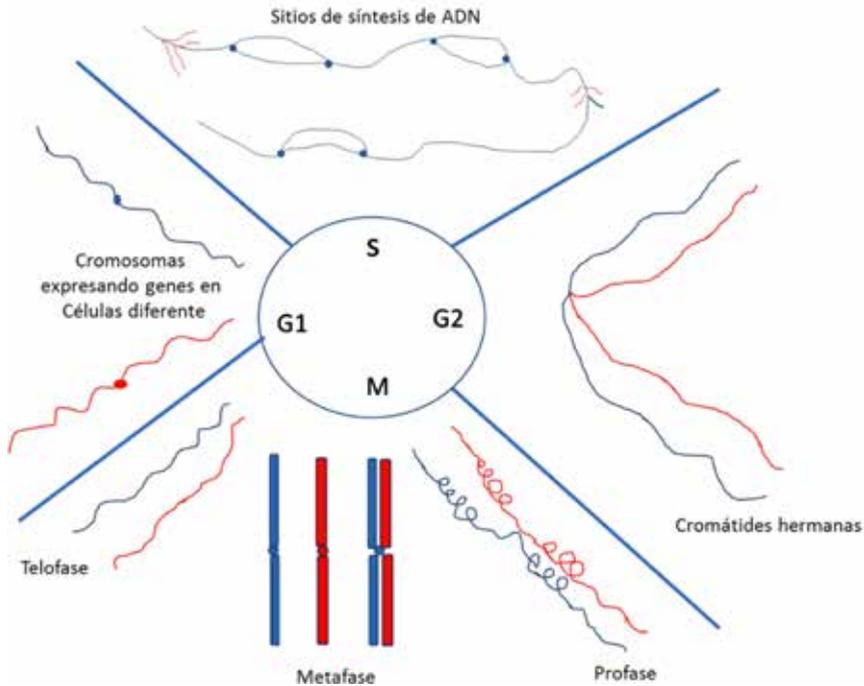


Figura 1. Etapas del ciclo celular Fuente: producción propia

Puntos de chequeo del ciclo celular

El primer punto de control del ciclo celular ocurre al final de la fase G1, antes de entrar en la fase S, se conoce como punto de restricción que en definitiva es el principal punto de control celular, después de la activación de este mecanismo, la mayor parte de las células se detienen y entran en una fase de reposo denominada G0 caracterizado por un estado de progresión latente, que con frecuencia es asociado a la falta de nutrientes (figura 1).

Importancia del chequeo durante G2 y las proteínas moduladoras ATM, ATR y p53

La variación de la secuencia de ácidos nucleicos en gametos es fundamental para potencializar la variabilidad genética y asegurar la aparición de modificaciones

que permitan la acción de la selección natural. Sin embargo, en células somáticas los cambios en la secuencia pueden causar anomalías que afectan tejidos y órganos, así una única alteración puede producir una modificación dentro de la secuencia o estructural del gen y desencadenar una serie de variaciones que culminen con la generación de enfermedades generalmente, producidas por la malformación de una proteína. Existen muchos factores mutagénicos, que alteran la secuencia del ADN, uno de ellos es la reactividad misma de las bases nitrogenadas, las cuales pueden interactuar con algunos químicos como sustancias fenólicas o bromuro de etidio, cuya consecuencia es la modificación de la estructura, otra posibilidad es la exposición a radiación ionizante, lo que conlleva a la formación de dímeros de timina.

La aparición de este tipo de errores expresados, generalmente, como síndromes y cáncer, está asociado con deficientes mecanismos de corrección de lesiones sobre el ADN, finalmente cuando el mecanismo de reparación es ineficiente, el destino de la célula defectuosa es la apoptosis o muerte celular programada, lo que garantiza que una célula altamente defectuosa, que no logró repararse, muera antes de su reproducción.

Asimismo, el daño en el ADN en células con los mecanismos de chequeo funcionales provoca que el ciclo celular se detenga principalmente por la acción de proteínas fundamentales para el proceso entre las que se destacan las quinasas ATM, ATR y p53 (Sun et al, 2017). Existe dentro de este complejo mecanismo de regulación del ciclo celular, una proteína esencial conocida como p53, esta proteína ha sido llamada el guardián del genoma, ya que una de sus funciones, es la de chequear, si dentro del genoma existen mutaciones o alteraciones, la detección conlleva a desencadenar mecanismos de reparación de daños, en caso de detección, activar el mecanismo de apoptosis, o permitir el avance y finalización del ciclo celular (Lane, 1992). La quinasa ATM es la principal responsable del mecanismo de activación de la proteína p53, mientras que la quinasa ATR tiene el papel de sensor de daño en el ADN, específicamente es encargada de reconocer radiaciones ionizantes, luz ultravioleta.

En células normales, el nivel de la proteína p53 es bajo debido a que su asociación a Mdm2 favorece su constante degradación por proteólisis en el proteosoma. Cuando p53 es fosforilada se libera de Mdm2 y su vida media aumenta y así mismo su concentración intracelular aumentando la posibilidad que realice actividad

como factor de transcripción. El factor de transcripción p53 entonces activa diferentes mecanismos que pueden llevar a detención del ciclo celular, activación de enzimas de reparación del ADN, entrada en senescencia o activación de la apoptosis (Binayke et al. 2019).

Punto de chequeo en G1/S

Un principal objetivo de la detención del ciclo celular entre G1/S ocurre cuando el sistema “reconoce” el daño sobre el ADN y se evita su replicación. El detener el ciclo celular se debe a que con p53 activa, se transcriben algunos inhibidores de proteínas que intervienen de manera directa en la síntesis de ADN. Esta pausa en el desarrollo del ciclo celular permitiría reparar los daños presentes en el ADN y en su defecto, si es necesario, la toma de decisiones, hacia el destino final de la célula. Si el daño es reparado de manera correcta, p53 estimula la expresión de Mdm2 y así permite la progresión del ciclo celular, si por el contrario el daño no es reparado el aumento de p53 inducirá apoptosis o senescencia.

Punto de chequeo en G2/M

El punto de chequeo G2/M evita que las células entren a mitosis. Las células que han pasado por el punto de chequeo G1/S, pero posteriormente evidencian daños, son detenidas en este punto, usualmente esta situación se debe a que agentes externos como radiación o agentes químicos han dañado el ADN posterior a la revisión hecha en G1/S. En estos casos ATM fosforila a la proteína hChk2 que es necesaria para el mantenimiento en G2/M. hChk2 fosforilada inhibe a la fosfatasa hCdc25C, en este estado la proteína queda impedida para activar el complejo ciclina B1-CDK1, que es necesario para promover la entrada en mitosis.

Existe otro mecanismo de control del ciclo celular, que involucra la organización de las proteínas que forman el huso mitótico, el cual tiene dos polos en los que se encuentran anclados los cromosomas (constituidos en este momento como cromátides hermanas unidas por las proteínas cohesinas), la proteína ciclina Cdk11, detecta si la conformación del huso mitótico se ha realizado de manera correcta; es decir, que todos los cromosomas estén asociados a dicho huso de manera bipolar conformado una alineación en la placa metafásica conformado lo que los citogenetistas han denominado punto SAC (*Spindle Assembly Checkpoint*) (Hu, et al. 2003), este punto es importante ya que se pueden producir fallas en

la alineación y segregación de los cromosomas, que podrán llevar segregaciones erróneas y posteriores aneuploidías. Cuando todos los cromosomas se localizan de manera simétrica en la placa metafásica, el punto de chequeo se inactiva, de manera que se produce la degradación de las cohesinas que hasta el momento mantenían unidas las cromátides hermanas; así, se posibilita la entrada a anafase dando como resultado la culminación del ciclo.

Las cohesinas son una serie de proteínas necesarias para mantener unida a las cromátides hermanas. La separación de estas cromátides (producto de la síntesis del cromosoma) ocurre durante la anafase de la de la segunda división meiótica. Para que las cromátides hermanas se separen es necesaria la acción de diferentes complejos proteínicos. El más importante de estos, es el complejo promotor de anafase (APC), este complejo es activado por la unión de una proteína similar a una CDK, llamada CDC20 (cdc=ciclo de división celular), una vez se ha activado, el APC se encarga de marcar a diversas proteínas para que se degraden, una de ellas es la securina, que inactiva a la separasa, que es la proteína encargada de inactivar a las cohesinas, eliminando así las uniones entre cromátides hermanas.

CULTIVOS CELULARES

Un cultivo celular es un proceso por el cual las células de diferente origen se aíslan del tejido u órgano original y se mantiene en crecimiento continuo bajo condiciones físico químicas controladas en el laboratorio (Souza et al., 2016).

El embriólogo estadounidense Harrison Ross, fue el primero en desarrollar técnicas de cultivo de células en el año 1907. En su laboratorio de la Universidad de Yale, aisló y obtuvo crecimiento de células de embriones de rana, reconoció la importancia de esterilizar todo el material utilizado en los cultivos y gracias al desarrollo de estas técnicas, se reconocieron múltiples posibilidades de aplicación de los cultivos celulares en diferentes campos del conocimiento, como la bacteriología, embriología, fisiología e histología, así como las derivadas de estos, tal como la producción de anticuerpos monoclonales, vacunas y uso y aplicación de muchos fármacos (Rodríguez, et al., 2014). Luego hacia el año 1912, Carel define la primera línea celular, derivada de fragmentos de explantes de embrión de pollo (Ryan, 2005). A partir de ese momento, se comienzan a producir diversas líneas celulares en el laboratorio como L929, HeLa, CHO, BHK21, etc., este desarrollo permitió avances significativos en investigación sobre todo del cáncer.

Los cultivos celulares pueden ser sólidos o líquidos, dependiendo del tipo de órgano o tejido de donde se derivan las células. Los primeros involucran la disgregación mecánica o enzimática de los órganos o tejidos, para obtener células individuales que son sembradas en monocapa, los cultivos líquidos son generalmente de sangre periférica y allí se cultivan linfocitos, los cuales sufren subsecuentes divisiones celulares in vitro.

Existen diferentes tipos de tejidos de cultivos que se realizan de rutina en muchos laboratorios de genética tanto animal como vegetal, generalmente se pueden dividir en cultivos primarios, los cuales provienen de órganos y tejidos, se cultiva una mezcla de células de estos y se utilizan a corto plazo para diferentes propósitos y los cultivos, en donde se establecen líneas celulares, en los cuales, a través de un proceso de subcultivos, preservación y caracterización, se obtiene y establece el crecimiento de una línea celular específica.

Algunos tipos de cultivos celulares útiles en la obtención de cariotipos

Cultivo de linfocitos. En este cultivo se estimula la proliferación de linfocitos con mitógenos específicos y luego se recolectan las células que responden con una alta división celular deteniendo las células en metafase. Se utiliza de rutina en los laboratorios de citogenética, es un cultivo de corta duración, no necesita equipos sofisticados para su realización, no requiere mantener condiciones de intercambio de gases complejas.

Cultivo de médula ósea. Es de utilidad para la caracterización citogenética de leucemias. Existen algunos marcadores citogenéticos en diferentes tipos de cáncer; por ejemplo, en la leucemia mieloide crónica se ha definido un marcador cromosómico de buen pronóstico caracterizado como una translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22 y conocido con el nombre de cromosoma *Philadelphia*. Requiere para la toma de la muestra de un médico y de condiciones clínicas apropiadas, también se necesita mantener requerimientos de intercambio de gases específicas para el crecimiento celular.

Otras muchas anomalías citogenéticas relacionadas con leucemias y otros tipos de tumores sólido se han descrito.

Algunos otros ejemplos:

- Leucemia Aguda no linfocítica: translocación entre el cromosoma 8 y el 21.
- Retinoblastoma deleción en el cromosoma 13.
- Linfoma de Burkitts translocación entre el cromosoma 9 y el 14.
- Teratoma testicular: duplicación del brazo corto del cromosoma 12 (isocromosoma p).

Cultivo de líquido amniótico. Se utiliza en diagnóstico prenatal para definir, no solo síndromes cromosómicos estructurales y numéricos, sino también errores innatos del metabolismo o aquellas patologías de bioquímicas, por acumulación o falta de un metabolito específico. Para obtener muestra de líquido amniótico, en humanos, la muestra debe tomarse entre la decimocuarta y la décimo octava semana de gestación, se requiere toma de muestra por parte de un médico bajo ecógrafo y puede representar un riesgo de aborto.

También pueden ser cultivadas otros tipos de células como células de trofoblasto, vellosidades coriónicas y restos ovulares especialmente en mujeres abortadoras habituales. Este tipo de cultivos son igualmente aplicados en todos los mamíferos.

Cultivo de fibroblastos. Son utilizados en citogenética de diferentes tejidos y órgano, requiere de matrices específicas para el crecimiento celular y condiciones para mantener un adecuado intercambio gaseoso, entre el cultivo y el medio.

En citogenética animal, generalmente de especies no mamíferas, no se hace necesarios obtener cultivos celulares, sino que se utilizan algunos órganos que tienen alta tasa de proliferación, en los peces, por ejemplo, se utilizan celular como las agallas o los riñones.

Los cultivos celulares para análisis citogenéticos ofrecen una manera fácil y económica para la obtención de material biológico, en general no tienen requerimientos nutricionales adicionales y las condiciones fisicoquímicas se pueden mantener estables por lo menos durante 72 horas, garantizando suficientes divisiones celulares para obtener cromosomas. Existen también desventajas en algunos tipos de cultivos celulares, cuando son mantenidos por largo tiempo en condiciones de laboratorio, pueden aparecer anomalías citogenéticas en las líneas celulares derivadas, otra desventaja de algunos cultivos celulares es que

requieren nutrientes y condiciones de oxígeno específicas que muchas veces no son fáciles de mantener o resultan muy costosas.

CONDICIONES GENERALES DE UN CULTIVO CELULAR

Cada tipo de célula a cultivar tiene requerimientos específicos de acuerdo con sus características fisiológicas. Sin embargo, existen condiciones fisicoquímicas que todas las células necesitan para mantenerse vivas. El objetivo de los cultivos celulares utilizados para los análisis citogenéticos es mantener estas condiciones lo más parecidas a las condiciones naturales de las células que se utilizan para obtener los cariotipos. In vitro, el mantener un ambiente adecuado, los nutrientes, las hormonas y el sustrato es fundamental para permitir la expresión de las funciones del metabolismo normal y especializado de cada uno de los tipos de células, muchos tejidos requieren de condiciones altamente específicas para su desarrollo y crecimiento. A continuación, se realiza una descripción de las condiciones mínimas necesarias para permitir crecimiento celular in vitro y los requerimientos necesarios para que exista metabolismo y crecimiento celular en el laboratorio. Las condiciones fisicoquímicas del medio se refieren a todos aquellos compuestos y moléculas que establecen una homeostasis en las concentraciones de gases como O_2 y CO_2 que permiten mantener un pH neutro, requerido por la mayoría de las células.

Concentración de oxígeno

El oxígeno es fundamental como agente oxidante y aceptor final de electrones del proceso de respiración donde el carbono de los carbohidratos es oxidado hasta CO_2 . En este sentido es importante destacar que estados de oxidación del carbono en hidratos de carbono es negativo y por el proceso de transferencia de electrones propios de la respiración termina con un estado de oxidación positivo, es decir ha cedido electrones, en el proceso el oxígeno que entra al sistema como una molécula diatómica (O_2) sale del proceso ligado al carbono que ha perdido electrones por lo cual es común escuchar que el oxígeno en procesos de respiración termina siendo el aceptor final de electrones. Se concluye que el proceso de respiración es el proceso por el cual carbono con estado de oxidación negativo pierde electrones hasta quedar con carga positiva en un proceso de obtención de energía metabólica donde el oxígeno se convierte en aceptor final de electrones en un proceso que trae como consecuencia formando ATP y agua (Figura 2).

Por lo general, tensiones bajas de oxígeno son suficientes para mantener la mayoría de los cultivos celulares en monocapa, para cultivos líquidos de sangre periférica condiciones atmosféricas bastan. Sin embargo, algunos tipos de cultivos de órganos requieren de concentraciones más altas de O_2 (Lee-Parsons & Shuler, 2005; Trung et al., 2006).

La concentración de gases puede ser influenciada por varios factores entre los que cabe destacar temperatura, y composición de los gases de alimentación por lo que lo recomendado es que estas variables sean constantes. El flujo de aire en un cultivo celular, en primer lugar, debe asegurar la concentración de oxígeno necesario (hay que tener en cuenta que las concentraciones altas de oxígeno también puede tener acción inhibitoria y favorecer la oxidación de los componentes del cultivo), en segundo lugar incrementa la homogenización del medio de cultivo que resultará en un pH estable (exceso de CO_2 en solución favorece la formación de ácido carbónico) y finalmente es responsable de la desorción de metabolitos volátiles como el CO_2 y el etileno (Juárez-Sánchez et al., 2002; Lee-Parsons & Shuler, 2005; Trung et al., 2006; Huang & Chou, 2000).

Para optimizar la transferencia de oxígeno dentro de un cultivo celular, se puede incrementar la velocidad de agitación, la tasa de aireación o su concentración en el aire suministrado. Sin embargo, las dos primeras estrategias presentan algunas desventajas ya que se aumenta el consumo de potencia (Trung et al., 2006), se genera mayor estrés de corte sobre las células (Honda et al., 2002), se puede presentar la formación de espuma lo cual desnaturaliza proteínas y puede darse el arrastre de compuestos volátiles importantes en el metabolismo secundario. De otro lado, el incremento de la concentración de oxígeno en la corriente de entrada implica un aumento en los costos de operación, lo que debe considerarse en caso de seleccionar esta estrategia para la aplicación industrial desde una perspectiva de ingeniería de cultivos.

Otros Gases

Otros gases de relevancia para cultivos celulares son el etileno (para cultivos de células vegetales) y el dióxido de carbono debido a que su concentración en sistemas vivos estimula la producción de metabolitos secundarios (Jeong et al., 2006). Con el fin de mantener sus concentraciones en el medio de cultivo se ha empleado sistemas de reinyección de aire con la corriente de entrada (Huang et al., 2002) y suministro de estos compuestos mezclados con aire (Jeong et al., 2006; Arias et al., 2009).

La respiración y fosforilación oxidativa asociada se realiza en la mitocondria (Figura 3), razón por la cual toda célula eucariota tiene mitocondrias.

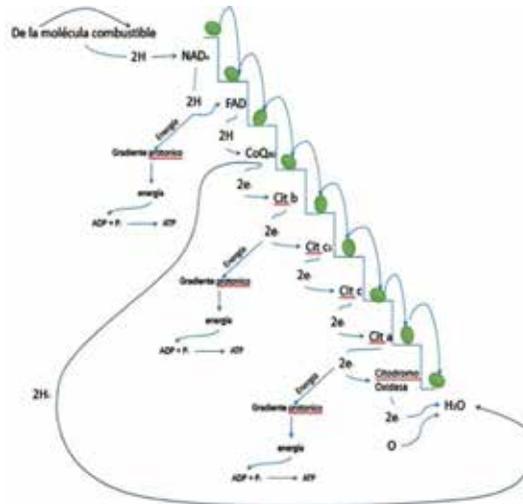


Figura 2. Diagrama de la cadena respiratoria y de la fosforilación oxidativa asociada.

Fuente: producción propia

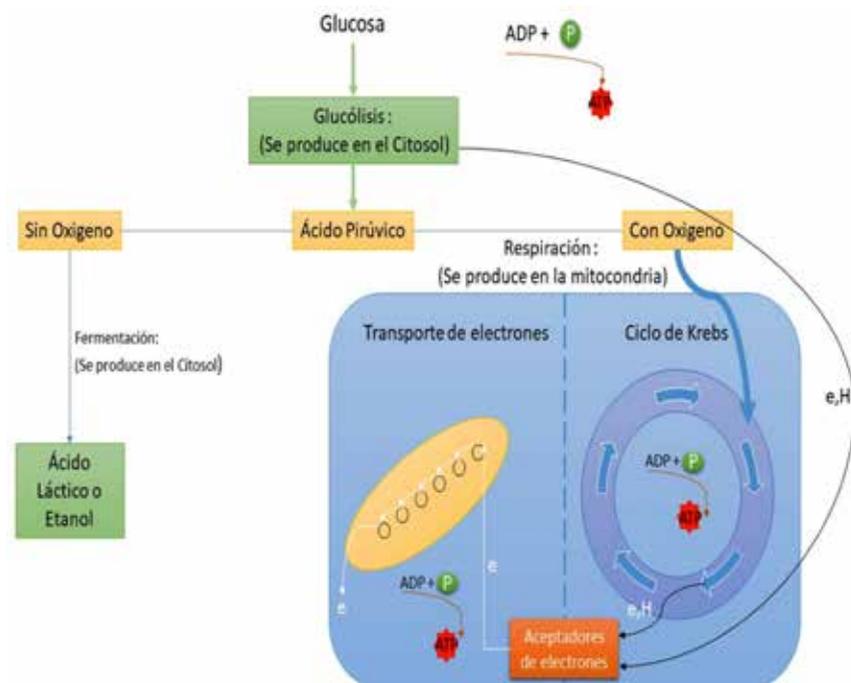


Figura 3. Proceso de fosforilación oxidativa.

Fuente: producción propia

El CO_2 está involucrado en la regulación del pH controlando las concentraciones de bicarbonato. La concentración de CO_2 atmosférico regula la tensión de CO_2 disuelto en función de la temperatura, esto produce H_2CO_3 el cual se disocia en H^+ y HCO_3^- . Como el HCO_3^- tiene una baja constante de disociación, tiende a reasociarse dejando el medio ácido. El resultado final del incremento del CO_2 atmosférico es la baja del pH. Para regular el pH de un cultivo celular se utilizan diferentes buffers adicionados en el medio de cultivo, los más utilizados de estos son el bicarbonato de sodio y el hepes.

El medio de cultivo debe contener los nutrientes necesarios para el metabolismo y crecimiento celular. Dentro de ellos están incluidos aminoácidos esenciales y no esenciales, glutamina que sirve como fuente de energía y carbono, vitaminas que varían dependiendo del tipo de cultivo y células utilizadas. En general todos los medios de cultivo incluyen vitamina del tipo B. Las sales que contribuirán con la osmolaridad del medio son iones de Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} y SO_4 , PO_4 , HCO_3^- .

Un cultivo celular, además del medio contiene suero, aporta las proteínas necesarias que sirven como transporte de minerales, ácidos grasos y hormonas. Los sueros más frecuentemente usados en cultivos de tejidos son el suero bovino fetal, el suero de caballo, y el suero humano. Los factores esenciales de este que juegan un papel importante en el cultivo celular son factores de adhesión como la fibronectina, péptidos tales como la insulina, el factor de crecimiento derivado de plaquetas y el TGFB un factor de crecimiento derivado de tumores, pero extraíble también de las plaquetas, que regulan el crecimiento y la diferenciación celular. Además de nutrientes esenciales tales como minerales vitaminas, ácidos grasos, metabolitos intermedios y hormonas que regulan el transporte transmembrana.

Algunos tipos de cultivo requieren factores de crecimiento específicos. Uno de los más conocidos es la fitohemaglutinina, un mitógeno extraído del frijol común *Phaseolus vulgaris* y que se utiliza en las técnicas citogenéticas para la estimulación de linfocitos.

La temperatura a la cual las células estimuladas deben crecer es otro de los factores fundamentales ya que afecta directamente el crecimiento celular. La temperatura a la cual crecerán las células depende de la temperatura corporal del animal del cual fueron obtenidas las células. Así la temperatura recomendada para la mayoría de las líneas celulares derivadas del hombre y de animales poiquilotermos es de 36.5 grados centígrados.

El pH indica la concentración de iones hidrógeno $[H]^+$ también llamados hidrogeniones presentes en un sistema acuoso. La sigla significa: potencial de hidrógeno o potencial de hidrogeniones (*potentia hydrogenii*). Definido por el danés Sorensen, para fines prácticos, como el opuesto del logaritmo en base 10 o el logaritmo negativo, de la actividad de los iones hidrógeno. Para aclarar, y a modo de ejemplo, una concentración de $[H_3O^+] = 1 \times 10^{-7}$ M, podría expresarse como 0.0000001 M, que aplicando la definición correspondería a una solución con un pH de 7, ya que $pH = -\log [10^{-7}] = 7$.

El pH es de gran importancia para los procesos fisiológicos debido a que de él dependen reacciones bioquímicas como las de la cadena respiratoria y de la fosforilación oxidativa asociada Figura No. 3. Por otra parte, el pH afecta de una manera directa la estructura terciaria de las proteínas. La unidad estructural de las proteínas son los aminoácidos que tienen características peculiares que hacen que la estructura total (la proteína) pueda cambiar en función del pH. Esto se debe a que la estructura de un aminoácido en un medio ácido, el grupo carboxilo no se encuentra disociado completamente, mientras que en disolución básica se encuentra totalmente disociado. Para el grupo amino, ocurre todo lo contrario; en un pH alto no se encuentra disociado y en un pH bajo se encuentra disociado, es por esto que los aminoácidos tienen tanto propiedades ácidas y básicas dependiendo del medio donde se encuentren. Por esta razón es común encontrar las palabras anfótero y zwitterion cuando se estudian las proteínas en un contexto de pH. Por un lado, el concepto de anfótero se refiere a moléculas que tienen la capacidad de actuar como ácidos o como bases, en la gráfica No. 3, se muestra cuando un aminoácido se comporta como ácido, tiende a liberar iones Hidrógeno H^+ , es decir cuando pasa de condición catiónica para la zwitterionica y básica cuando tiende a recibir iones Hidrógeno H^+ es decir cuando pasa de condición aniónica para zwitterionica favoreciendo la adquisición de carga positiva (Figura 4).

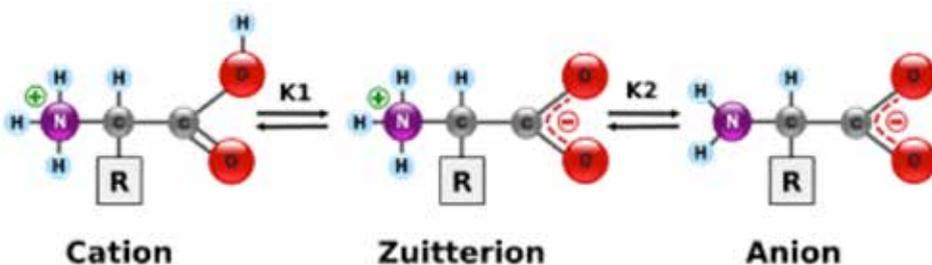


Figura 4. Aminoácido en condición Zwitterion.

Fuente: producción propia

El grupo R que aparece en la gráfica se refiere a la cadena lateral del aminoácido, este grupo también puede tener características dependiendo del pH cuando el grupo R contiene alguna estructura que pueda protonarse y desprotonarse, dependiendo de la cadena R, los aminoácidos cambian de estructura y así mismo de nombre tal como se muestra en la figura No.5. Las proteínas son una construcción de estos 20 aminoácidos, dependiendo de la composición de la proteína, es decir de los tipos y proporcionalidad que tengan los aminoácidos dentro de la estructura estará diseñada para realizar funciones diferentes. Por ejemplo, las histonas tienen gran cantidad de aminoácidos positivos como lisina y arginina (aminoácidos Básicos) crucial para los procesos de enrollamiento del ADN de carga negativa.

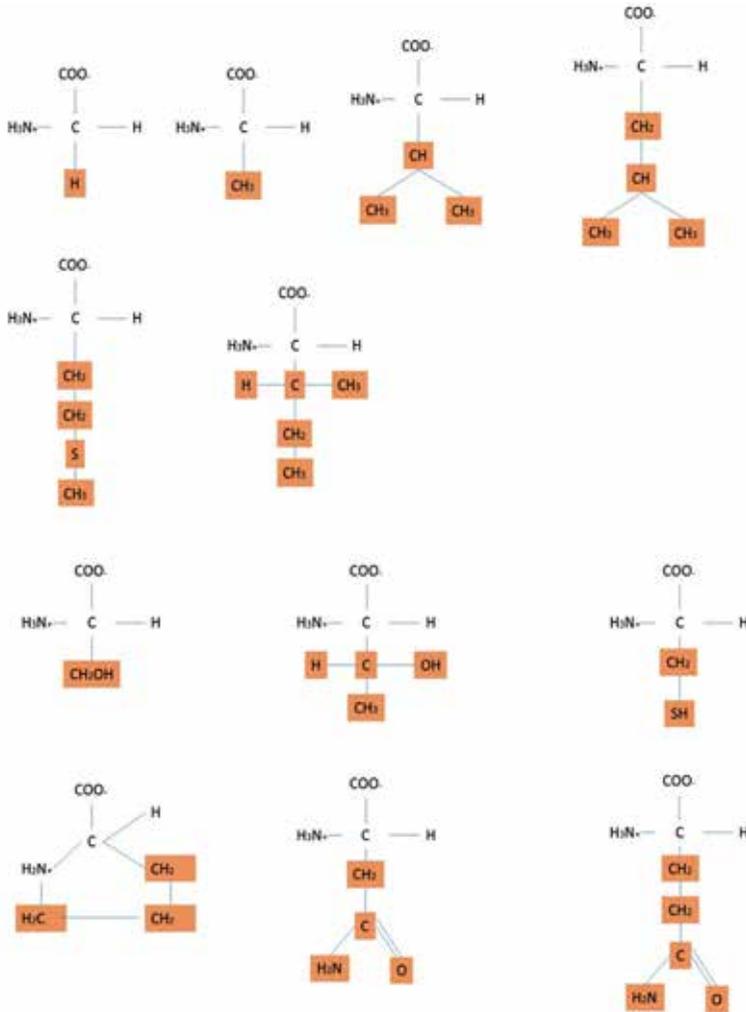


Figura 5. Estructura de los aminoácidos. Fuente producción propia.

Fuerza Iónica

En cultivos líquidos, la fuerza iónica: I , de una solución es una magnitud adimensional que correlaciona la concentración y carga de todos los iones presentes en el medio y que permite estudiar el efecto de las de las interacciones, ion-ion e ion-solvente, en una solución electrolítica. Matemáticamente, la fuerza iónica se define como un medio de la sumatoria de la concentración molar (o molal) de cada tipo de ión (c_i), multiplicada por el cuadrado de la valencia (z_i). Se expresa como:

$$I = \frac{1}{2} \sum c_i z_i^2$$

Donde c_i es la concentración molar de iones i , z_i es la carga de cada ion, y el sumatorio se refiere a cada una de las especies iónicas presentes en el medio. Sin embargo, en una solución de electrolitos, no es sólo la concentración de los iones la que determina la desviación de la idealidad de la solución, sino también la influencia de la magnitud de sus cargas sobre todos los demás iones del electrolito en solución. Estas influencias se manifiestan en una serie de interacciones electrostáticas, como las fuerzas de atracción entre iones con cargas opuestas y de repulsión entre los iones con un mismo sentido de cargas; la agitación térmica que producen los iones en sus movimientos de atracción o repulsión, y, las propiedades intrínsecas y extrínsecas propias de cada sistema en solución, conforman ese sistema de interacciones conocidas con el nombre de fuerza iónica. La fuerza iónica de una solución es, por lo tanto, una medida de la población total de iones que existen en ella, de las fuerzas interiónicas de atracción y repulsión que se producen y por consiguiente una medida general de la falta de idealidad del entorno de la solución.

Además de la importancia de las variables que dependen de las concentraciones de sales en el medio como el de fuerza iónica, existen otras variables importantes para tener en cuenta en el momento de pensar en la solubilidad de una proteína. En primera instancia esta la composición de aminoácidos en su estructura en donde se tiene en cuenta que una proteína rica en aminoácidos polares (figura 5) es en general más soluble que una rica en aminoácidos hidrofóbicos. La estructura tridimensional de la proteína que define la superficie de área que estará en contacto con el medio también es una variable importante para tener en cuenta, en general las proteínas fibrosas son menos solubles que las globulares.



CAPÍTULO 3

CARIOTIPO HUMANO

Un cariotipo es la organización de los cromosomas de una especie, célula, órgano, tumor etc., permite conocer el número y la estructura de los cromosomas (figura 6), es importante para caracterizar las especies y en genética clínica permite el diagnóstico de síndromes y patologías que implican anomalías dentro de los cromosomas, que pueden causar o no fenotipos determinados. Aún en la era genómica, los cariotipos son importantes para el médico genetista, ya que les permite diagnosticar síndromes asociados con anomalías en el número o la estructura de los cromosomas, de esta manera un cariotipo constituye un importante examen para el diagnóstico, manejo clínico y consejo genético de los pacientes.

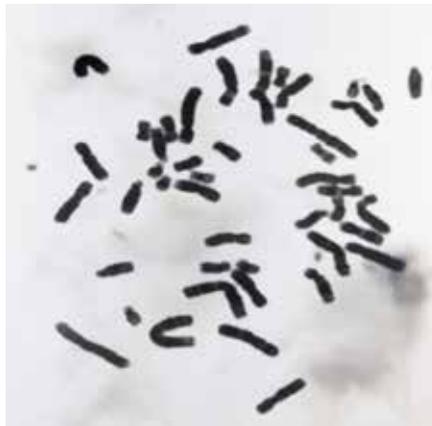


Figura 6. Cromosomas humanos teñidos con Giemsa.

Fuente: producción propia

Es difícil poder determinar cuántos rearrreglos cromosómicos humanos existen, muchos laboratorios de citogenética no reportan sus hallazgos, otros no tienen la tecnología que les permite detectar pequeñas anomalías, por lo tanto,

pueden pasar como cariotipos normales. En términos probabilísticos, se ha observado que existen dentro del genoma regiones susceptibles de rupturas o puntos calientes o sitios frágiles, en donde los cromosomas tendrían mayor probabilidad de romperse y rearrreglarse de muchas formas, sin embargo a la fecha no son muchos los estudios que puedan describir la probabilidad de que ocurra uno u otro tipo de rearrreglo a partir de estos sitios de los genomas, por tanto se espera que cada una de las regiones de los cromosomas tengan una probabilidad importante de romperse y rearrreglarse con otros, por lo que se prevé que pueden existir muchos tipos de rearrreglos cromosómicos, si se tiene en cuenta la longitud completa de cada cromosoma y el número de cromosomas de la especie. De acuerdo con la base de datos *Online Mendelian Inheritance in Man*® *An Online Catalog of Human Genes and Genetic Disorder* (<https://www.omim.org/>), existen cerca de 608 anomalías citogenéticas asociada a un fenotipo particular.

La frecuencia de anomalías citogenéticas depende de las características de cada una de las poblaciones humanas, sin embargo, se considera que el porcentaje general para anomalías asociadas a los cromosomas es de 0.5% nacidos vivos (Matiew, 1998). La frecuencia de abortos espontáneos dentro del primer trimestre de gestación ha sido estimada en cerca del 10%, en la población general, de ellos cerca del 50% fueron debidos a que el feto tenía una anomalía citogenética.

Las anomalías cromosómicas en humanos pueden ocurrir durante la producción de los gametos o en el embrión que se está formando, algunas anomalías citogenéticas pueden ser heredadas de los padres, cuando alguno de ellos es portador de una translocación robertsoniana, al encontrarse dos cromosomas acrocéntrico-fusionados pasan de igual manera a la descendencia, en donde probablemente se observe una malformación fenotípica, no vista en los portadores.

Como se mencionó anteriormente, un cariotipo se puede obtener de diversos tipos de células, e involucra el cultivo de diferentes muestras, la estimulación del crecimiento celular *in vitro*, detener los cultivos celulares en metafase, procesar y obtener las metafases, fijar las células a lámina y analizar los cromosomas en el microscópio. En la figura 6, se resume este proceso.

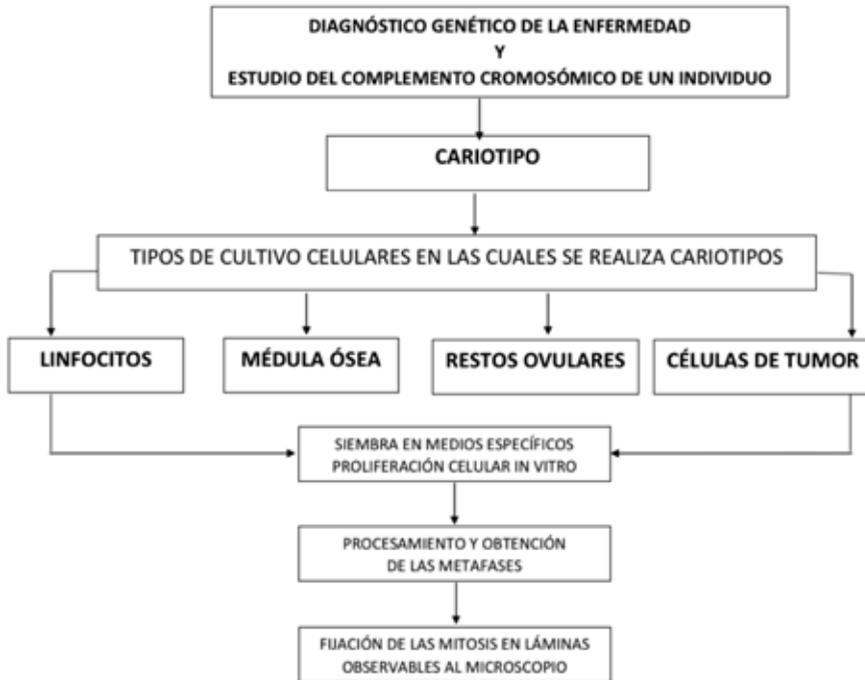
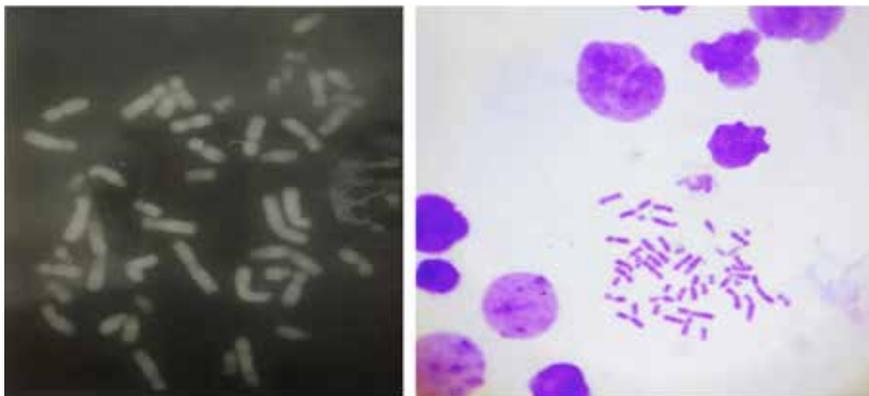


Figura 7. *Diferentes tipos de cultivos celulares.* Fuente: producción propia

Inicialmente la citogenética permitió contar y observar el número de cromosomas y su morfología, ya que únicamente existía la tinción con Giemsa, en donde los cromosomas se observaban de un color púrpura en su completa longitud. Sin embargo, a medida que se observaban rearrreglos entre cromosomas, se hizo necesario establecer diferentes técnicas de tinción que permite identificar individualmente cada uno de los cromosomas y regiones dentro de ellos. Básicamente existen cuatro técnicas de bandeo en citogenética convencional: Bando G, Bando Q, Bando R y Bando C. Las bandas G son una de las técnicas más utilizadas en citogenética, para obtener este tipo de bandas los cromosomas se tratan con tripsina que desnaturaliza las proteínas asociadas a los cromosomas y luego se tiñen con Giemsa, dando un patrón característico para cada cromosoma de regiones oscuras y claras, para obtener las Bandas Q los cromosomas son teñidos con mostaza de Quinacrina (un fluorocromo) (Figura 7) y los cromosomas son observados en microscopios de fluorescencia, en donde se observan bandas brillantes, que son equivalentes a las oscuras obtenidas con bandas G y regiones opacas equivalentes a las claras. Las bandas R son obtenidas después de un tratamiento salino, en calor y luego una tinción con Giemsa, el patrón de estas bandas

corresponde a un patrón inverso a las bandas G, es decir, lo que en G se observa oscuro, en R se observa claro, por esta razón son llamadas también bandas reversas. Para las bandas C los cromosomas se tratan con ácido diluido, seguido por un tratamiento alcalino fuerte, enjuagados con solución salina, antes de la tinción con Giemsa, este tratamiento permite la visualización de las regiones cromosómicas que corresponden a heterocromatina, es decir cromatina que permanece en un estado de alta condensación y que se tiñen de color oscuro luego del tratamiento, este tipo de bandas es importante cuando se quiere estudiar síndromes relacionados con el cromosoma Y, debido a que la mayor parte del brazo largo del cromosoma Y, es heterocromático, pero también se definen muy bien los centrómeros de todos cromosomas y de manera se pueden observar los polimorfismos centroméricos de los cromosomas 1, 9, 16 y Y en humanos.

Existen otros tipos de bandas que fueron desarrolladas posteriormente y que han sido importantes para determinar anomalías que involucran pequeños segmentos dentro de los cromosomas, esta corresponden a la bandas de alta resolución, en donde los cromosomas se bandean con bandas G o R, pero utilizando preparaciones cromosómicas anteriores a la metafase, lo que permite observar cromosomas largos prometásicos, la diferencia con bandeado normal es que se pueden obtener cromosomas con una mayor resolución hasta de 800 bandas.



Cromosomas Bandas Q

Cromosomas Bandas RT

Figura 8 : Metafase teñidas con bandas Q y Bandas RT Fuente: producción propia

La citogenética convencional, permite además identificar sitios frágiles dentro de los cromosomas, estos son evidenciados por una técnica específica en donde las células dentro del cultivo celular crecen sin timidina y ácido fólico o con algún inhibidor de la timidina quinasa, los sitios frágiles luego de una tinción con Giem-sa se observan como discontinuidades que no tiñen en los cromosomas, esta

técnica ha sido importante para diagnosticar el Síndrome de X-frágil, en donde la fragilidad cromosómica se presenta en el extremo del cromosoma X (Xq27.1), asociado con retardo mental grave en hombres, en donde las mujeres son portadoras del mismo, el cual se caracterizó posteriormente como un síndrome debido a la expansión de trinucleótidos.

CROMOSOMAS HUMANOS

En la especie humana el conjunto diploide es de 46 cromosomas, los cuales pueden visualizarse por medio de técnicas específicas de obtención y tinción durante la metafase de la división celular, en donde los cromosomas están compactos y dobles. Observados en el microscopio de luz se puede visualizar un brazo corto o **p** y otro largo o **q** unidos por una constricción primaria llamada centrómero (Figura 8), el cual está involucrado en el movimiento de los cromosomas durante la división celular, es el sitio al cual se van a unir las fibras del huso mitótico durante el anafase y la desnaturalización de las proteínas que lo conforman, permiten el movimiento que determina fuerza para que los cromosomas se separen.

La parte final de los cromosomas se denominan telómero, está constituido de una secuencia repetida (TTAGGG) n en tándem (en bloques), los cuales son de vital importancia para mantener la integridad del cromosoma y su pérdida se asocia a procesos de envejecimiento celular.

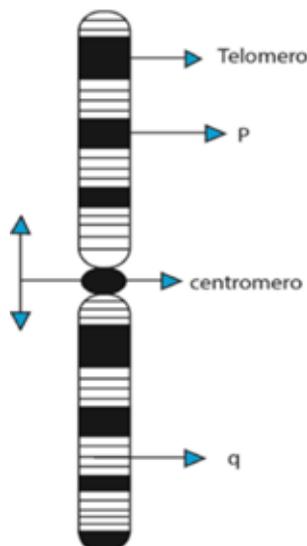


Figura 9. Estructura del cromosoma humano.

Fuente: producción propia

De acuerdo a la posición del centrómero los cromosomas humanos se clasifican en:



Figura 10. Clasificación de morfológica de los cromosomas humanos.

Fuente: producción propia

Metacéntricos: cuando sus dos brazos tienen la misma longitud, el centrómero está en el centro del cromosoma (Figura 9).

Submetacéntricos: cuando el centrómero se encuentra ligeramente fuera del centro y la proporción en longitud de sus brazos es dispar (Figura 9).

Acrocéntricos: cuando el centrómero ocupa una posición terminal. Estos cromosomas aparentemente no tienen brazo corto, sin embargo, su brazo corto está constituido por una segunda constricción llamada tallo de satélite, en donde han sido mapeados los genes para las unidades ribosomales 18S y 28S, y los satélites, que corresponden a regiones de ADN altamente repetitivo y polimórfico (Figura 9).

Regiones dentro del cromosoma están asociadas con actividad e inactividad genética y procesos de metilación. La **heterocromatina constitutiva** corresponde a los centrómeros de todos los cromosomas y a la porción distal del brazo largo del cromosoma Y, en los humanos. Se asocia con inactividad genética y metilación. Otro tipo de cromatina corresponde a la **heterocromatina facultativa** que se localiza en los tallos de los satélites y el cromosoma X de replicación tardía, se asocia con regiones que han sido activas durante un ciclo celular precedente y que se pueden evidenciar en la mitosis posterior por técnicas de tinción.

Inactivación del cromosoma X en hembras de mamíferos

El sexo en los mamíferos está determinado por una pareja de cromosomas sexuales denominados cromosomas X y Y, su morfología es muy diferente, el

cromosoma X es un cromosoma su metacéntrico grande, mientras que el cromosoma Y es acrocéntrico de menor tamaño. Las hembras de los mamíferos tienen dos cromosomas X (XX) y el macho tiene una constitución cromosómica XY, de tal manera, que el macho en relación a la hembra tendría una descompensación de dosis respecto a los cerca de 1000 genes localizados sobre el cromosoma X que las hembras portan en doble dosis (Gribnau and Anton, 2012). Existe un mecanismo molecular que permite compensar la dosis de los genes sobre el cromosoma X, en hembras y machos, este mecanismo es denominado compensación de dosis y no sólo ocurre en mamíferos, sino que también puede observarse en algunos invertebrados como en *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* (Przanowski et al, 2018).

El mecanismo de compensación de dosis es complejo y se encuentra regulado molecularmente, a través de un mecanismo epigenético, que permite la expresión diferencial de genes por medio de modificaciones covalentes de la cromatina (Kouzarides, 2007). Un tipo de modificación importante involucra la metilación de los residuos de Citosina sobre el ADN y la metilación del residuo de lisina 27 en la histona H3 asociada a la cromatina, este tipo de modificación puede hacer que los genes se silencien, inactivando su expresión, otra modificación es dada por la acetilación de histonas sobre sitios activos de transcripción (Kalantry, 2011).

El mecanismo molecular de inactivación del cromosoma X, ha sido ampliamente estudiado durante las últimas décadas, sin embargo, aún no se conoce el rol de muchas proteínas asociadas al proceso. La inactivación ocurre muy temprano durante el desarrollo embrionario de las hembras, los dos cromosomas X, el paterno y el materno tienen la misma probabilidad de ser inactivados, y una vez que uno de estos cromosomas ha sido escogido, la inactivación es irreversible y se transmite a las células hijas, a través de las subsecuentes divisiones celulares, de tal manera como resultado, las hembras de los mamíferos son un mosaico de las expresiones de los genes que se encuentran sobre el cromosoma X, los paternos y los maternos.

A nivel molecular, el mecanismo ocurre en múltiples pasos y requiere de un centro de inactivación denominado XCI, que contiene dos RNAs no codificantes y anti sentido XIST y TSIX, puede variar de especie a especie, sin embargo, existe consenso sobre tres pasos fundamentales para que la inactivación se lleve a cabo, estos son: recuento de cromosomas X (iniciación), selección del cromosoma X que se inactivará (establecimiento) y mantenimiento de la inactivación.

En la iniciación, el mecanismo se encuentra regulado por un RNA no codificante, de uno de los dos cromosomas X, llamado *Xist* que constituye un locus que pertenece a la familia de RNAs largos no codificantes (lncRNA) y cuya expresión depende de regulación tejido específico. Este *Xist* RNA, forma una envoltura sobre el cromosoma escogido para ser transcrito, esto induce el silenciamiento de casi todos sus genes sobre el cromosoma, se conoce que algunos genes pueden escapar a la inactivación, para mantener esta inactivación, es vital importancia la expresión del locus para TSIX, ya que es expresado como un RNA anti sentido de *Xist* y la función primordial es regular la sobre expresión de *Xist*, para que no exista la posibilidad de inactivar el cromosoma que debe mantenerse activo. Quien primero observó el cromosoma inactivo fue la bióloga inglesa Mary Lyon (Lyon, 1961), quien lo observó como un corpúsculo adyacente a la membrana celular y fue llamado corpúsculo de Barr, el cual puede observarse fácilmente al microscopio en un extendido de células de la mucosa oral, teñidos con Giemsa, en las mujeres XX se observa un solo corpúsculo de Barr, mientras que en los hombres XY, ninguno. Por muchos años esta observación permitió diagnosticar síndromes asociados a cromosomas X extras o la única monosomía compatible con la vida, correspondiente al síndrome de Turner.

Cuando se realizan cultivos celulares sincronizados, que se utilizan en los laboratorios de citogenética, para observar regiones específicas dentro de los cromosomas que corresponden a regiones en donde la cromatina se sintetiza tempranamente o tardíamente, dentro de la fase S del ciclo celular. El cromosoma X inactivo se observa de un color pálido (Figura 10), que corresponde a las regiones que se replicaron tardíamente, se asocia con el concepto de heterocromatina facultativa, ya que como mencionó anteriormente puede mutarse en ciertos puntos y la hembra ser un mosaico de la inactivación del cromosoma paterno o materno, de ahí la denominación de facultativa. Con tipo de tinción se observa además el material genético que corresponde a eucromatina o cromatina activa no metilada, que se asocia con genes que se expresan activamente, los cuales se colorean de manera oscura.

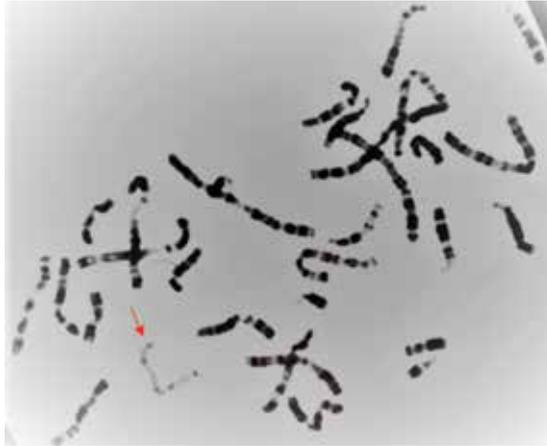


Figura 11. Cromosomas prometásicos humanos, muestra el cromosoma de replicación tardía

Fuente: producción propia

Clasificación de los cromosomas humanos

Las técnicas de bandeado cromosómico han definido cada una de las parejas de homólogos permitiendo la detección de anomalías estructurales con mucha precisión. De acuerdo a los criterios anteriores, los cromosomas humanos han sido clasificados en siete grupos (Figura 11):

GRUPO A: Pares de cromosomas 1, 2, 3. Metacéntricos 1 y 3; Submetacéntricos 2.

GRUPO B: Pares de cromosomas 4 y 5. Todos Submetacéntricos.

GRUPO C: Pares de cromosomas 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, y X. Todos Submetacéntricos.

GRUPO D: Pares de cromosomas 13, 14, 15. Todos acrocéntricos.

GRUPO E: Pares de cromosomas 16, 17, 18. Metacéntricos pares 16 y Submetacéntricos pares 17 y 18.

GRUPO F: Pares de cromosomas 19 y 20. Metacéntricos pequeños.

GRUPO G: Pares 21,22 y Y. Acrocéntricos pequeños.



Figura 12. Cariotipo humano tinción G-, junto al Ideograma de cada cromosoma.

Fuente de Scitable by Nature education. Recuperado de <https://www.nature.com/scitable/topicpage/human-chromosome-number-294>

Para mejor visualización de las bandas cromosómicas, están han sido dibujadas en lo que se constituye un ideograma, tal y como se muestra en la figura 10.

Polimorfismo cromosómico

Son variaciones normales con respecto al contenido de ADN y que se expresa de una manera específica a nivel de los cromosomas. Se encuentra en una población reproductivamente activa y varían de individuo a individuo, pero todas las células de un sujeto van a presentar el mismo marcador. Se han podido establecer gracias a técnicas tales como: citometría de flujo o densitometría. Los polimorfismos cromosómicos generalmente contienen ADN repetitivo y se observan con técnicas de bandeado como bandas C, Q o NOR (organizadores nucleolares).

A nivel de cromosomas humanos, se reconocen cuatro tipos de polimorfismo cromosómico estos son:

1. El tamaño del brazo largo del cromosoma Y (Yq+)
2. El tamaño de la heterocromatina constitutiva o centromérica.
3. Las dimensiones u otras características propias de los satélites.
4. Los sitios frágiles.

Todos los polimorfismos son transmitidos de generación en generación de manera mendeliana, han sido útiles para el estudio de paternidad y ligamiento, para diferenciar las células maternas de las fetales en estudios prenatales, para establecer el origen de quimeras o mosaicos y también en el estudio de poblaciones.

Tamaño de Yq: es el más común de los polimorfismos cromosómicos, se considera que alrededor de un 10% de los hombres tienen el cromosoma Y variable en el tamaño de la región heterocromática de brazo largo. Esta variación se visualiza muy bien con bandas C observándose como una banda oscura de mayor o menor tamaño, comparada con el tamaño medio de la región en el cromosoma Y.

Con bandas Q también se evidencia muy claramente como un segmento fluorescente. La fluorescencia puede ser vista en interfase y se le conoce como cromatina Y.

Tamaño de la heterocromatina constitutiva: las variaciones en las dimensiones de la heterocromatina constitutiva son relativamente frecuente en los cromosomas 1, 9, 16. Se observan muy bien con la técnica de bandas C, variando su frecuencia con relación a distintos grupos étnicos.

Polimorfismo de los satélites: variaciones en la intensidad de las bandas Q y NOR, como también dobles satélites y regiones muy fuertemente coloreadas con bandas G. Se observan como un polimorfismo poblacional en los cromosomas 13, 14, 15, 21, 22. La variación es debida a repeticiones de ADN y al número de genes ribosomales.

Sitios frágiles: los que se encuentran en los autosomas que se expresan de manera espontánea en la población general constituyen más de 20 sitios frágiles comunes, mientras que otros aproximadamente 18 pueden ser inducidos cuando se añade agentes antifólicos al medio de cultivo ellos son denominados sitios frágiles raros. Son variaciones que no tienen importancia clínica, pero son motivo de estudios evolutivos y moleculares.

BANDAS Y NOMENCLATURA DE LOS CROMOSOMAS

Las bandas cromosómicas son regiones que se visualizan por medio de tratamientos específicos. Sustancias químicas o calor interactúan con el ADN y las proteínas que constituyen el cromosoma, para producir segmentos alternos de coloración a lo largo del mismo. Dependiendo del tipo de tratamiento empleado se observará un patrón específico para cada uno de los pares cromosómicos del set diploide en una especie determinada.

Para facilitar el estudio y la descripción de los cromosomas y sus anormalidades se ha establecido un sistema común de nomenclatura, resultado de varias reuniones iniciadas desde 1960 para tal fin, conocido como el documento de Estocolmo y titulado *The International System for Human Cytogenetic Nomenclature 1978* ISCN 1978 (Figura 12). De manera general, para designar una región particular del cromosoma, este sistema enumera las bandas y regiones en orden ascendente del centrómero hacia arriba o hacia abajo. Cuando una banda esta subdividida se coloca un punto decimal seguido por el número asignado a la nueva banda.

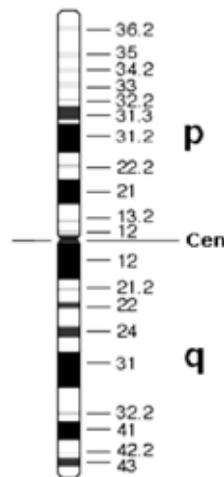


Figura 13. Muestra la disposición de bandas dentro de un cromosoma metacéntrico, de acuerdo a la nomenclatura internacional.

Fuente: producción propia

La última versión del sistema internacional de nomenclatura se realizó en el año 2016, en esta versión se ofrece nomenclatura estándar utilizada para describir cualquier rearrreglo cromosómico identificado por técnicas moleculares como cariotipos con FISH, microarreglos, análisis de regiones particulares del genoma, y alteraciones identificadas con secuenciación de ADN.

Algunas reglas de nomenclatura de cariotipos normales

Para designar el cariotipo normal, primero se coloca el número de cromosomas del individuo seguido por una coma y luego se designan los cromosomas sexuales en letras mayúsculas.

- 46, XX Cariotipo correspondiente a una persona con 46 cromosomas y dos cromosomas sexuales X.
- 46, XY Cariotipo normal de un individuo con 46 cromosomas con un cromosoma sexual X y uno Y.
- 13 q 14.1 Esta nomenclatura corresponde a una banda específica dentro de un cromosoma, en este caso la banda 14 y la subbanda 1 localizada en el brazo largo del cromosoma 13.

Nomenclatura de polimorfismo

- 46, XX, 16 qh+ Esto designa a una mujer con un incremento en la longitud de la heterocromatina del cromosoma 16.
- 46, XX, 13s+ Incremento en la longitud de la región satélite del cromosoma 13.

Nomenclatura de las anomalías numéricas

La trisomía 21 puede presentarse asociada con una translocación entre un cromosoma 21 y cualquier otro cromosoma acrocéntrico, especialmente 13, 15, 21, 22. Como también puede presentar el cromosoma libre.

- 47, XX, + 21 Este cariotipo corresponde a un individuo de sexo femenino con síndrome de Down, en donde el cromosoma 21 demás está libre.
- 47, XY / 46, XY + 21 Individuo de sexo masculino con dos líneas celulares, una normal y otra con trisomía, En algunas ocasiones se designa el porcentaje de cada una de ellas.
- 46, XY, t (13; 21) individuo de sexo masculino con una trisomía 21 por translocación entre un cromosoma 13 y 21. Note que el número de cromosomas es de 46 debido a la fusión entre dos cromosomas acrocéntricos.
- 47, XY, + 18 Individuo de sexo masculino con Síndrome de Edwards.
- 47. XX, + 13 individuo de sexo femenino con Síndrome de Patau. Por estar involucrado en el síndrome un cromosoma de tipo acrocéntrico al igual que en la trisomía 21 este también puede deberse a una translocación entre un cromosoma 13 y cualquier otro de los cromosomas acrocéntricos en cuyo caso la nomenclatura será:

- 46, XY, 1 (13; 13) individuo de sexo masculino con síndrome de Patau por translocación 13,13.
- 47, XXY Individuo con Síndrome de Klinefelter.
- 45, XO Individuo con Síndrome de Turner o simplemente como 45, X como se modificó en la última reunión llevada a cabo en 1995.

ORIGEN DE LAS ANORMALIDADES NUMERICAS

Las anomalías cromosómicas se pueden clasificar en numéricas y estructurales (Figura 13). La mayoría de las anomalías numéricas son debidas a una no disyunción, pero también pueden ser debidas a un anafase retardada. La no disyunción consiste en la no separación de los cromosomas o de las cromátides durante el proceso de mitosis o meiosis.

La no separación de los cromosomas puede darse antes o después de la formación del cigoto, de tal manera, hay dos tipos de no disyunción: precigótica y postcigótica.

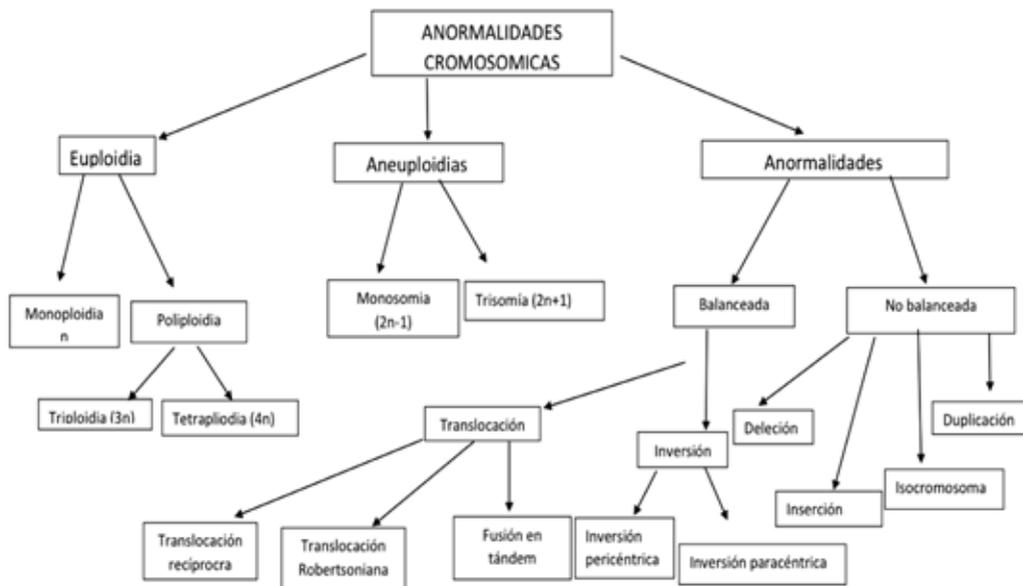


Figura 14. Anormalidades cromosómicas.

Fuente: Tomado y adaptado de *Insights from Animal Reproduction*. Capítulo 9.

Las precigóticas ocurren cuando se están formando los gametos. En los procesos de oogénesis y espermatogénesis puede haber una no disyunción durante

la primera división meiótica, en la cual se separan los cromosomas homólogos. Los gametos así originados pueden ser de dos tipos: nulósómicos o disómicos.

Si ocurre una no separación de cromatides hermanas durante la segunda división meiótica los gametos pueden ser de tres tipos: normales, monosómicos, o trisómicos, tal y como se muestra en la figura No. 14.

Las anomalías citogenéticas pueden resumirse en la siguiente figura:

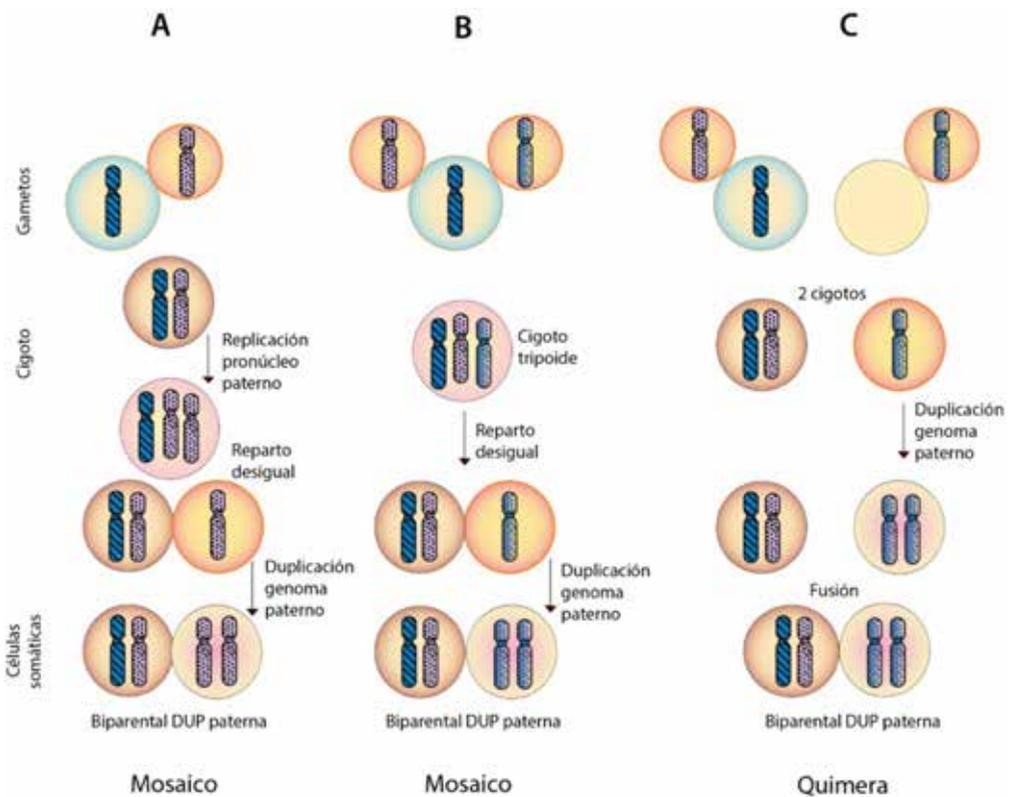
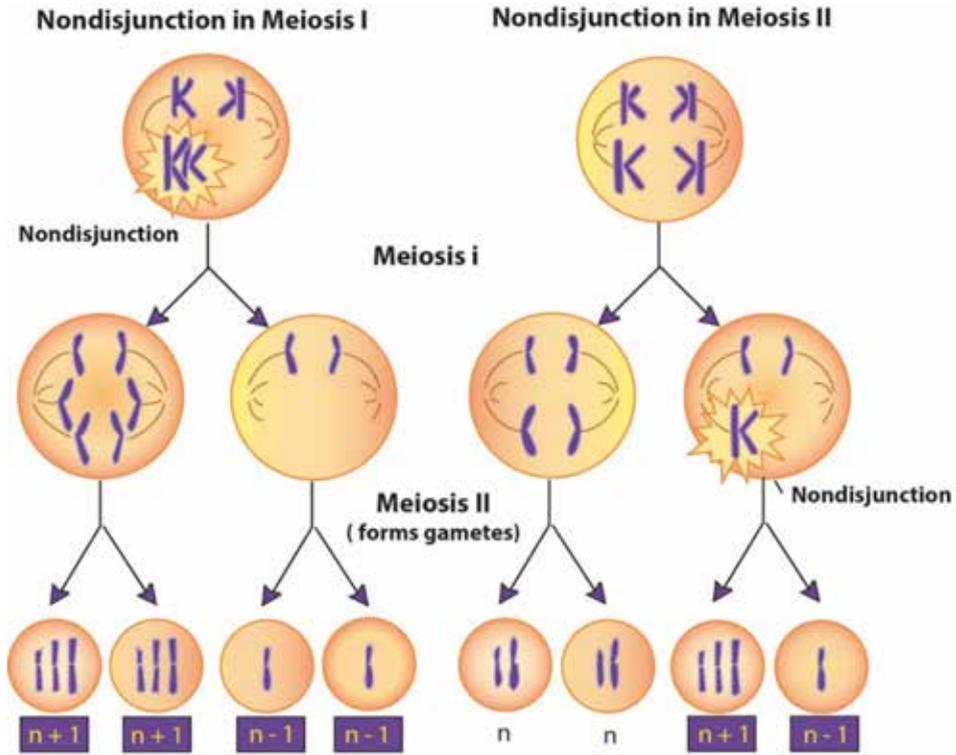


Figura 15. *Disyunción y no disyunción cromosómica.*

Fuente: producción propia

ESPERMATOGÉNESIS NORMAL



No disyunción en la Meiosis I

No disyunción en la Meiosis II

Figura 16. Espermatogénesis.

Fuente: producción propia

Si la disyunción ocurre durante el proceso de formación de los espermatozoides (Figura 15), puede ser en la primera o en la segunda división meiótica, en este ejemplo se graficó una doble no disyunción en la segunda división meiótica. Sin embargo, normalmente ocurre solo a nivel de un espermatocito secundario, con lo cual se tiene la posibilidad de tener espermatozoides normales también

Las no disyunciones postcigóticas se dan cuando se ha formado el cigoto y empieza una serie de divisiones mitóticas (Figura 16). Generando la posibilidad de individuos mosaicos, es decir individuos con más de una línea celular.

Las anomalías numéricas más frecuentes corresponden a síndromes muy bien definidos y cuya clínica pertenece a un libro especializado, aquí se enumerarán únicamente los más comunes y su respectivo cariotipo.

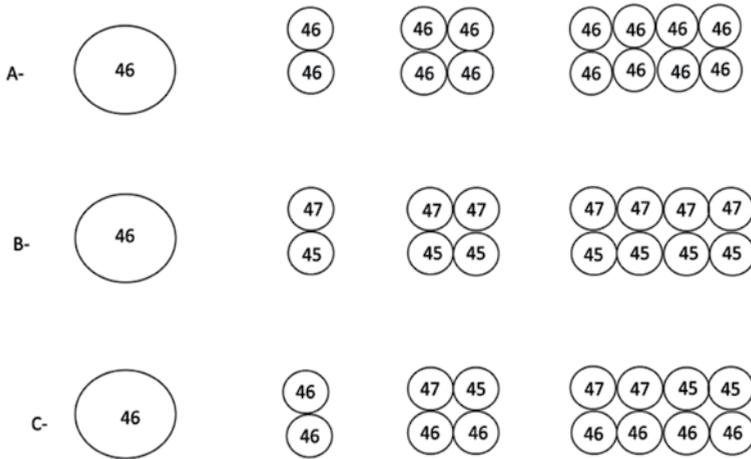


Figura 17. No disyunción post cigótica.

Fuente: producción propia

- A-** El cigoto es la unión del complemento cromosómico haploide materno y paterno y las subsiguientes divisiones mitóticas, reparten el material equitativamente entre las células hijas.
- B-** Una no disyunción ocurrió en la primera división mitótica del cigoto, cada una de las dos líneas celulares dará origen a otra línea con igual número de cromosomas, presentándose un individuo mosaico con dos líneas celulares.
- C-** La no disyunción ocurrió en la segunda división mitótica dando origen a un individuo mosaico, con tres líneas celulares del mismo origen.

La anafase retardada: también puede producir individuos mosaicos ya que algún tipo de alteración no permite que un cromosoma determinado sea contactado por el huso mitótico y por ende se retrase el proceso de separación y el cromosoma involucrado se pierda en el proceso de división.

Quimeras

Las quimeras se refieren a un caso muy particular y poco frecuente de anomalías citogenéticas, en donde hay dos líneas celulares, pero a diferencia del mosaico estas tienen diferente origen. Una quimera puede definirse como un individuo que contiene dos o más poblaciones celulares diferentes provenientes de más de un cigoto.

En algunas ocasiones puede ocurrir una doble fertilización por parte de dos espermatozoides diferentes a dos óvulos con una posterior fusión para dar un solo individuo con aporte de los dos cigotos, como también puede haber un intercambio de células, vía placenta, entre gemelos dicigóticos. Aún se estudian las posibilidades de aparición de las quimeras con técnicas sofisticadas que permiten identificar el origen exacto de los cromosomas.

En bovinos existe un síndrome muy bien estudiado y denominado el síndrome de Freemartin, acontece en nacimientos gemelares de hembra y macho, reduce la fertilidad en la hembra, debido a que durante la gestación gemelar entre los dos productos, macho y hembra hay transferencia de células y hormonas, del macho a la hembra, produciendo alteraciones fisiológicas y anatómicas en los órganos sexuales de la hembra.

ANORMALIDADES EN LA ESTRUCTURA DEL CROMOSOMA

Resultan de una ruptura cromosómica seguida de una asociación en una combinación anormal. Son más raras que las aneuploidías, o anomalías en el número de cromosoma, las más comunes son las translocaciones robertsoniana y pueden, al igual que las anomalías numéricas ser mosaicos o universales.

Rearreglos balanceados: no tienen casi efecto sobre el fenotipo de quien las porta, puesto que no hay pérdida ni ganancia de material genético, sin embargo, estos individuos tienen una alta posibilidad de dar gametos no balanceados que afectarían a la siguiente generación.

No balanceadas: se refiere a un set cromosómico con ganancia o pérdida de material genético.

INVERSIONES

Cuando un fragmento en el cromosoma sufre dos rupturas y este es reconstituido de manera invertida. Las consecuencias meióticas dependerán de si hay o no entrecruzamiento de los cromosomas durante el paquinema de la anafase I en donde los cromosomas homólogos se entrecruzan. Debido a la inversión el apareamiento de los cromosomas no es lineal y el área de inversión formará un azaque, dependiendo del tipo de inversión y si ocurre o no entrecruzamiento en este

sitio se producirán los diferentes tipos de gametos.

Dependiendo del sitio en donde se realicen las rupturas las inversiones pueden ser de dos tipos:

Inversiones paracéntrica: estas no involucran el centrómero, las rupturas se dan en uno u otro brazo del cromosoma (Figura 17). El portador de una inversión tiene la posibilidad de dar cuatro tipos de gametos si el entrecruzamiento de los cromosomas homólogos durante la meiosis tuviese lugar en la región involucrada en la inversión. Estos gametos son:

- Uno normal.
- Uno con la inversión.
- Dos Anormales: Uno duplicado y dicéntrico.
Uno Acéntrico y con deleción.

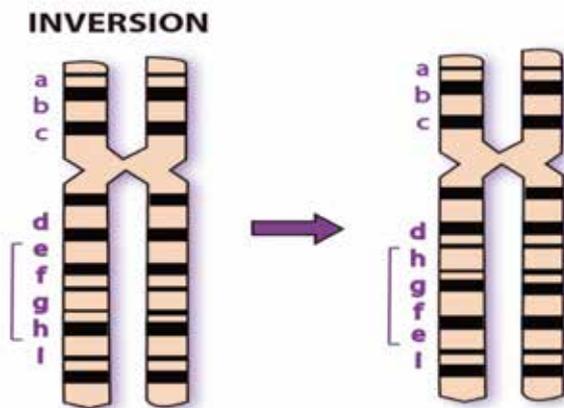


Figura 18. *Inversión paracéntrica.* Fuente: producción propia

Inversiones pericéntrica: Las rupturas ocurren cada una en un brazo diferente del cromosoma, de tal manera que involucran el centrómero. Las consecuencias de una inversión pericéntrica a nivel de los gametos producidos dependerá de si hay o no entrecruzamiento, si éste no ocurriera se producirán dos gametos normales y dos con la misma inversión, pero si el entrecruzamiento tiene lugar en el aza de inversión los gametos pueden ser de dos tipos céntricos o conteniendo una duplicación y una deleción al mismo tiempo (Figura 18).

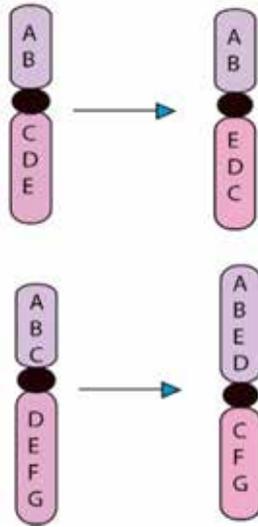


Figura 19. *Inversión pericéntrica.* Fuente: producción propia

Nomenclatura de las inversiones: la inversión se denota con las tres primeras letras de la palabra, Inv (Figura 19). Para la nomenclatura debemos tener en cuenta el evento que estamos describiendo basados en los puntos de ruptura también como una forma corta y larga de describir el evento.

46, XX, inv (2) (p13 q24) Forma corta de describir una inversión pericéntrica en el cromosoma 2. El segmento invertido corresponde a p13 → q24.

46, XX, inv (2) (pter → p13 :: q24 → p13::q24 → qter).

En la forma larga de describir un evento se utilizan unos símbolos que significan:

→ Esta flecha indica la longitud de un segmento dado.

: Los dos puntos significan una ruptura del cromosoma.

:: Estos puntos indican que hubo una ruptura y un rearrreglo.

La figura indica los puntos de ruptura en el cromosoma 2 y el cromosoma derivado producto del rearrreglo de: 46, XY, inv (3) (q22 q24) forma de escribir una inversión paracéntrica en su forma corta.

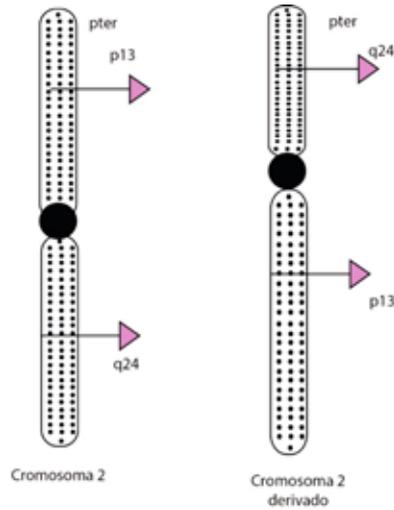


Figura 20. *Cromosoma normal y derivado de inversión.*

Fuente producción propia

TRANSLOCACIONES

Es un intercambio de fragmentos entre dos o más cromosomas (Figura 20), las consecuencias meióticas de una translocación pueden ser variables; dependiendo de si hay entrecruzamiento en el cuadrivalente (figura que se formará durante la paquinema) (Figura 21) cuando hay una translocación recíproca, al aparearse los dos cromosomas implicados en la translocación y sus respectivos homólogos. Si el quiasma aparece en cada brazo del cruce el cuadriradio pasará a la metafase, si no hay quiasma en dos o más brazos de los cromosomas con la translocación el cuadriradio puede separarse en un trivalente y un univalente, dos bivalentes, un bivalente y dos univalentes o los cuatro univalentes.

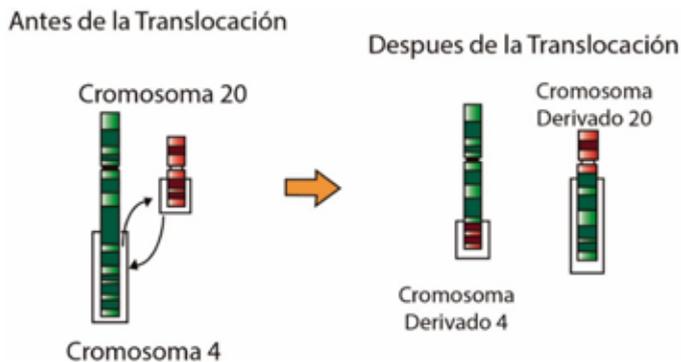


Figura 21. *Translocaciones recíprocas.*

Fuente: producción propia

En la anafase, el cuadrivalente puede separarse cada polo en tres formas diferentes y dos cromosomas migran hacia cada polo en tres formas diferentes.

Alternante: gametos balanceados, uno con cromosomas normales el otro portador de la translocación balanceada.

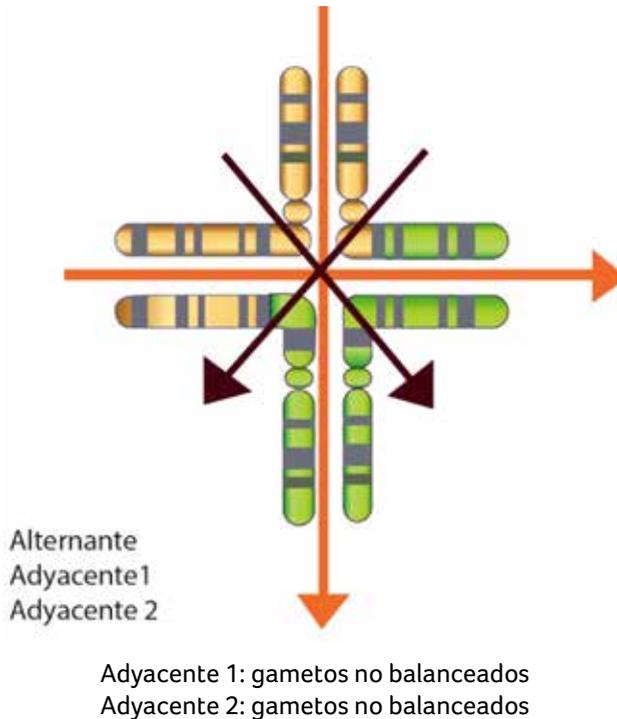


Figura 22. Cuadrivalente.

Fuente producción propia

TRANSLOCACIÓN ROBERSONIANA

La forma más común es la fusión céntrica, que involucra dos cromosomas acrocéntricos (Figura 22). Esta puede dar origen a un cromosoma metacéntrico o submetacéntrico con uno o dos centrómeros. Individuos portadores de una translocación robertsoniana pueden producir gametos no balanceados que conducirán a una monosomía o trisomía, o bien a trirradios. Este tipo de translocación es un mecanismo importante en procesos evolutivos por los cuales se disminuye el número de cromosomas de una especie para dar lugar a otra diferente.

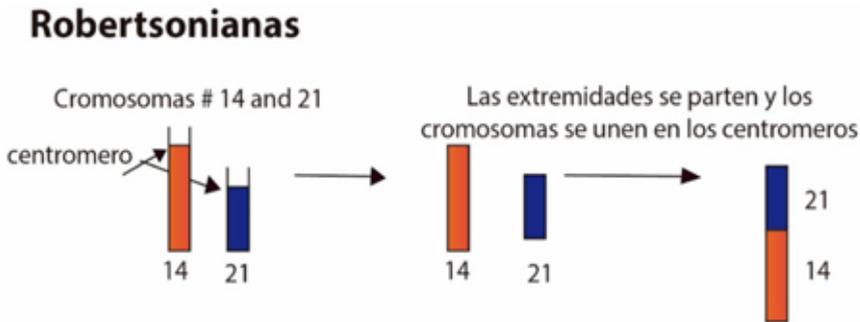


Figura 23. *Translocaciones robertsoniana.*

Fuente: producción propia

Nomenclatura de las translocaciones: Las translocaciones son designadas con una letra t seguido por un paréntesis en donde se nombran los cromosomas involucrados.

- 46, XY, t (4p-: 8q+) esta es una translocación no recíproca, puesto que un fragmento de un cromosoma ha pasado a otro sin intercambio, esta translocación se puede considerar como una inserción. Un fragmento del brazo corto del cromosoma 4 ha pasado al brazo largo del cromosoma 8.
- 46, XY, t (2: 5) (q21: q31) Forma corta de describir una translocación entre las bandas q21 del cromosoma 2 y q 31 del cromosoma 5.

La descripción de la forma larga de acuerdo con el diagrama será:

- 46, XY, t (2;5) (2pter → 2q21 ::5q31 → 5qter: 5pter → 5q31 ::2q21 → 2qter)
- 46, XY, t (2;5) (p12; q31) Translocación del segmento p12 del cromosoma 2 al segmento p31 del cromosoma 5 y el segmento p31 hasta el telómero del cromosoma 5 se ha translocado al cromosoma 2 específicamente a la banda p12.
- 46, XY, t (2;5) (2qter → 2p12::5q3t 5qter; 5pter → 5q31::2p12 → 2per)

Note que al describir el cromosoma derivado 2, el cual porta el centrómero del cromosoma original 2 y no tiene el segmento terminal del brazo corto del cromosoma 2 por lo cual se empieza a describir por su brazo largo hacia arriba.

Nomenclatura robertsoniana de las translocaciones:

- 45, XX, t (13; 14) (p11; q11) Fusión de los cromosomas 13 y 14 por las bandas p11 y q11 por lo cual el cromosoma metacéntrico derivado es monocéntrico.

Forma larga:

- 45, XX, t (13; 14) (13qter → 13p11:: 14q11 → 14qter).
- 45, XX, dic (13; 14) (p11; q11) Esta es una translocación robertsoniana, en donde los cromosomas se han fusionado por sus brazos cortos dando como resultado un cromosoma dicéntrico o con dos centrómeros. Estos son cromosomas inestables durante la división celular y por lo tanto pueden perderse en la metafase.

INSERCIONES

La inserción involucra más de dos rupturas cromosómicas con la escisión de un fragmento y el rearrreglo de este dentro del mismo u otro cromosoma. Durante la meiosis eventos de recombinación entre los cromosomas homólogos, que han hecho dos asas de inversión, darán lugar a gametos no balanceados muy parecidos al rearrreglo parental.

Nomenclatura de las inserciones: de acuerdo a si el fragmento mantiene o no la orientación inicial estas serán de dos tipos: directas e indirectas.

Inserción directa:

- 46, XY, dir ins (2) (p13 q21 q31)
- 46, XY, dir ins (2) (pter → p13 :: q31 q21 → ::p13 → q21::q31 → qter)

La banda q21, q31 del cromosoma número 2 ha sido insertada en su brazo corto a nivel de la banda p13, manteniéndose la orientación.

Inserción invertida:

- 46, XY, inv ins (2) (p13 q31 q21)
- 46, XY, inv ins (2) (pter → p13 :: q21 → q31 :: p13 → q21 :: q31 → qter)

Inserción Directa entre dos cromosomas:

- 46, XY, dir ins (5; 2) (p14; q22 q32)
- 46, XY, dir ins (5; 2) (5pter → 5p14 :: 2q32 → 2q22 :: 5p14 → 5qter;
- 2pter → 2q22 :: 2q32 → 2qter)

ANORMALIDADES NO BALANCEADAS

DUPLICACIONES

Cuando un segmento en el cromosoma se encuentra en doble copia (Figura 23). Las consecuencias clínicas van a depender del segmento duplicado, pues en el individuo habría una trisomía de ese segmento. Se consideran más frecuentes y en términos generales menos nocivas que las deleciones, incluso las duplicaciones se consideran un evento molecular importante en la evolución, al favorecer la diversificación de genes.

Pueden deberse a entrecruzamiento desigual en las cromátides durante la meiosis y en este caso uno de los productos tiene una deleción. La duplicación puede deberse también a que uno de los progenitores tiene una traslocación, una inversión o un isocromosoma.

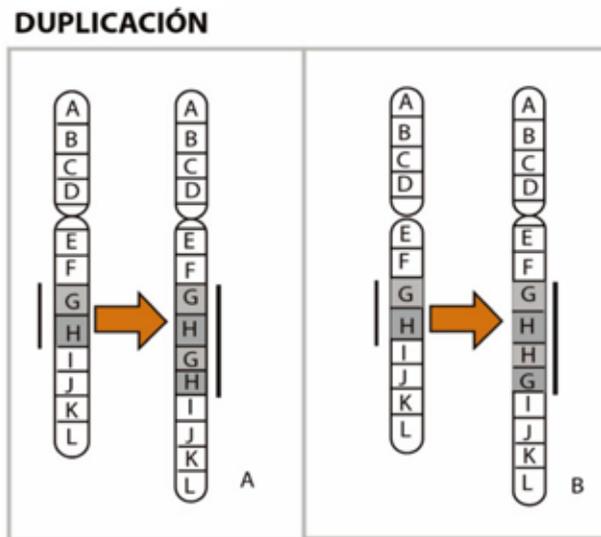


Figura 24. Duplicaciones.

Fuente: producción propia

Nomenclatura de las duplicaciones:

- 48, XY, dup (8) (p13 p27) El segmento duplicado del cromosoma 8 va desde p13 hasta p27.
- 46, XY, dup (8) (pter → p27 :: p13 → p27 :: p27 → qter)

DELECCIONES

Pérdida de un fragmento cromosómico, este segmento puede ser intersticial o terminal. Pequeñas deleciones han sido reportadas últimamente con el uso de técnicas citogenéticas de alta resolución, las cuales permiten obtener cromosomas más largos y con un mayor número de bandas (Figura 24).

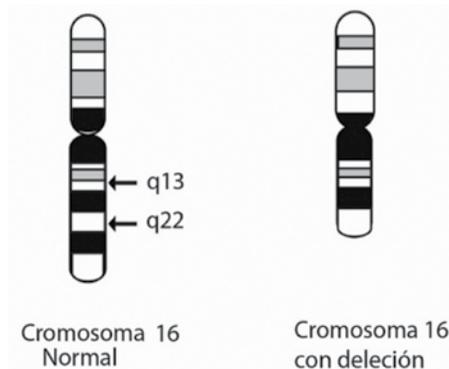


Figura 25. Deleción.

Fuente: producción propia

Se han reportado pequeñas deleciones asociadas a un síndrome específico:

- Síndrome de Prader Willy 15q-
- Síndrome de Beck- Wiedemann 11p-
- Síndrome de Angelman 15q-
- Síndrome de DiGeorge 22q-
- Síndrome de Miller- Dicker 17p-
- Síndrome de Langer Giedion 8q-
- Síndrome de Cri du Chat 5p-

También se han descrito una serie de tumores, en donde, uno de los eventos iniciales citogenéticos es una deleción son ejemplos: el retinoblastoma con una deleción homocigótica en 13 q14.4, el Tumor de Wills con una deleción 11p, el nefroblastoma con una deleción 11 p13 y el neuroblastoma con una deleción 1 p31.

Nomenclatura

Deleción terminal:

- 46, XX, del (3) (q24)
- 46, XX, del (3) (pter → q24:) Esto indica que el cromosoma 3 se ha roto y perdido su extremo desde la banda q24 hasta el final.

Deleción Intersticial:

- 46, XX, del (8) (q12 q28)
- 46, XX, del (8) (pter → q12 :q28 → qter)

CROMOSOMA EN ANILLO

Este es una consecuencia de una deleción terminal de los telómeros con la subsecuente asociación en forma circular (Figura 25). Estos cromosomas son pocas veces observables debido a su inestabilidad en el proceso de división celular.

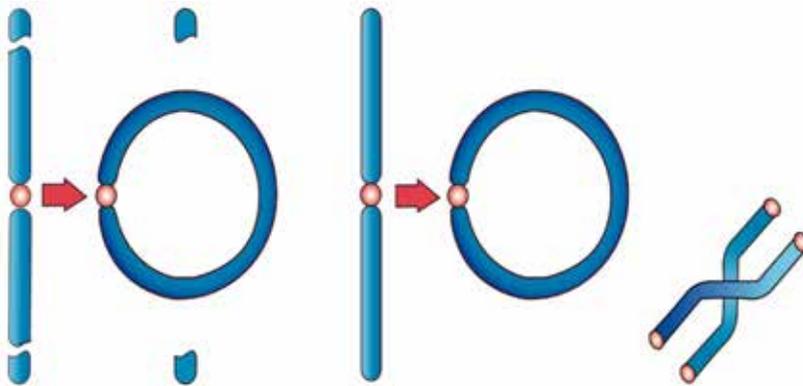


Figura 26. *Cromosoma en anillo.*

Fuente: producción propia

Nomenclatura del cromosoma en anillo:

- 46, XX, r (16) se refiere a una persona del sexo femenino con un cromosoma 16 en anillo.
- 46, XX, r (2) (p21q31)
- 46, XX, r (2) (p21 → cen → q31). La abreviatura cen se refiere al centrómero del cromosoma.

ISOCROMOSOMA

Normalmente los cromosomas durante el anafase se separan por sus cromatides hermanas de una manera vertical (Figura 26). En la formación de un isocromosoma la separación se hace de forma horizontal. Así se obtiene una copia idéntica de cada uno de los brazos del cromosoma y una deleción del otro brazo. Los más frecuentes se han reportado en los cromosomas sexuales X y Y. En el cromosoma X

se da tanto de brazo corto como de brazo largo, sin embargo, este último alcanza una mayor frecuencia, un buen porcentaje de individuos con síndrome de Turner reportan isocromosomas. En el cromosoma Y los de mayor porcentaje son los isocromosomas de brazo corto.

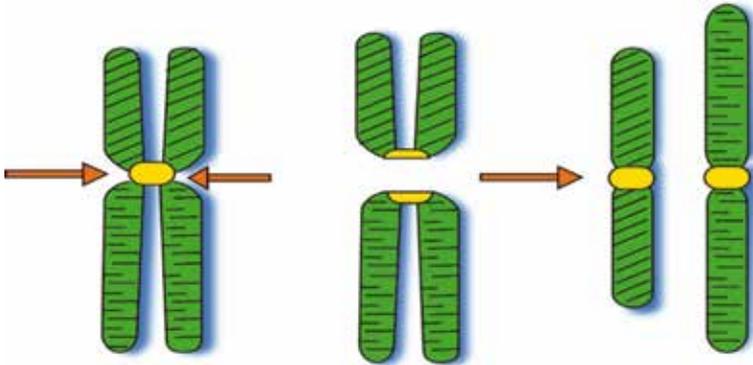


Figura 27. Isocromosoma.

Fuente producción propia

Nomenclatura:

- 46, X, i(X q) individuo del sexo femenino con un isocromosoma, en uno de sus cromosomas X.
- 46, X, i(X) (qter → cen → qter)
- 46, X, i(Y p)
- 46, X, i(Y) (pter → cen → pter)

CITOGÉNÉTICA MOLECULAR

La citogenética convencional utiliza diferentes técnicas de bandeo cromosómico para determinar las anomalías estructurales. Sin embargo, el nivel de resolución de las bandas alcanzado hasta el momento, con cromosomas prometásicos, se encuentra entre 500 y 600 bandas, por lo que se dificulta poder observar micro anomalías en la estructura del cromosoma, generalmente deleciones o duplicaciones. Con el aporte de la biología molecular en la actualidad, estos micro cambios pueden ser detectados en el cariotipo.

A partir de la década de los 90 surge la fusión definitiva entre la citogenética tradicional y la molecular, dando como resultado técnicas como la Hibridación

in situ fluorescente (FISH) o la Hibridación Genómica Comparada (CGH), con las cuales se pueden detectar anomalías crípticas o submicroscópicas en cariotipos normales, identificar cromosomas marcadores y potencializar la detección de anomalías presentes en los cariotipos complejos de individuos de cualquier especie, células tumorales, células en interfase y anormalidades en los gametos masculinos y femeninos.

La Hibridación genómica comparada ha comenzado a ser parte de casi de todos los métodos citogenéticos utilizados en la actualidad. El método se fundamenta en la estructura de doble cadena de la molécula de ADN, así como en la posibilidad de transcripción inversa de ARN a ADN. La doble cadena, puede ser desnaturalizada por calor o agentes químicos y bajo condiciones de renaturalización, hibridarse con un segmento complementario que contiene la secuencia problema, marcado con un fluorocromo o sustancia fluorescente, para permitir la identificación, en su sitio de origen, en los cromosomas mitóticos o meióticos o diferentes fases del ciclo celular.

De igual manera la posibilidad actual de la biología molecular de clonar segmentos grandes de ADN en librerías de cromosomas artificiales de bacterias (BACs), escoger cromosomas por densitometría de flujo, microdisectar cromosomas, tinciones comerciales de los cromosomas, en telómeros y centrómeros y obtención de sondas para la mayoría de las especies domésticas, han hecho del FISH una técnica muy útil y versátil que acompaña la citogenética convencional.

En términos generales la técnica de FISH consiste en la fijación, conservando la permeabilidad de la muestra en un portaobjeto, en segundo lugar, permitir la desnaturalización de la muestra, seguido de encuentro entre la muestra con la sonda; esta es un corto segmento de ADN, con una secuencia particular, que es complementaria a la que se detectará sobre el cromosoma y que está marcada en uno de sus extremos, por un colorante fluorescente (Figura 27). En este paso se da la hibridación, luego se realizan varios lavados para permitir limpiar el exceso de la sonda y finalmente la detección de la Hibridación a través de un microscopio de fluorescencia, equipado con diversos filtros para los diversos espectros de color.

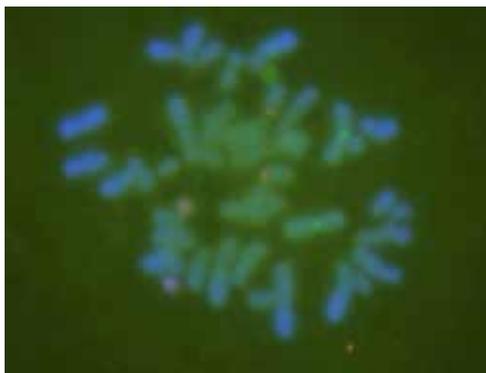


Figura 28. Muestra metafase con sondas Centroamérica para el cromosoma 1.

Fuente: producción propia

A partir de la técnica de FISH, ha sido posible la obtención de otras tantas, importantes en la definición sobre el cromosoma de segmentos muy pequeños. Estas técnicas se pueden resumir en:

- a. Localización de centrómeros y telómeros, utilizando sondas para los mismos y teñidos con fluorescencia.
- b. Pintado de cromosomas completos; utiliza sondas de cromosoma completo, marcadas con fluorocromos determinados, por lo que el cariotipo es un conjunto multicolor de cromosomas, cada pareja teñida con un color particular.
- c. Identificación de microdeleciones.
- d. Cariotipo multicolor o espectral, en donde se utilizan diferentes sondas marcadas con diversos colorantes y se obtiene un cromosoma multicolor Multi FISH o SKY-FISH.

Hibridización genómica comparada

A partir del desarrollo del FISH, se ha desarrollado durante las últimas dos décadas una técnica, que ha sido muy útil en citogenética clínica, ya que detecta una gran variedad de microdeleciones y otras anomalías cromosómicas, con una resolución de pocas pares de bases, esta técnica es denominada Hibridización genómica comparada.

El fundamento de esta técnica se basa en marcar todo el ADN de la muestra problema con un colorante de fluorescencia verde, al mismo tiempo también se marca el genoma de un individuo normal con un colorante de diferente color,

que generalmente es de color rojo, luego del marcaje, las dos muestras se desnaturalizan y luego se mezclan, en condiciones que permitan la Hibridización de ambos genomas marcados con diferentes fluorocromos, de tal manera, que el resultado de la Hibridización mostrará una tinción amarilla, como resultado de la competencia entre las dos secuencias; de la muestra y de la referencias y la Hibridización de los genomas complementarios. Cuando en la muestra problema tenga una Delección, se observará una zona con incremento de la señal será roja, no hay Hibridización, mientras que cuando el individuo o la muestra problema muestra una señal verde, en la zona de la duplicación se verá aumentada la señal del fluorocromo verde, es decir habrá mayor cantidad de ADN marcado con verde proveniente de la muestra problema o del individuo *propósitus*.

La Hibridización genómica comparada, no es útil para detectar translocaciones recíprocas, ya que en estas no hay pérdida de material genético, sino rearrreglo del mismo, por lo que no se observa pérdida ni ganancia de material genético observable con esta técnica de Hibridización (Figura 28).

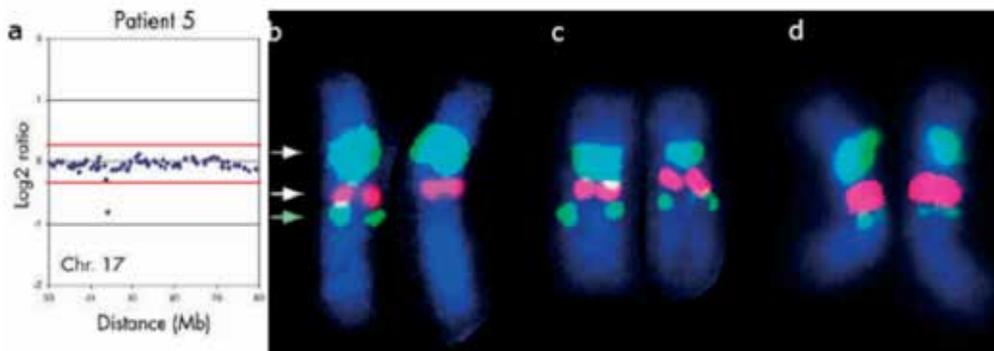


Figura 29. Muestra un ejemplo de HGC (hibridización genómica comparada y FISH), con lo cual se puede observar que el paciente 5 tiene una microdelección en la región subteloamérica del cromosoma 17.

Fuente: Shaw-Smith, C. et al. Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. Journal of Medical Genetics 41, 241-248.



CAPÍTULO 4

CITOGENÉTICA ANIMAL

En citogenética animal, la citogenética es una herramienta importante para la sanidad animal y la selección de reproductores. Mediante análisis cromosómicos se pueden escoger animales libres de anormalidades citogenéticas, las cuales en su mayoría son responsables de malformaciones, que amenazan la supervivencia del animal (generalmente aneuploidías) y baja de fertilidad (anormalidades relacionadas con traslocaciones balanceadas) o esterilidad (anormalidades citogenéticas relacionadas con los cromosomas sexuales).

De igual manera, la citogenética aplicada al estudio animal puede ser utilizada para el análisis de ambientes contaminantes utilizando las aberraciones cromosómicas como indicadores del grado de daño sobre el ADN de diferentes tipos de sustancias.

Además, el análisis citogenético es importante para dilucidar relaciones filogenéticas y por lo tanto contribuir con el estudio evolutivo de las especies. Un ejemplo importante y bien reconocido, es la fusión de los cromosomas 2 y 3 (reconocidos ahora como cromosomas 2a y 2b) del chimpancé (*Pan troglodytes*), cuya fusión formó el cromosoma 2 humano (Fan et al. 2002).

Las principales anormalidades encontradas en animales de especies domesticas son: la trisomía X, la monosomía X, los individuos XXY, el síndrome de reversión sexual e individuos quimera XX/XY, que corresponde a una condición medianamente frecuente en bovinos conocida como el síndrome de Freemartin.

La manera de estudiar las anormalidades citogenéticas en cualquier mamífero, es básicamente igual a la utilizada para el análisis de los cromosomas humanos, algunas pequeñas modificaciones tienen que ver con las diferentes temperaturas

corporales de los animales, que cambian las condiciones durante los procesos de cultivos celulares, cuando son utilizados, ya que en algunas especies como peces y reptiles puede no ser necesario recurrir a cultivos celulares para obtener cromosomas metafásicos.

La citogenética animal se centra en las siguientes tres grandes líneas de investigación (Iannuzzi, 2007):

- 1. Estudio de anomalías numéricas compatibles con la vida:** involucra todas aquellas alteraciones relacionadas con los cromosomas sexuales X y Y, ya sea cromosomas X supernumerarios o monosomías, translocaciones, isocromosomas, en general se observa que animales con más o menos cromosomas X, no muestran mayores malformaciones fenotípicas, pero si están relacionadas con esterilidad de las hembras, importante aspecto para la producción animal.
- 2. Citogenética ambiental:** se plantea como una posibilidad para el estudio de agentes contaminantes y/o mutagénicos en células o animales expuestos a ciertas sustancias o radiaciones que afectan el ADN, de tal manera que el grado de afección podría observarse a nivel cromosómico debido a la fácil obtención, observación y análisis de los cromosomas. En el microscopio, los daños cromosómicos pueden observarse como rupturas de cromosomas o cromátides, fragilidades, fragmentos, microcromosomas, etc., una alta frecuencia de daño cromosómico significará alta posibilidad de mutación.

Como se mencionó en capítulos anteriores, las primeras técnica utilizadas para elucidar la estabilidad o inestabilidad de los cromosomas, es el intercambio de cromátides hermanas (SCE), con esta técnica los cromosomas se tratan con 5-Bromodeoxiuridina (BrdU) un análogo de base, cuando está en el medio de cultivo la célula la utiliza para sintetizar ADN utilizando BrdU en cambio de timina, luego de dos ciclos de replicación en presencia de BrdU, todos los cromosomas aparecen teñidos con una cromátide oscura que contiene el ADN parental con timina, la otra se tiñe pálida que es la que ha incorporado BrdU, en un cariotipo normal se puede observar un número específico de intercambio entre las cromátides, que se evidencia al microscopio como un tablero de ajedrez con regiones pálidas y oscuras, cuando el número de intercambios sobrepasa el límite normal mayor será la inestabilidad del genoma y por lo tanto mayor la posibilidad de mutación. Esta técnica fue utilizada por Iannuzzi

y Perucatti (2004) para comprobar el daño sobre el ADN en ovejas expuestas a dioxina, los resultados confirmaron un alto porcentaje de fragilidad, inestabilidad y rupturas cromosómicas en células de los individuos analizados, así como un mayor porcentaje de abortos en los rebaños de las ovejas expuestas, comparados con los controles (Iannuzzi et al., 2004).

- 3. Citogenética Evolutiva:** la citogenética evolutiva permite estudiar los cambios dentro de los cromosomas a través del tiempo, si se determinan sintenias, ortologías y homología en diversos grupos taxonómicos.

Morfología de los cromosomas animales

La morfología de los cromosomas animales es básicamente la misma de los humanos se encuentran cromosomas metacéntricos, Submetacéntricos, acrocéntricos y telocéntricos, esta última morfología se refiere a los cromosomas en donde el centrómero ocupa la posición final del cromosoma (Figura 29).



Figura 30. Cromosoma telocéntrico.

Fuente: producción propia

Citogenética de algunas especies domésticas

El estudio de la citogenética animal es tan amplio, como animales existen, cada uno de ellos merece un capítulo individual, que se sale del alcance de este trabajo, por esta razón este capítulo hará referencias únicamente a la citogenética de los animales domésticos más estudiados desde el punto de vista citogenético y de amplia utilidad zootécnica.

En mamíferos en general el número de cromosomas es determinado por la fórmula $2n$, es decir dos copias del set haploide, de acuerdo a la especie, en algunas especies este número puede ser modificado de acuerdo a la presencia de cromosomas B.

La determinación del sexo, en los mamíferos, es un proceso complejo determinado por la acción de varios genes, en diferentes momentos del desarrollo embrionario (Eggers S, Sinclair A., 2012), generalmente la mayoría de estos genes están localizados en los autosomas, y pocos sobre los cromosomas sexuales (X, Y), sin embargo, existe sobre el cromosoma Y un gen importante implicado en la diferenciación sexual masculina o de macho, llamado el gen SRY (región determinante del sexo Y) que está asociada en la determinación de los caracteres masculinos y en la producción de espermatozoides, otro gen que participa en la diferenciación sexual del macho es llamado AR (receptor de andrógeno), localizado sobre el cromosomas X, su función está asociada al desarrollo de los conductos de Wolff y los genitales externos. En las hembras se han identificado algunos de genes asociados a la diferenciación sexual localizados sobre diferentes autosomas, el gen RSPO1 (R-espondina 1) que participa en la diferenciación del ovario, WNT-4 un gen involucrado en señalización celular, el gen CTTNB1 (beta catenina) tiene funciones en la proliferación de células stem, el gen FOXL2, al realizar un análisis de redes de asociación de estos genes se observó que determinan funciones se asocian a genes en embriogénesis de órganos, diferenciación sexual femenina, regulación de procesos reproductivos, estos genes forman una red de asociación con otros genes (Figura 30) que en su mayoría tienen funciones de reguladores de la transcripción y receptores de estrógenos, como el ESR2.

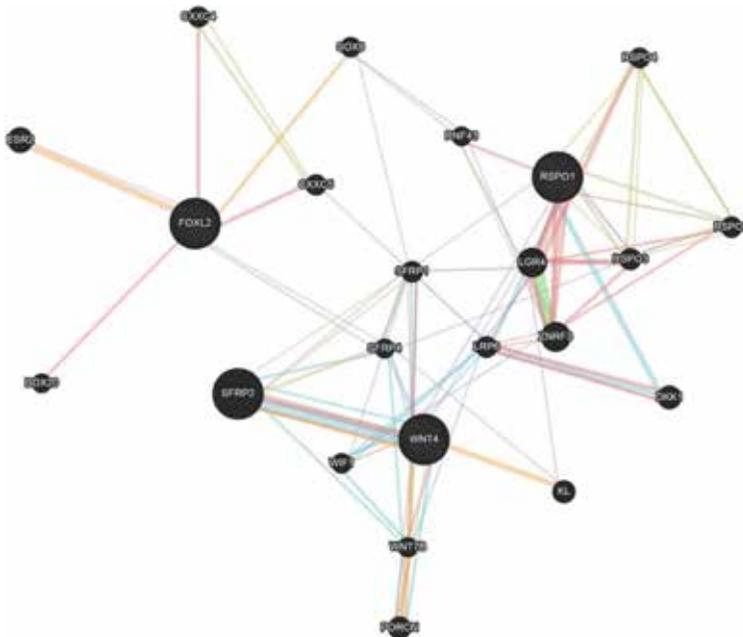


Figura 31. Red de genes asociados con la diferenciación de sexo.

Fuente producción propia.

Los desórdenes asociados a los cromosomas sexuales y la determinación sexual que es importante en animales ya que afecta de manera directa la fertilidad de los animales, se puede clasificar en tres categorías, las cuales han sido adaptadas de la clasificación en humanos, en primer lugar se encuentran las anomalías que afectan de igual manera los individuos XX y XY, en segundo lugar las anomalías que afectan los individuos XX y en tercer lugar los que afectan los individuos XY (Pasterski V et al, 2010).

Los desórdenes que comprometen juntos cromosomas sexuales generalmente son aneuploidías, rearrreglos estructurales y quimerismo. Los desórdenes que involucran los individuos XX, se constituyen en las anomalías más frecuentes y ocurren en muchas especies como cabras, cerdos, caballos y perros, se manifiestan por la presencia de testículos u ovotestis, y un útero con oviductos y conductos deferentes, cuando falta el gen SRY y los síndromes asociados a los individuos XY, se incluyen anomalías mono genéticas, que incluye el síndrome de insensibilidad a andrógenos, el síndrome de persistencia de conductos Mullerianos, estos síndromes suelen ser bastante complejos en la clínica y en el diagnóstico, incluyen criptorquidia e hipostasias.

En la siguiente tabla se incluye la morfología de los cromosomas sexuales de diferentes especies domésticas.

Tabla 2. Morfología de cromosomas sexuales. Fuente: Tomado con modificación de *Insights from Animal Reproduction*. InTech. ISBN: 978-953-51-2268-5. Capítulo 9.

Especie	2n	Morfología de los cromosomas sexuales XY
Vacas	60	SM
Ovejas	54	A M
Cabras	60	A M
Cerdo	38	M M
Caballo	64	SM A
Perro	78	SM M
Gato	38	M M

M= metacéntrico, SM= Submetacéntrico, A= Acrocéntrico

Bovinos

Citogenéticamente la tribu bovini tiene características similares en cuanto al número y morfología de sus cromosomas. *Bos* y *Bison* tienen un cariotipo con $2n=60$, gaur $2n=58$, el búfalo africano tiene un cariotipo $2n=52$, las dos especies de búfalo de agua se diferencian en su cariotipo, el búfalo de pantano tiene $2n=48$ y el búfalo de río tiene $2n=50$. Estas diferencias en cuanto al número de cromosomas probablemente impidan la hibridación. En el ganado bovino tanto el *Bos indicus* como el *Bos taurus* tienen $2n=60$ con 58 cromosomas acrocéntricos (Figura 31). La mayor diferencia entre taurinos y cebuinos es el cromosoma Y, en los taurinos el cromosoma Y tiene una morfología submetacéntrica, mientras que en el Cebú el cromosoma Y es acrocéntrico (Ortega, 2008).

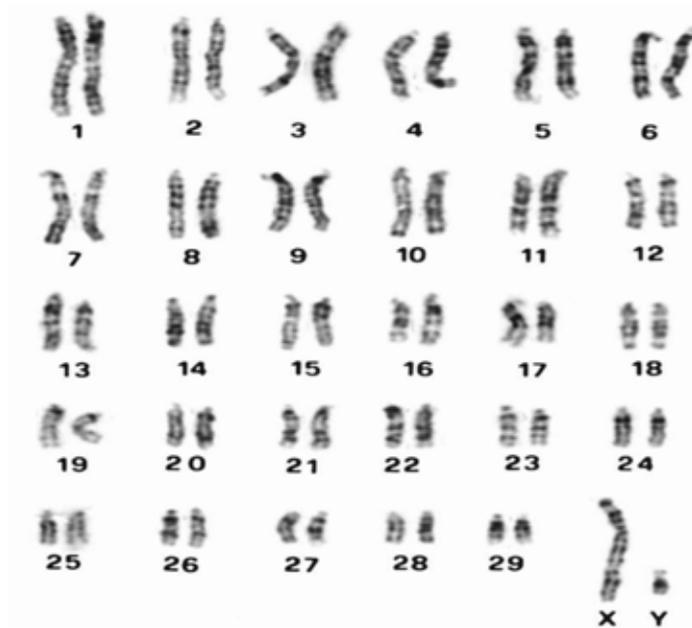


Figura 32. Cariotipo bovino con Bandas G normal. Fuente: Lannuzzi, I. 1996. G- and R-banded prometaphase karyotypes in cattle (*Bos taurus* L.). *Chromosome Research* 1996, 4, 448—456

Las anomalías estructurales suelen ser comunes dentro de los animales domésticos, en los bovinos, por ejemplo, todos sus cromosomas son acrocéntricos y por lo tanto tienen mayor posibilidad de sufrir translocaciones robertsonianas. Una de las más reconocidas es la translocación robertsoniana que involucra los cromosomas 1 y 29. Fue descubierta en ganado pardo suizo y se ha reportado en más de 40 razas de bovinos (rob 1;29) (Popescu and Pech, 1991), afecta especialmente a la raza portuguesa Barrosa, en donde aproximadamente un 70% de los

individuos son portadores (Rangel-Figueiredo, T., Iannuzzi, L., 1993). Esta translocación disminuye la fertilidad entre el 5 y el 10%, y produce cerca de un 3% de oocitos y espermatozoides desbalanceados (Bonnet et al., 2008).

Otro tipo de alteraciones cromosómicas reportadas en los bovinos, son las translocaciones recíprocas, que involucran diferentes cromosomas bovinos. Recientemente, utilizando técnicas de citogenética molecular como FISH e Hibridación genómica comparada se ha encontrado que la causa de la hipoplasia bilateral de ovario en bovinos es de origen citogenético. Con el uso de estas técnicas de citogenética molecular se encontró que el desorden es producido por un segmento de aproximadamente 500 pares de bases que se encuentra en condición homocigota en los animales con la patología, este segmento se duplica y se transloca del cromosoma 6 de *Bos taurus* (BTA6) al cromosoma 29 (BTA29). En la figura 32 se observa un ejemplo de una translocación no recíproca que involucra los cromosomas 13 y 26, se observa un cromosoma 26 de tamaño mucho menor al normal, esta translocación disminuye la fertilidad del individuo que tiene la translocación debido a la posibilidad de producción de gametos anormales.

Otras translocaciones robertsonianas y recíprocas reportadas en bovinos y su fenotipo, se describen en la tabla No. 3.

Tabla 3. *Translocaciones recíprocas en bovinos.* Fuente: tomado de M.L. Kochneva, et al 2011. *Agricultural Biology*, No. 6, p. 84-89. 2011.

Translocación	Fenotipo	Referencia
rcp(10; 11)(41; 14)	Reducida fertilidad	B. Mayr et.al.1979
t(8q-; 27q+) doble translocación	Esterilidad	G.G. De Schepper et.al., 1982
rcp(8; 15)(21; 24)	Fenotipo normal	B. Mayr et. al, 1983
rcp(1; 8; 9)(q43; q13; q26)	Reduce fertilidad	A. Kovacs et.al, 1992
rcp(8; 13)(q11; q24)	Esterilidad	H.A. Ansari et.al., 1993
rcp(X; 1)(42; 13)	Fenotipo normal	B. Mayr et.al. 1983
rcp(12; 17)(q22; q14)	Reduce fertilidad	A. Ducos et.al.2000
rcp(1; 5)(q21 qter; q11 q33)	Esterilidad	L. Iannuzzi et.al, 2001
rcp(Y; 9)(q12.3; q21.1)	Esterilidad	L. Iannuzzi et.al.,2001
rcp(9; 11)(q27; q11)	Reducida fertilidad	L. De Lorenzi et.al.2007
t(4; 7)(q14; q28)	Fenotipo normal	L. De Lorenzi et.al.2010

*rcp: hace referencia a translocación recíproca y t= translocación

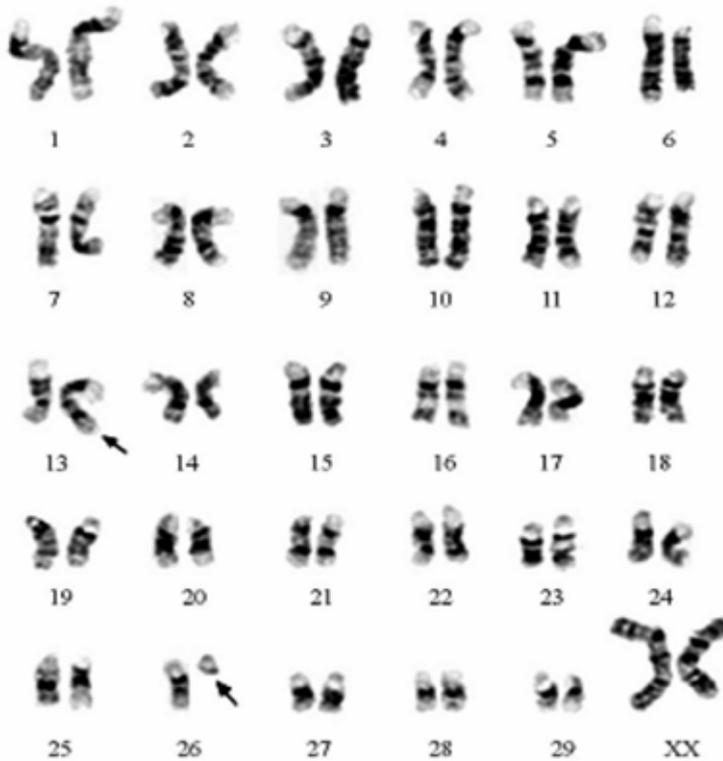


Figura 33. Ejemplo de translocación bovina 13;26.

Fuente: tomado de M.L. Kochneva, et al 2011. *Agricultural Biology*, No. 6, p. 84-89.

En bovinos existe un síndrome ampliamente descrito llamado el síndrome de Freemartin, este síndrome representa una condición intersexual en los bovinos y otras especies domésticas, se conoce generalmente en gemelos heterocigotos, en donde hembra de los gemelos porta un quimerismo al intercambiar células a través de conexiones vasculares entre la placenta, la constitución genética de la quimera es 60, XXXY y presenta masculinización de tracto reproductivo en diferentes grados (Padula, 2005), al intercambiar células el otro gemelo también es quimeras, sin embargo los genitales son normales, pueden presentar pobre calidad del semen y condición de infertilidad o baja fecundidad. Otras anomalías estructurales y numéricas como las translocaciones 4/21, 1/29, 6/1 además de la trisomía XXY, pueden coincidir con el fenotipo del síndrome de Freemartin. Este síndrome representa la forma más frecuente de intersexualidad encontrada en ganado bovino, también es encontrado en cabras y ovejas.

El síndrome de Freemartin surge a partir del intercambio vascular de hormonas en la placenta de una gestación gemelar, en donde los hermanos son de sexos diferentes, es decir uno es XY y el otro XX, dando lugar a quimeras. El intercambio de hormonas que determinan la diferenciación sexual en el macho, como la hormona antimülleriana y andrógenos, produce que las gónadas del feto de la hembra tengan una pobre diferenciación y alteraciones en el trato genital de la misma, mientras que el embrión masculino sufre menos defectos en sus órganos genitales y gónadas, pero en este se observa baja fertilidad (Esteves A, Bage R y Carreira, 2012).

Porcinos

El genoma de los porcinos (*Sus scrofa*), incluye especies con diferente número diploide de cromosomas, dentro de este grupo que incluye al cerdo doméstico y el salvaje, existe una variación e inestabilidad en el número de cromosomas. Este grupo ha sido ampliamente estudiado con citogenética convencional y molecular, la citogenética convencional mostró que el cariotipo de los cerdos contiene $2n=48$ cromosomas, para *S. s. doméstica*, mientras que para *S. s. scrofa* el número cromosómico es $2n = 38, 39$ o 40 , con 36 autosomas y dos cromosomas sexuales. Los estudios realizados en muchas partes del mundo con varias razas de cerdos muestran que existen más de 200 defectos cromosómicos (Czech, et al. 2016), se estiman cerca de 150 translocaciones recíprocas, cuatro translocaciones robertsonianas, una fusión en tándem y cerca de una docena de inversiones, se ha reportado quimerismo y mosaicismo, algunas aneuploidias (39, XYY, 39,XXY, 37, X, 40, XXXY), la translocación robertsoniana (15:17) se ha demostrado en diferentes animales de cerdos domésticos mostrando un cariotipo ($2n=36-38$) debido a la fusión de estos dos cromosomas.

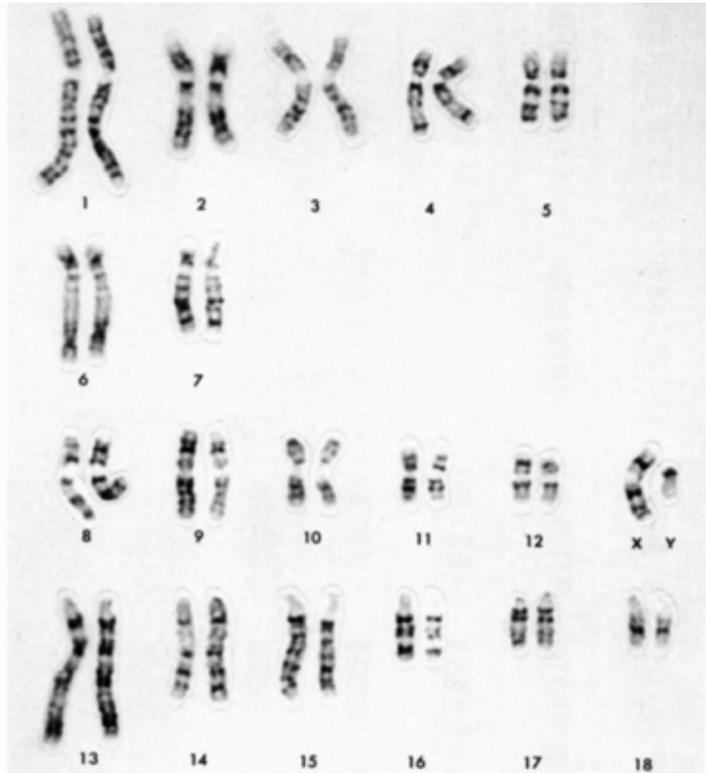


Figura 34. Cariotipo normal de cerdo tinción Giemsa.

Fuente: Gustavsson I. 1988. Standard Karyotype of the domestic pig. *Hereditas* 109: 151-157.

Algunas de las translocaciones recíprocas descritas son: rep(14;17), rep(3;5) (p1.3;q2.3), rob(6;13) (p1.5;q4.1), rob(13;17) (q4.1;q11), rep(4;6) (q2.1;q2.8), rep(2;14) (q1.3;q2.7). En todos los organismos portadores de la translocación la fertilidad y/o fecundidad es reducida.

Al igual que en los bovinos, las translocaciones robertsonianas reportadas en cerdos, disminuyen la fertilidad, sin reportar otros tipos de malformaciones. Las más reportadas y principalmente descritas son: rob(1;17), rob(14;15), rob(14;17). La translocación Robertsoniana reportada con mayor frecuencia en cerdos es la translocación que involucra los cromosomas 13 y 17, la cual no se manifiesta con anomalías fenotípicas, pero sí con abortos tempranos, esterilidad y camadas de muy pocos individuos (Pinton et al., 2009).

Ovejas

El cariotipo de *Ovis aries* consta de 52 autosomas y 2 cromosomas sexuales ($2N=54$), ha sido una especie ampliamente estudiada desde la citogenética molecular con técnicas que incluyen mapas comparativos, para buscar sintenias entre cromosomas humanos y de ovejas. A nivel citogenético, la mayor anomalía citogenética encontrada en ovejas es la translocación ya sean robertsoniana o recíprocas. Dentro de las translocaciones recíprocas las más frecuentemente reportadas involucran las translocaciones: rep (5;26), rep (8;11) y rep (7;15).

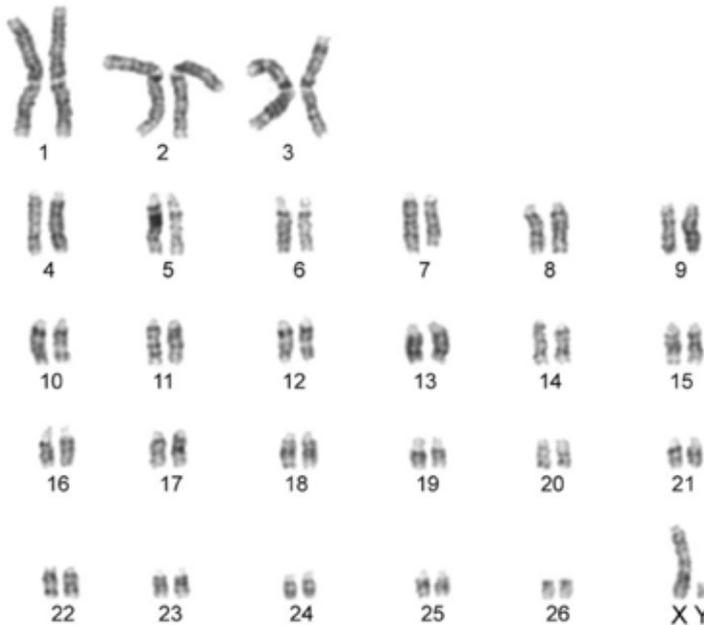


Figura 35. Cariotipo normal de ovejas – tinción Bandas G.

Fuente: Ravichandran M. A. et al. 2015. Comparative Cytogenetic study of Garole and Bonpala Breeds of Sheep. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. Vol 10 (2) 48-61.

Cabras

En cabras, de igual manera, las translocaciones recíprocas o robertsonianas, se han sido reportadas. Dentro de las más comunes son:

- rep (5;15)
- rep (6;17)
- rep (2;12)
- rep (6;15)
- rep (10;12)
- rep (3;17)

Todas las anteriores han sido reportadas en la raza Saanen, especialmente en Europa, Israel y Brasil. En estudios citogenéticos realizados por Goncalves et al (1992) se encontró que el 51% de los animales con problemas reproductivos tienen algún tipo de anomalía citogenética numérica, especialmente poliploidías y mosaicos diploidías/tetraploidías.

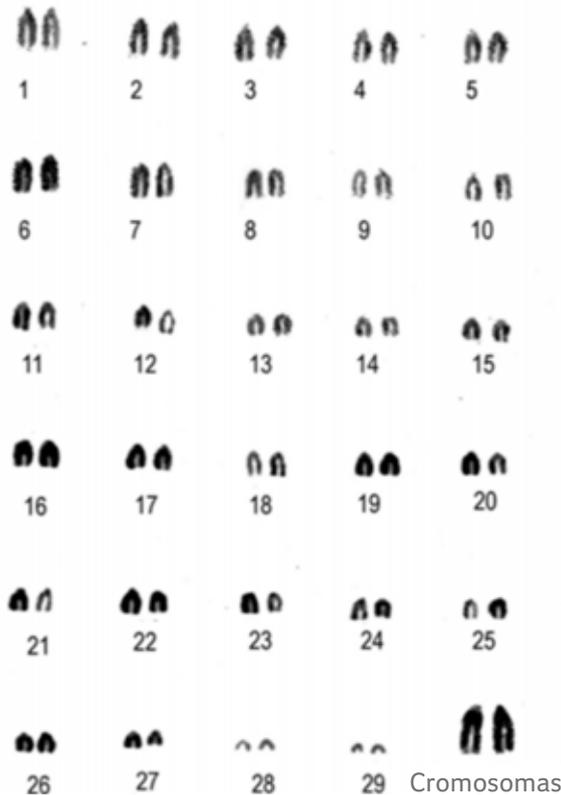


Figura 36. Cariotipo normal de cabras teñido con bandas G-

Fuente: Das B and Das D. 2011. Karyotype of Assam Local Goat (*Capra hircus*). *Indian J. Anim. Res.*, 45(2): 147:149.

PROTOCOLO GENERAL PARA LA OBTENCIÓN DE CROMOSOMAS DE MAMÍFEROS

El siguiente protocolo ha sido utilizado con éxito para realizar cariotipos humanos, se han obtenido cromosomas metafásicos de alta calidad. Se recomienda su utilización para aquellos investigadores que quieran implementar técnicas de citogenética convencional en sus laboratorios.

CULTIVO DE LINFOCITOS

Toma de muestra

Con una jeringa desechable, la cual debe contener aproximadamente 0.01 ml de heparina (anticoagulante), tomar una muestra de sangre periférica de 5ml teniendo el cuidado de mantener siempre aséptica esta muestra. Homogenizar el contenido de la jeringa mezclando suavemente.

Siembra:

Materiales y reactivos

- Cabina de flujo laminar o cámara estéril.
- Incubadora mantenida a una temperatura de 37°.
- Frascos de cultivo estériles.
- Tapones para frascos estériles.
- Jeringas o pipetas, para dispensar los medios.
- Tijeras.
- Medio de cultivo MEM o RPMI.
- Suero bovino fetal.
- Fitohemaglutinina.

Procedimiento:

En un frasco de cultivo dispensar 5 ml de medio, 0.5 ml de suero bovino fetal (10%) y 0.1 ml de fitohemaglutinina. Agregar 12 gotas de sangre, homogenizar e incubar durante 72 horas a 37°.

Recolecta de las mitosis:

Materiales y reactivos:

- Centrifuga.
- Incubadora.
- Congelador.
- Pipetas Pasteur
- Tubos de ensayo.
- Jeringas de tuberculina.
- Láminas y laminillas.
- Colchicina estéril concentración STOCK 1 mgr/ml, solución de trabajo se hace tomando 0,1 ml de solución Stock y adicionando 19.9 ml de agua destilada estéril.

- Solución hipotónica de KCl 0,075M mantener a 37 °.
- Fijador Carnoy se prepara: 3 partes de metanol por 1 parte de ácido acético glacial. Se deja en el congelador.

Procedimiento:

- Una vez cumplidas las 72 horas de incubación, destapar el cultivo y agregar 0.1 ml de una solución de colchicina de 0.5 mgr/ml. incubar nuevamente durante 30 minutos.
- Dispensar el contenido del frasco en un tubo de ensayo y centrifugar durante 10 minutos a una velocidad de 2000 revoluciones por minuto.
- Descartar el sobrenadante y mezclar suavemente. Añadir 7 ml de solución hipotónica (KCl 0,075 M) resuspendiendo el contenido del tubo muy suavemente. Incubar a 37° durante 10 a 15 min (el tiempo es variable dependiendo de las condiciones estandarizadas en cada laboratorio.)
- Sacar de incubación y agregar 1 ml de solución fijadora fría. Homogenizar el contenido y centrifugar por 10 mm a 2000 r.p.m.
- Descartar el sobrenadante con una pipeta Pasteur, resuspender y agregar 10 ml de fijador. Colocar en el congelador durante 20 min.
- Descartar el sobrenadante y agregar 10 ml de fijador, centrifugar durante 10 min a 2000 r.p.m. y repetir este paso una o dos veces más.
- Descartar el sobrenadante y dejar el botón celular de aproximadamente 1 ml, mezclar y tomar en una pipeta Pasteur el contenido. Sobre una lámina previamente limpia agregar de 6 a 10 gotas y dejar secar al aire.
- Si el laboratorio cuenta con un microscopio de contraste de fase, observar la lámina sin colorear para chequear el índice mitótico (número de mitosis por número de células expresado en 100%) sino ir al protocolo número dos para tinción con Giemsa.

Observaciones

En este protocolo se utiliza la colchicina para inhibir la formación del huso mitótico y permitir obtener los cromosomas en metafase. Esta juega un papel importante en la condensación de los cromosomas, de tal manera que un error en la concentración o en el tiempo de exposición, puede resultar en unos cromosomas demasiado cortos o largos.

La solución hipotónica permite hinchar la célula, sin disgregar la mitosis por esta razón la resuspensión debe ser muy suave mientras las células estén en esta solución.

El fijador es el encargado de limpiar los residuos y permitir la adhesión de las células y mitosis a la lámina. Es recomendable utilizarlo lo más frío posible.

CONSEJO

Al observar las metafases al microscopio un indicativo de un buen índice mitótico es encontrar cuatro metafases por campo (objetivo de 10X), observe la calidad de cada una de estas mitosis que tan separadas están, que tan largos son los cromosomas recuerde que de estas mitosis se harán fotografías y que de ello va a depender un análisis adecuado, es por esto que una buena mitosis será aquella que usted pueda contar y observar fácilmente.

Si los cromosomas están muy juntos, el extender unas láminas al calor de un mechero puede funcionar.

Si la tinción es muy pálida, trate de colorear las láminas eliminando el buffer. Si los cromosomas están muy cortos trate un nuevo cultivo disminuyendo la concentración de la colchicina o el tiempo de exposición a está.

Si los cromosomas están dispersos y no puede contabilizar una mitosis complete, intente un nuevo cultivo mezclando muy suavemente durante la hipotónica, Recuerde que el índice mitótico es el resultado de dividir el número total de mitosis sobre el número de células observadas por 100.

$$\text{I.M.} = \frac{\text{número mitosis} \text{ ______ } \times 100}{\text{Número total de células}}$$

Por último, si va a repetir el cultivo asegúrese que la sangre que va a utilizar esta fresca o refrigerada.

Literatura citada

- Binayke, A., Mishra, S. 1, Suman, P., Das, S., Chander, H. (2019). Awakening the "guardian of genome": reactivation of mutant p53. *Cancer Chemother Pharmacol.* Jan; 83(1):1-15. doi: 10.1007/s00280-018-3701-x.
- Bonnet Garnier, A., Lacaze, S., Beckers, J.F., Berland, H.M., Pinton, A., *et al.* (2008). Meiotic segregation analysis in cows carrying the t(1;29) Robertsonian translocation. *Cytogenet. Genome Res.* 120:91-96.
- Caspersson, T., Zech, L., Johansson, C. (1970). *Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes.* *Exp Cell Res* 60: 315-319, 1970.
- Das B and Das D. (2011). *Karyotype of Assam Local Goat (Capra hircus).* *Indian J. Anim. Res.*, 45(2): 147:149
- Ducos, A., Pinton A, Berland HM., Seguela A, Blanc MF., Darre Aafke and Darre R. (1998). Five new cases of reciprocal translocation in the domestic pig. *Hereditas* 128: 221 -229.
- Durkin, K., Coppieters, W., Drögemüller, C., Ahariz, N., Cambisano, N., *et al.* (2012). Serial translocation by means of circular intermediates underlies colour sidedness in cattle. *Nature* 482:81-84.
- Esteves A, Bage R y Carreira. (2012). *Ruminants: Anatomy, Behavior and Diseases.* Capítulo VII. ISBN: 978-1-62081-064-4. *Nova Science Publishers, Inc.* pp 100-119.
- Eggers S, Sinclair A. (2012). Mammalian sex determination—insights from humans and mice. *Chromosome Res.* 20: 215-238.
- Fan, Y., Linardopoulou, E., Friedman, C., Williams, E., & Trask, B. J. (2002). Genomic Structure and Evolution of the Ancestral Chromosome Fusion Site in 2q13-2q14.1 and Paralogous Regions on Other Human Chromosomes. *Genome Research*, 12(11), 1651-1662. <http://doi.org/10.1101/gr.337602>
- Ford C.E., Jones K., Polani P., de Almeida J., Briggs J. (1959). A sex chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner Syndrome). *Lancet*, 1, 711-713.
- Gustavsson I. (1988). Standard Karyotype of the domestic pig. *Hereditas* 109: 151-157.
- Kalantry, S. (2011). Recent Advances in X-Chromosome Inactivation. *J. Cell. Physiol.* 226: 1714-1718.
- Kemkemmer, C., Kohn, M., Kehrer-Sawatzki, H. *et al.* (2006). Reconstruction of the ancestral ferungulate karyotype by electronic chromosome painting (E-painting) *Chromosome Research.* 14: 899. <https://doi.org/10.1007/s10577-006-1097-7>.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128:693-705.
- Galeano, L. y Guevara, G. (2007). Alteraciones cromosómicas estructurales. *Rev. Cienc. Salud.* Bogotá (Colombia) 5 (2): 26-36, julio-septiembre de 2007.
- Gautier J, Norbury C, Lohka M, Nurse P, Maller J. (1988). Purified maturation-promoting factor contains the product of a Xenopus homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Cell* 54:433-439.

- Gribnau J. and J Anton Grootegeod. (2012). Origin and evolution of X chromosome inactivation. *Current Opinion in Cell Biology*, 24:397–404.
- Gonçalves, H.C., Jorge, W. and Cury, P.R. (1992). Distribution of a Robertsonian translocation in goats. *Small Ruminant Res.* 8: 345-352.
- Iannuzzi, L. (2007). Cytogenetics in animal production. *Italian Journal of Animal Science*, 6:sup1, 713-715. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.4081/ijas.2007.1s.23>
- Iannuzzi, L., Perucatti, A., Di Meo, G.P., Polimeno, F., Ciotola, F., Incarnato, D., Peretti, V., Caputi-Jambrenghi, A., Pecoraro, A., Manniti, F., D'Alessandro, A., Vonghia, G. (2004). Chromosome fragility in two sheep flocks exposed to dioxins during pasturage. *Mutagenesis* 19:355-359.
- Iannuzzi L. (2007). Cytogenetics in animal production. *Italian Journal of Animal Science*, 6:sup1, 713-715. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.4081/ijas.2007.1s.23>.
- Lane, DP. (1992). Cancer.p53, guardian of the genome. *Nature.* ;358:15-6
- LYON MF. (1961). Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature.* Apr 22;190:372-3.
- Kociucka B, Szczerbal I, Bugaj S, Orsztynowicz M, Switonski M. 2014. A high incidence of adjacent-1 meiotic segregation pattern, revealed by multicolor sperm FISH, in a carrier boar of a new reciprocal translocation t(6;16)(p13;q23). *Cytogenet. Genome Res.* 142:21–27
- M.L. Kochneva, A.N. Zhidenova, L.S. Biltueva, TYu. Kiseleva (2011). A new case of reciprocal translocation rcp(13; 26) in cattle. *Agricultural Biology*, 6, p. 84-89.
- Malumbres M., Barbacid M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* 30:630–641.
- Malumbres M, Barbacid M. (2007). Cell cycle kinases in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 17:60– 65.
- Malumbres Marcos. (2011). Physiological relevance of cell cycle kinases. *Physiological Review.* 91: 973-1007. Doi:10.1152/physrev.00025.2010
- Martins L.A- C.P. (1999). Did sutton and boveri propose the so-called sutton-boveri chromosome hypothesis? *Genetics and Molecular Biology*, 22, 2, 261-271.
- Mathews T, Navsaria D, Verma R. (1992). Prenatal cytogenetic diagnosis of 1,400 consecutive amniocenteses. *Gynecol Obst Invest*; 34(2):122–3.
- Mota, Lúgia.Souza Lima, Silveira da., and Silva, Rosana Ap. Bicudo da. (1998). Centric fusion in goats (*Capra hircus*): Identification of a 6/15 translocation by high resolution chromosome banding. *Genet. Mol. Biol. [online]*, vol.21, n.1 [cited 2017-09-08], pp.-. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47571998000100012&lng=en&nrm=iso>. ISSN 1415-4757. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47571998000100012>.
- Nurse P. (2000). A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* 100:71–78.
- Payan-Carreira Rita. Ed. (2016). Insights from Animal Reproduction. *InTech* 68-5. Capítulo 9.
- Pasterski V, Prentice P, Hughes IA (2010). Impact of the consensus statement and the new DSD classification system. *Best Practice Res Clin Endocrinol Metab.* 24: 187–195.
- Przanowski P, Waško U, Bhatnagar S. (2018). Novel molecular players of X chromosome inactivation: new technologies and new insights. *J Transl Genet Genom*;2:2

- Pinton A, Calgaro A, Bonnet N, Ferchaud S, Billoux S, *et al.* (2009). Influence of sex on the meiotic segregation of a t(13;17) Robertsonian translocation: a case study in the pig. *Hum. Reprod.* 24:2034–43.
- Putnam, N. H., Srivastava, M., Hellsten, U. and *et al.* (2007). Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization. *Science*, 317, 86–94.
- Rangel-Figueiredo, T., Iannuzzi, L. (1993). Frequency and distribution of rob (1;29) in three Portuguese cattle breeds. *Hereditas* 119:233–237
- Rangel-Figueiredo, T., Iannuzzi, L. (1993). Frequency and distribution of rob (1;29) in three Portuguese cattle breeds. *Hereditas* 119:233–237
- Raudsepp T, Chowdhary BP. (2011). Cytogenetics and chromosome maps. In: *The Genetics of the Pig*, ed. MF Rothschild, A Ruvinsky, pp. 134–78. New York: CAB Int.
- Ravichandran M. A. *et al.* (2015). Comparative Cytogenetic study of Garole and Bonpala Breeds of Sheep. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. Vol. 10 (2) 48–61.
- Ryan JA. (2005). 1910 to 1923—Carrel and the early days of tissue culture. Corning. [Internet]. Available form: http://www.corning.com/lifesciences/us_canada/en/about_us/cell_culture_history_1910.aspx [Accessed: 2014-01-20]
- Rodríguez L. y col. (2004). El ciclo celular regulación e importancia en el cáncer. *Biotecnología Aplicada* 2004, 21:60–69.
- Rodríguez Hernández CO, Torres García SE, Olvera Sandoval C, Ramírez Castillo FY, Muro AL, Avelar-González FJ, Guerrero Barrera AL. (2014). Cell culture: history, development and prospects. *International Journal of Current Research and Academic Review*; 12: 188–200.
- Schuler D, Kiss A, Fábíán F. (1969). Chromosomal peculiarities and “in vitro” examinations in Fanconi’s anaemia. *Humangenetik*. 7: 314–322.
- Souza AG, Ferreira ICC, Marangoni K, Bastos VAF, Goulart VA. (2016). Advances in cell culture: more than a century after cultivating cells. *Journal of Biotechnology & Biomaterials*; 6: 1–4. doi:10.4172/2155-952X.1000221
- Sun B, Ross SM, Rowley S, Adeleye Y, Clewell R. (2017). Contribution of ATM and ATR kinase pathways to p53-mediated response in etoposide and methyl methanesulfonate induced DNA damage. *Environmental and Molecular Mutations*. Vol 58 Issue 2 pag. 72–83.