

Tesis de Posgrado

Heteromorfismo e inestabilidad cromosómica en una población leucémica

Labal, Mabel Lilian

1982

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Labal, Mabel Lilian. (1982). Heteromorfismo e inestabilidad cromosómica en una población leucémica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1757_Labal.pdf

Cita tipo Chicago:

Labal, Mabel Lilian. "Heteromorfismo e inestabilidad cromosómica en una población leucémica". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1982.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1757_Labal.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

HETEROMORFISMO E INESTABILIDAD CROMOSOMICA
EN UNA POBLACION LEUCEMICA

MABEL LILIAN LABAL

Padrino de Tesis
Dra. Sonia Brioux de Salum

Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Citogenética
Instituto de Investigaciones Hematológicas "Mariano R. Castex"
Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires

Buenos Aires
1982

1757
Ej. 2.

PADRINO DE TESIS

Dra. Sonia Brioux de Salum

- Jefe del Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Citogenética del Instituto de Investigaciones Hematológicas 'Mariano R. Castex' de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires
- Miembro de la Carrera del Investigador (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas -CONICET-).

CONSEJERO DE ESTUDIOS

Dr. Osvaldo R. Vidal

- Profesor Titular de la Cátedra de Citogenética, Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (UBA).
- Miembro de la Carrera del Investigador (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas -CONICET-).

Deseo expresar mi agradecimiento al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y al Instituto de Investigaciones Hematológicas 'Mariano R. Castex' de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires, Instituciones que han permitido desarrollar mis investigaciones, como así también, manifestar mi reconocimiento a todas las personas que, de una u otra manera, contribuyeron en la realización de este trabajo, y en especial, a las siguientes personas:

Al Dr. Alfredo Pavlovsky, por haberme brindado la oportunidad de trabajar en el prestigioso Instituto que el dirige.

A la Dra. Sonia B. de Salum, quien como Padrino de Tesis, dirigió mis investigaciones y apoyó este trabajo en todo momento.

Al Dr. Osvaldo R. Vidal, quien como Consejero de Estudios, me guió en la Carrera del Doctorado.

A la Dra. Christiane Dosne de Pasqualini, por su constante estímulo desde mi iniciación como becaria en este Instituto.

Al Dr. Néstor O. Bianchi, por su incondicional y oportuna ayuda durante estos, mis primeros años de investigación.

Al Dr. Omar H. Pivetta, por su importante contribución a mi formación científica.

Al Lic. Rubén Lombardo, por su colaboración en la dis

cusión del análisis estadístico.

A los integrantes de las Secciones Oncohematología y Clínica Médica del Instituto de Investigaciones Hematológicas, quienes cedieron el material de estudio.

A la Srta. Mónica Adlassnig por su eficiente labor en el pasado a máquina del trabajo y al Sr. Osvaldo Miskoski por su valioso trabajo fotográfico.

A mis compañeras de laboratorio, quienes siempre me alentaron y brindaron su estima.

A las Srtas. Diana Massa y Evelyn Desset, quienes cooperaron en forma activa y permanente en la tarea diaria.

A Irma Slavutsky, quien con su afecto, me animó a cada instante.

A Marta, mi mejor amiga, por todo.

A toda mi familia, por su apoyo y tolerancia durante el tiempo que duró la redacción y finalización de este trabajo.

Y, finalmente, a mis padres, quienes con su sostén, comprensión, paciencia y cariño, hicieron posible esta realidad.

A Julio y Martín

*Si viertes lágrimas porque no ves el sol,
tampoco verás las estrellas.*

R. Tagore

1. INTRODUCCION	
1.1. Bando C	1
1.1.1. Antecedentes	1
1.1.2. Fundamentos	5
1.2. Heterocromatina constitutiva	8
1.2.1. Composición	8
1.2.2. Origen	12
1.2.3. Localización	13
1.2.4. Propiedades	19
1.2.5. Funciones	20
1.2.6. Correlación con ADN-Sat y banda C	22
1.3. Polimorfismos	24
1.3.1. Variabilidad poblacional	24
1.3.1.1. Cromosoma 1	25
1.3.1.2. Cromosoma 9	27
1.3.1.3. Cromosoma 16	28
1.3.1.4. Otros cromosomas	29
1.3.2. Heredabilidad	31
1.4. Objetivos	33
2. MATERIALES Y METODOS	
2.1. Muestra	35
2.1.1. Características generales	35
2.1.2. Caracterización de las muestras	37
2.1.2.1. Leucemias crónicas	37
2.1.2.2. Leucemias agudas	40
2.2. Técnicas de cultivo	42
2.2.1. Sangre periférica	42
2.2.2. Médula ósea	42
2.3. Estudio citogenético	43
2.3.1. Obtención de bandas C	43
2.3.2. Análisis de bandas C	43
2.4. Análisis estadístico	44

3. RESULTADOS	
3.1. Valoración del heteromorfismo	46
3.1.1. Variabilidad entre sexos	46
3.1.1.1. Variantes totales	46
3.1.1.2. Variantes por cromosoma	49
3.1.2. Variabilidad poblacional	53
3.1.2.1. Prevalencia del heteromorfismo	53
3.1.2.2. Prevalencia del heteromorfismo por cromosoma	54
3.1.3. Determinación de la frecuencia de dos variantes	66
3.1.4. Incidencia del heteromorfismo cromosómico	71
3.1.4.1. Frecuencia de variantes totales	71
3.1.4.2. Frecuencia de variantes por cro mosoma	72
3.1.4.3. Incidencia de cada variante por cromosoma	76
3.1.4.3.1. Cromosoma 1	76
3.1.4.3.2. Cromosoma 9	79
3.1.4.3.3. Cromosoma 16	82
4. DISCUSION	86
5. CONCLUSIONES	98
6. BIBLIOGRAFIA	

1. INTRODUCCION

1.1. Bandeo C

1.1.1. Antecedentes

Heitz y Darlington poseen el mérito de haber sido los primeros en efectuar un análisis citológico y genético detallado de la heterocromatina, aunque previamente ya se conocía la existencia de material genético con características diferentes.

Heitz es quien propone el término heterocromatina para designar aquellas regiones de los núcleos en interfase, profase y telofase que tienen mayor grado de condensación y tinción, reservando el nombre de eucromatina para aquellas zonas que difieren en estas características (Heitz, 1928; 1929; 1933).

Por su parte, Darlington determina que la heterocromatina se mantiene condensada y con heteropicnosis positiva durante los estadios del ciclo celular en que la eucromatina aparece laxa (interfase, profase y telofase) en tanto que en las fases del ciclo en que esta última se condensa (metafase y anafase), la heterocromatina se descondensa. A este particular fenómeno de condensación y descondensación durante el ciclo celular se lo denomina "alociclia" (Darlington, 1940).

Taylor, incorporando timidina tritiada en células de hamster chino, encuentra que el brazo largo de los cromosomas X e Y, presenta replicación tardía (Taylor, 1960). Un año más tarde, es descrito el fenómeno de inactivación de un cromosoma X en las células somáticas femeninas, sugiriéndose a partir de esta observación, que los mamíferos presentan ambos tipos de heterocromatina, facultativa y constitutiva (Lyon, 1961). Posteriormente

te, se demuestra con timidina tritiada que el cromosoma X inactivado presenta replicación tardía, determinando así, que este método no permite diferenciar los dos tipos de heterocromatina (Morishima, 1962).

Hasta ese momento, no era posible identificar la heterocromatina en preparaciones convencionales de células de mamíferos, por lo que se utilizó para ello, la replicación tardía de este ADN a pesar de las serias limitaciones de este método. Es así como Galton pudo sugerir que los múltiples brazos cromosómicos con replicación tardía que se observaban en hamster sirio, podían ser segmentos heterocromáticos, aunque no pudo confirmar citológicamente esta hipótesis (Galton, 1964). Más tarde, Brown sugiere el término de heterocromatina facultativa para nombrar a aquella que presenta genes estructurales, citológicamente condensados y genéticamente inactivados, y el de heterocromatina constitutiva para la que carece de los mismos (Brown, 1966).

Hasta 1970, los conocimientos sobre la heterocromatina en mamíferos se limitaron a la detección de los cromocentros presentados en núcleos interfásicos y a la visualización del corpúsculo de Barr correspondiente a la heterocromatinización de uno de los cromosomas X en la mujer, no pudiendo localizar cada parte de heterocromatina en los cromosomas en metafase. En algunas especies, donde un brazo o un cromosoma entero era heterocromático, se podían observar diferencias de condensación entre las regiones eucromáticas y heterocromáticas en profase y prometafase, siendo muy difícil la distinción de las mismas en metafase (Lee, 1971). Por otra parte, con el método autorradiográfico no se podía detectar el cromosoma X heteropicnótico interfásico e incluso eran

inciertas otras posibles regiones heterocromáticas.

En la misma época, utilizando hibridización "in situ" de ácidos nucleicos de ratón, se observó que las áreas en donde se localizaba el ADN satélite, se teñían intensamente con Giemsa, mientras que las regiones restantes, lo hacían suavemente. Esto permitió sugerir que el procedimiento utilizado, determinaba una respuesta diferencial entre regiones cromosómicas, donde las áreas ricas en ADN satélite se teñían más fuertemente que aquellas sin este tipo de ADN, sin depender esta tinción de la presencia de moléculas de ARN radioactivo complementario y que estas áreas podían corresponder a la heterocromatina (Pardue, 1970).

Un año más tarde, efectuando experiencias con ADN repetitivo humano, se encontraron áreas cromosómicas intensamente teñidas que permitieron concluir que dichas zonas representaban las regiones de heterocromatina constitutiva del complemento humano y que cada cromosoma tiene características propias de cantidad y ubicación de dicha heterocromatina (Arrighi, 1971).

De esta manera, surge el primer procedimiento para revelar la heterocromatina constitutiva, tanto en metafase como en otros estadíos celulares, y una forma de correlacionar la heterocromatina con las secuencias de ADN repetitivo. Este método denominado bandeo C, (por ser su ubicación preferencialmente centromérica) en la Conferencia de París (1971), permitió aclarar una serie de ambigüedades en la interpretación de la evolución cariológica y molecular, constituyendo el punto de partida para el posterior descubrimiento del bandeo G (Giemsa).

Para resolver si las bandas C eran equivalentes a la clásica heterocromatina de Heitz, se aplicó esta técnica en preparaciones de neuroblastos de Drosophila melanogastera fin de observar si las bandas C correspondían a los segmentos heterocromáticos conocidos en otras especies (Hsu, 1971). La positividad de los resultados permitió confirmar la aplicabilidad del término para todas las especies en donde apareciera un segmento cromosómico más intensamente teñido mediante la aplicación de la nueva metodología.

Actualmente, existen además del método original, numerosas coloraciones específicas para determinadas regiones cromosómicas. Una de ellas es la que, usando solución Giemsa a pH 11, colorea intensamente la región heterocromática del cromosoma 9 del hombre y todo el resto del complemento se tiñe de manera más suave (Gagné, 1972). Usando esta misma coloración con ligeras modificaciones, se pueden observar las bandas C del cromosoma 1 (Magenis, 1977). También se pueden identificar las bandas C de este cromosoma en células interfásicas y en espermatozoides (Geraedts, 1973).

Existe un método de coloración que detecta sólo los centrómeros, que normalmente se ven englobados por las bandas C (Eiberg, 1974). Otro procedimiento para detectar los centrómeros, también permite la identificación de las bandas C, siendo de mucho valor para la detección de heteromorfismos de posición, especialmente cuando las bandas son pequeñas (Abe, 1975).

El fluorocromo deoxi-5-metilcitolídico se liga preferencialmente a las bandas C de determinados cromosomas como son

el 1, 9, 15, 16 e Y (Miller, 1975). Algo similar ocurre cuando se utiliza el fluorocromo 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) asociado al antibiótico distamicina A (Schweizer, 1978).

Utilizando una variante de la técnica de bandas C, aumentando la temperatura del tratamiento (85°C) en solución salina, se obtienen además de éstas, bandas T, tanto en células metafásicas como interfásicas (Scheres, 1976).

Por último, se puede detectar también variantes de tonalidad de color y tamaños cuando se utiliza coloración con Acridina (Verma, 1975).

1.1.2. Fundamentos

A partir del procedimiento de obtención de bandas C con HONa, se sugiere como probable mecanismo de aparición de estas bandas, un proceso de desnaturalización básica del ADN del cromosoma, seguido de una posterior renaturalización del ADN repetitivo. El responsable de la renaturalización sería la incubación en solución salina citratada (SSC) (Arrighi, 1971).

Posteriormente, es publicada una técnica de bandeo C con la utilización de HO_2Ba , sosteniendo la misma fundamentación que el procedimiento anterior. El HO_2Ba cumpliría la función del HONa (Sumner, 1972). Esta modificación es muy útil para el estudio de cromosomas humanos, dado que estos son muy

lábiles y el $Ba(OH)_2$ es menos agresivo que el NaOH. Por otro lado, el tratamiento inicial con ClH mejora los resultados de la técnica, siendo su función remover el exceso de proteínas, probablemente histonas.

Los tratamientos con ácidos, álcalis o temperaturas elevadas producirían la desnaturalización del ADN celular, induciendo la renaturalización del ADN altamente repetido con la posterior incubación en SSC. El ADN moderadamente repetido y el ADN único, no se comportarían de esa manera bajo estas condiciones y se produciría entonces, una reacción de tinción diferencial. Esta situación permitiría considerar que este ADN satélite sea el responsable de la tinción de las bandas C (Hsu, 1974). Por otra parte, la utilización de fluorescencia con naranja de acridina, combinada con estos tratamientos, proveen información que apoyaría esta hipótesis de desnaturalización y rápida reasociación del ADN centromérico (Comings, 1973; Lubs, 1973).

Ha sido observado además, que trabajando con urea 8M, se obtienen, por corta incubación, bandas G. Si la acción es mantenida, desaparecen progresivamente estas bandas y se observan bandas C. Esto no condice con el mecanismo de desnaturalización-renaturalización, por lo que se sugirió que el bandeo es una consecuencia de una condensación diferencial de la cromatina, causada por una alteración en la interacción entre el ADN y la proteína no-histónica (Mc Kay, 1973).

Por otro lado, estudios con radioisótopos mostraron que durante el procedimiento de obtención de bandas C, es ex-

traído de los cromosomas un 60% del ADN, preferencialmente en las regiones que no bandean C (McKenzie, 1973). Existen también, evidencias de pérdida de ADN en células fijadas, después de tratamiento con HONa seguido de SSC (Comings, 1973; Hsu, 1974). Además, se observaron cromosomas con bandeo C en tres dimensiones, utilizando microscopio de barrido, detectando que las zonas de heterocromatina constitutiva sobrepasaban el nivel del resto de la cromátida, formando excrescencias (Cervenka, 1973). Esto estaría de acuerdo en cuanto a que las técnicas de bandeo C utilizadas extraen la cromatina de las regiones restantes, preservándola en las regiones de bandas C. Estos resultados pusieron en evidencia, que un factor claramente asociado con el bandeo C era la extracción del ADN no relacionado a estas bandas y la retención del ADN cromosómico que bandeaba. Estas observaciones determinaron la necesidad de rever el mecanismo de aparición de estas bandas, considerado inicialmente.

Se vio también, que la técnica con HONa removía entre el 16% y el 81% del ADN cromosómico y que este ADN era extraído de aquellas regiones que no corresponden a las bandas C (Comings, 1975). Esta situación determinaría una reducción de los sitios de unión para el colorante en las zonas donde el ADN ha sido suficientemente dispersado, impidiendo la formación de puentes a las moléculas del colorante, siendo ésta, la causa de la tinción diferencial (Sumner, 1973).

Se sugirió además, que la pérdida del ADN celular después del procedimiento de bandas C, preferencialmente en la región eucromática, se debería a que la desnaturalización y la pos

terior incubación con SSC a 65°C, induciría fragmentación del ADN que luego pasaría de los cromosomas y núcleo a la solución. La rápida asociación de las secuencias cortas del ADN repetitivo evitaría una pérdida excesiva del mismo (Pathak, 1973).

Finalmente, fueron sugeridas diversas posibilidades por las que el ADN que bandea C es más resistente a la extracción que el restante, ninguna de las cuales se encuentra debidamente comprobada. Entre ellas encontramos la interacción entre el ADN y las proteínas, ya sean histónicas o no-histónicas, la existencia de mayor compactación del ADN de la heterocromatina constitutiva y una mayor y más rápida renaturalización de dicho ADN (Commings, 1978).

Es indudable que la continuidad de la investigación de este complejo aspecto, permitirá un conocimiento acabado de la causa de la formación de las bandas C.

1.2. Heterocromatina Constitutiva

1.2.1. Composición

Cuando el ADN de eucariontes se somete a centrifugación en gradiente de ClCs, se observa que aparece un gran pico o banda principal y uno o varios picos o bandas más pequeñas, de densidad significativamente distintas, y por lo tanto, de diferente composición de bases (Kit, 1961; Walker, 1965). Este ADN que se manifiesta en picos menores, se denomina ADN satélite (ADN-Sat), y es el ADN altamente repetido del geno

ma (Southern, 1970). Está formado por secuencias cortas de nucleótidos que se reiteran miles a millones de veces, 10^5 , 10^6 ó 10^7 , según la especie estudiada, pudiendo llegar a contener hasta un tercio del ADN total de la célula (Britten, 1968). Este ADN ha sido encontrado en una amplia variedad de células, en especies tan alejadas filogenéticamente como las levaduras y el hombre. Su aparición en cromosomas eucarióticos y su ausencia en virus y bacterias indicaría que el ADN-Sat estaría vinculado directamente con el tipo de organización del ADN.

Los dos métodos usados para obtener información acerca del ADN repetido son: ultracentrifugación en gradientes de densidad y medida del nivel de reasociación del ADN.

El método de ultracentrifugación en gradientes de densidad consiste en agregar ADN a una solución acuosa de Cloruro de Cesio (ClCs) y centrifugar a alta velocidad durante un período prolongado. En estas condiciones, las moléculas de ClCs se desplazan formando un gradiente de manera tal, que la densidad de la solución aumenta gradualmente desde la superficie hasta el fondo de la celda de centrifugación. Conjuntamente con el desplazamiento del ClCs, se produce la asociación de las moléculas de ADN hasta llegar a un punto de detención en que la densidad del ADN y la del gradiente, son iguales. Si el ADN está constituido por moléculas de diferente densidad, se formarán diversas capas a distintos niveles del gradiente y es así como se determina que el ADN con más bases de tipo adenina-timina es más liviano, mientras que el rico en guanina-citosina tiene mayor peso molecular. Por lo general, el ADN-Sat es más rico en bases A-T que la banda principal.

El primer ADN-Sat fue descrito en el ratón Mus musculus (Kit, 1961) con una banda de densidad de $1,691 \text{ g/cm}^3$, comparada con la principal de $1,700 \text{ g/cm}^3$. La densidad de la banda principal en la mayoría de los mamíferos es de $1,700 \text{ g/cm}^3$ a $1,701 \text{ g/cm}^3$ (Jones, 1973). Comprende aproximadamente el 10% del ADN total y está formado por 8 a 10 pares de bases repetidas $3,3 \times 10^3$ veces (Southern, 1970).

El caso más extremo de repetición se encuentra en algunas especies de cangrejos, en los que la secuencia redundante tiene una longitud de sólo dos nucleótidos y se repite decenas de millones de veces, constituyendo el 30% del total del ADN de la especie. En el ratón, el ADN-Sat está formado por una única variedad o familia de ADN altamente repetido, en tanto que en otras especies se presentan más de una familia de ADN-Sat, habiéndose identificado cuatro variedades de ADN repetido en bovinos y ocho en el hombre.

Cada variedad y familia de ADN-Sat se origina por repetición de una secuencia de nucleótidos característica. La diferencia física de densidad entre las distintas familias de ADN repetido es probablemente mucho más marcada que la diferencia química entre las secuencias que se repiten.

Cuando el ADN humano nativo es centrifugado en C1Cs, aparece un pequeño satélite, que constituye menos del 1% del total del ADN, con una densidad de $1,687 \text{ g/cm}^3$, denominado satélite I (Sat I) (Corneo, 1967; 1968; 1971; 1972).

Cuando se utiliza ultracentrifugación en SO_4Cs con el

agregado de Hg^{++} o Ag^+ , aparece un segundo ADN-Sat (II) con una densidad de $1,693 \text{ g/cm}^3$ que constituye alrededor del 2% del total de ADN (Corneo, 1970), un tercero denominado ADN-Sat (III), cuya densidad es de $1,696 \text{ g/cm}^3$ (Corneo, 1971; 1972) y un ADN-Sat (IV) de densidad $1,700 \text{ g/cm}^3$ (Corneo, 1972).

Posteriormente, fueron detectados otros cuatro ADN-Sat: A y B (Chuang, 1974); C (Saunders, 1972) y D (Saunders, 1975). Las características físicas de cada uno de los ADN-Sat se observan en la Tabla I.

Tabla I: CARACTERISTICAS FISICAS DE LAS DIFERENTES FRACCIONES DEL ADN-Sat

Fracción de ADN-Sat	% del genoma	Densidad ADN-Sat		
		Nativo (g/cm^3)	Desnaturalizado (g/cm^3)	Renaturalizado (g/cm^3)
I	0,5	1,687	1,707	1,697
II	2	1,693	1,740	1,696
III	1,5	1,696	1,740	1,703
IV	2	1,700	1,730	1,706
A	0,5-1	1,710	1,775	1,715
B	0,5	1,726	1,792	-
C	-	1,703	1,760	1,712
D		1,720	1,782	-

1.2.2. Origen

El origen del ADN-Sat no se conoce bien pero existen diversas teorías que intentan explicarlo.

Algunos autores sugieren que se iniciaría a partir de un evento de dos replicaciones denominado "saltatorio", como resultado de la repetición en tandem de una secuencia nucleotídica original simple. Dicho de otra forma, esta situación se daría cuando una secuencia sufre una replicación múltiple y sus copias se integrarían en un cromosoma asociadas con un elemento genético favorable, distribuyéndose luego, a través de las especies (Britten, 1968).

Otra teoría, denominada círculo giratorio ("rolling circle"), sugiere que la secuencia que se repite está unida por sus dos extremos formando un círculo. En un momento determinado, se abre una de las cadenas de ADN y comienza a desenrollarse sirviendo de molde para la síntesis de una nueva cadena. La cadena restante se mantendría unida en círculo y sería molde para una segunda cadena de ADN. De esta forma, se producirían in definidas secuencias repetidas con posibilidad de insertarse en diferentes regiones cromosómicas (Thomas, 1973). Este mecanismo ha sido comprobado en las secuencias repetidas de cistrones ribosómicos de ovocitos de Xenopus laevis.

Un tercer mecanismo es el que se basa en el pasaje de segmentos equivalentes de una cromátida a otra durante la dupli cación cromosómica, denominado intercambio desigual de cromátidas hermanas. Dada la presencia de secuencias de bases repeti-

das en diferentes regiones del cromosoma, es probable que ocurra un desplazamiento de ADN, quedando los intercambios reducidos a las regiones de secuencias repetidas.

Como resultado de este proceso, tenemos la aparición de dos cromosomas hermanos desiguales; uno con un segmento de ADN repetido extra y el otro, carente de dicho segmento (Smith, 1976).

De todos los mecanismos referidos hasta el presente, éste sería probablemente el utilizado con mayor frecuencia por los organismos superiores, para originar secuencias repetidas y agrupadas de ADN.

1.2.3. Localización

En los núcleos interfásicos de las células eucariontes, se observan masas de cromatina condensada formadas fundamentalmente, por heterocromatina constitutiva en tanto que una menor proporción corresponde a heterocromatina facultativa (Hsu, 1975).

Como un primer paso para determinar la ubicación del ADN-Sat, se ha tratado de localizarlo en el genoma, utilizando un procedimiento que consiste en romper las células mediante ultrasonido u otros procedimientos mecánicos a fin de extraer la cromatina nuclear y centrifugarla en un gradiente de sacarosa. Mediante esta técnica es posible separar la cromatina condensada.

Posteriormente, se diseñó el método de hibridización de ácidos nucleicos "in situ" que sirvió para confirmar los datos obtenidos con las técnicas mencionadas anteriormente (Jones, 1970; Pardue, 1970). Este método consiste básicamente en tres pasos:

- a. producir un ARN o ADN radioactivo complementario del ADN-Sat,
- b. hacer que el ácido nucleico radioactivo se combine con el ADN complementario (ADN-Sat de la misma especie) existente en los extendidos citológicos y citogenéticos (hibridización "in situ").
- c. determinar las zonas de hibridización "in situ" mediante autorradiografía.

Si bien el ADN-Sat no transcribe "in vivo", sí puede hacerlo "in vitro". Si se lo aisla y fracciona, separándose luego las dos cadenas complementarias y se le agregan precursores radioactivos, ARN polimerasa, iones de Ca^{++} y Mg^{++} y se lo incuba a temperatura adecuada, puede servir de molde para la formación de ARN complementario altamente radioactivo. Este ARN se aisla y luego, se incuba sobre preparaciones citológicas las que son tratadas previamente, con un álcali fuerte a fin de separar las dos cadenas complementarias del ADN nuclear y hacerlo apto para la hibridización. Después de un tiempo adecuado, se elimina el ARN no hibridizado destruyéndolo con la enzima ribonu-cleasa, se cubren los preparados con una película autorradiográ-fica exponiéndolos durante un tiempo variable. Estos radiogra-mas, luego de revelados, mostrarán radioactividad en las regio-nes cromosómicas formadas por ADN-Sat, hibridizadas con ARN complementario (ARN_c).

Esta técnica ha sido usada en múltiples investigaciones sobre la estructura y función del material genético y, recientemente, se ha incluido para el estudio del ADN recombinante, el uso de electroforesis en diferentes tipos de gel tales como poli acrilamida o agarosa, y el análisis de colonias por hibridización (Alwine, 1977; Reiser, 1978; Grunstein, 1975; Benton, 1977).

Actualmente, se utiliza otra metodología denominada reacción de traslación del corte o "nick translation". Esta técnica consiste básicamente en una reacción catalizada por una ADN-polimerasa que permite el reemplazo de nucleótidos de ADN no radioactivos por otros previamente marcados.

Una molécula de ADN de doble cadena puede servir como primer modelo para la enzima, cuando el ADN contiene una única cadena con una rotura, "nick", con un final 3'hidroxil, ya que los nucleótidos del lado 5'fosfato son removidos, y permiten la inserción en el lugar de otros nucleótidos, lo que determina al mismo tiempo, que el "nick" se traslade una posición en la cadena en dirección 3'-5'. Si los nucleótidos que se introducen durante este proceso, son radioactivos, el ADN resultante es tará marcado y podrá ser fácilmente detectado (Kelly, 1970; Rigby, 1977).

El empleo de diferentes técnicas para identificación de ácidos nucleicos, permitió obtener buenos resultados sobre el patrón de distribución cromosómica de la heterocromatina constitutiva, así como de su asociación con el ADN-Sat ubicado en las regiones cromosómicas, dando una coloración positiva con Giemsa (Pardue, 1970; Arrighi, 1971).

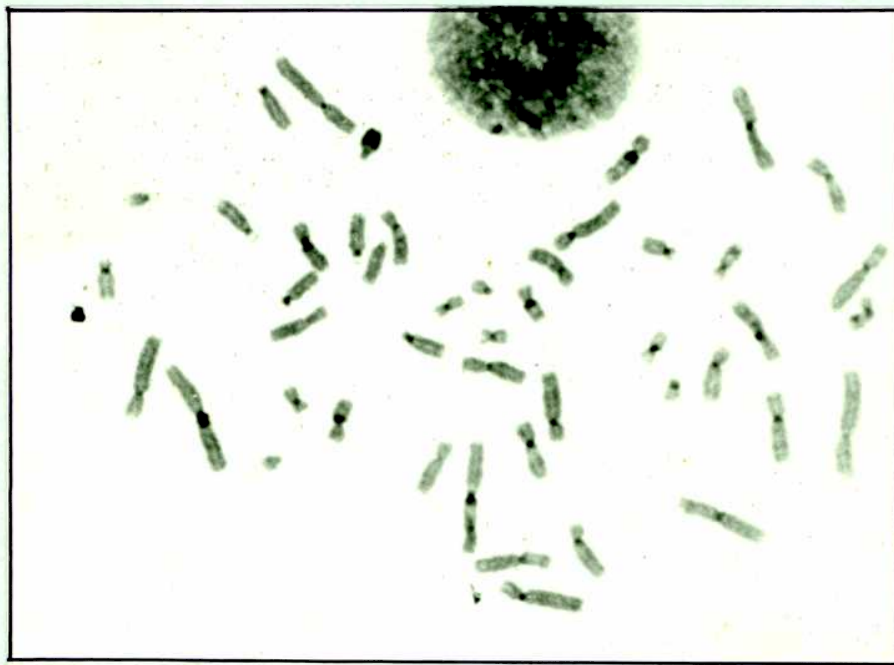
La utilización de esta técnica permite obtener nuevas pruebas de la asociación de la heterocromatina constitutiva con el ADN-Sat y localizar las regiones cromosómicas en donde ésta se ubica.

Actualmente, se considera que la heterocromatina constitutiva de los cromosomas humanos, de acuerdo a lo demostrado por bandas C, puede ser clasificada en cuatro tipos:

1. heterocromatina centromérica que involucra todos los centrómeros, incluyendo el cromosoma Y,
2. heterocromatina acrocéntrica, asociada con los brazos cortos y regiones satélites de los cromosomas D y G,
3. heterocromatina de las constricciones secundarias de la región proximal de los brazos de los cromosomas 1, 9 y 16,
4. heterocromatina de la región distal del brazo largo del cromosoma Y (Craig-Holmes, 1973).

En la Figura 1, se observa una metafase con bandeo C, mostrando los distintos tipos de heterocromatina.

Figura 1: BANDEO C EN UNA METAFASE HUMANA DE SEXO MASCULINO



La ubicación de la heterocromatina constitutiva y su relación con la distribución de las diferentes familias de ADN-Sat, según diferentes autores, puede ser observada en la Tabla II.

Tabla II: LOCALIZACION CROMOSOMICA DE LOS ADN-Sat

Fracción de ADN-Sat	Tejido estudiado	localización cromosómica		Referencias
		principal	otras	
I	médula ósea nódulos linfáticos	heterocromatina del cromosoma 9 e Y	regiones centroméricas de los cromosomas 1, 13, 14 y G	Gosden 1975
II	placenta	heterocromatina del cromosoma 1, 9 e Y	región centromérica del cromosoma D, 16 y G	Gosden 1975
III	placenta	heterocromatina del cromosoma 9, 15 e Y	región centromérica de los cromosomas 1, grupos D y G	Jones 1973
IV	placenta	heterocromatina del cromosoma 9, 15 e Y	región centromérica de los grupos D y G	Gosden 1975
A	células Hela	no fue localizada		Chuang 1974
B	leucocitos de LLC*	nucleolo		Chuang 1974
C	placenta	heterocromatina del cromosoma 9 (región centromérica)	regiones centroméricas de los grupos D y G	Saunders 1972
D	placenta	heterocromatina del cromosoma 9 (región centromérica)		Saunders 1975

*: Leucemia Linfática Crónica

1.2.4. Propiedades

Las propiedades que le han sido adjudicadas a la heterocromatina constitutiva son diversas. Entre ellas, se encuentran la alociclia, su particular distribución en los dos miembros de un par cromosómico, la inactividad genética, la replicación tardía y la tendencia a la asociación con otras regiones heterocromáticas (Bianchi, 1978).

Sabemos que en un mismo individuo los cromocentros presentan una distribución y aspecto variables, según el tipo de tejido en estudio. La heterocromatina que constituye estos cromocentros aparece como grandes bloques condensados con heteropicnosis positiva durante el estadio de reposo celular, en tanto que durante el período de división celular activa, se descondensa perdiendo identidad citológica; este proceso se denomina alociclia (Darlington, 1940).

Inicialmente, se empleó la ubicación cromosómica de la heterocromatina como medio para diferenciar la heterocromatina constitutiva de la facultativa y se pensó que la primera presentaba una cantidad y ubicación similares en los dos miembros de un par cromosómico (Brown, 1966). El empleo de las bandas C permitió confirmar esta hipótesis en múltiples especies de animales y vegetales. No obstante, posteriormente se pudo observar que no todos los casos muestran este resultado, entre ellos, el ser humano, donde es frecuente que los individuos presenten cantidades variables de heterocromatina constitutiva en cromosomas homólogos.

La distribución diferente de la heterocromatina constitutu

tiva, con la presencia de deficiencias y aumentos en su cantidad, sin alteraciones en el fenotipo, indica la escasa o nula actividad genética de este material. A esto, se suma el hecho de que el ADN altamente repetitivo no actúa de molde en la síntesis de ARN (Flamm, 1969). Dichos datos evidencian que la heterocromatina constitutiva no sólo carece de genes, sino que no puede ser transcripta.

En cuanto a la replicación de la heterocromatina, se sabe que ella termina su síntesis de ADN en una fase tardía respecto de la eucromatina (Lima de Faría, 1959) siendo ésta, una propiedad frecuente pero no constante ni exclusiva (Bianchi, 1978).

En los núcleos interfásicos se observan de 3 a 6 bloques de heterocromatina de tamaño considerablemente superior al de cualquiera de los bloques individuales. Esto permite suponer una asociación cromosómica en la interfase, mediante la unión de zonas heterocromáticas, la que desaparece totalmente en metafase.

La persistencia de esta asociación en algunas patologías podría estar relacionada a los mecanismos de no disyunción. Por otra parte, su afinidad a la membrana nuclear y al nucleolo, permite suponer que interviene en el establecimiento de una determinada arquitectura.

1.2.5. Funciones

Cuando se analizan las posibles funciones de la hetero-

cromatina constitutiva, surgen controversias debido a la inexistencia de datos experimentales concretos. Algunos autores afirman que no hay una evidencia real sobre la actividad del ADN-Sat, o sobre los efectos relacionados con las variaciones de las bandas C (Evans, 1977). Por otro lado, otros investigadores postulan que el ADN repetitivo, que compone la heterocromatina constitutiva, tendría una función de regulación génica (Britten, 1971; Hsu, 1975).

Las diferentes hipótesis sobre las funciones de la heterocromatina constitutiva sugieren que éstas serían de naturaleza estructural, como ser:

1. Mantenimiento de la estructura cromosómica: dada por una serie de funciones estructurales como la de organizar los microtúbulos del huso (heterocromatina centromérica), estabilizar los extremos cromosómicos (heterocromatina telomérica) y dirigir los patrones de plegamiento de la fibra cromosómica.
2. Atracción cromosómica: favorecería el apareamiento de los cromosomas homólogos durante la meiosis siendo las zonas heterocromáticas, los focos de iniciación de dicho apareamiento. Estudiando la asociación de cromosomas acrocéntricos con otros cromosomas, fue observada una ocurrencia preferencial del apareamiento en las zonas heterocromáticas (Schmid, 1975). Por otro lado, fue determinada la existencia de asociación entre regiones heterocromáticas no homólogas permitiendo inferir una similitud de funciones de las regiones heterocromáticas (Driscoll, 1979).
3. Rol evolutivo: ya sea estableciendo barreras de fertilidad al impedir el apareamiento de cromosomas de especies diferentes

dada las especificidades del ADN-Sat de cada especie; o bien, proveyendo sitios genéticamente no esenciales (de inactividad génica) para rearrreglos cromosómicos.

4. Protección de áreas vitales: dada su inactividad génica y su ubicación recubriendo la cara interna de la membrana nuclear y del nucleolo, la heterocromatina constitutiva actuaría protegiendo a las áreas del genoma genéticamente activas, de las agresiones externas de todo tipo de agente, sean éstos clastogénicos, mutagénicos y/o carcinogénicos. (Hsu, 1975).

1.2.6. Correlación con ADN-Sat y bandas C

Los casos en los que es posible decir que las bandas C contienen exclusivamente ADN repetitivo son pocos, aunque en los experimentos originales de hibridización "in situ" en cromosomas de ratón, el ADN-Sat fue localizado en las regiones centroméricas de los cromosomas, zonas que simultáneamente tiñen intensamente con Giemsa (Pardue, 1970).

Los estudios en ratón (Pardue, 1970), así como en otras especies, han permitido comprobar que existen regiones heterocromáticas que contienen una amplia variedad de ADN repetitivo (Brown, 1973; 1974; MacGregor, 1973; Arrighi, 1974) así como otras regiones de bandas C donde no ha podido detectarse ningún tipo de ADN (Gosden, 1975).

Por otra parte, estas regiones heterocromáticas presen-

tan preponderantemente replicación tardía, aunque no existe una exacta correspondencia entre ambas zonas, llegando al extremo en la rata donde las bandas C no se corresponden con las zonas de replicación tardía (Bianchi, 1973).

Esta situación determina que surjan dificultades para definir el término heterocromatina con precisión, por lo que operativamente en el hombre se iguala heterocromatina constitutiva con el material que bandea C. Teniendo esto en cuenta, alrededor del 20% del genoma humano es heterocromático, siendo la mayoría de localización cercana al centrómero, con excepción de la banda distal del cromosoma Y.

Resulta importante aclarar este concepto dado que en el hombre, alrededor del 4% del genoma, es ADN-Sat de manera tal que la mayoría del ADN que constituye la heterocromatina humana no es ADN-Sat. Por otra parte, se sabe que el 23% del ADN humano se reasocia con las características del ADN repetitivo, sin quedar claro que cantidad del mismo se encuentra ubicado en la heterocromatina cercana al centrómero.

Resumiendo, se puede decir que el 20% del genoma humano corresponde a ADN que bandea C y que está formado por secuencias simples y complejos de ADN-Sat junto a secuencias similares al satélite.

En la Tabla III se detalla la composición de ADN-Sat de las regiones heterocromáticas de los cromosomas humanos.

Tabla III: CORRELACION ENTRE REGIONES HETEROCROMATICAS Y ADN-Sat

Regiones heterocromáticas	Fracción de ADN-Sat
Casi todos los cromosomas	I, II, III, IV
Cromosoma 16	II
Cromosomas 4, 6 y 19	Sin ADN repetitivo

Dadas estas observaciones, se advierte que las bandas C de los cromosomas 1, 9 y 16, corresponden a ADN-Sat de replicación tardía. Esto nos permite asumir que, al evaluar las modificaciones en las bandas C, se están valorando cambios de la heterocromatina constitutiva, formada por ADN altamente repetitivo.

1.3. Polimorfismos de bandas C

1.3.1. Variabilidad poblacional

Se denomina polimorfismo a toda variación cromosómica observada en el cariotipo humano, utilizando cualquiera de las coloraciones especiales (bandeo C, G y Q). Se observa generalmente en individuos "fenotípicamente normales" y, dado que aproximadamente el 50% de las personas, presentan variantes sean éstas de tamaño o de intensidad de coloración, su incidencia en la población es mayor que

la esperada por mutación espontánea. Esto contrasta notablemente con las alteraciones cromosómicas mayores que se presentan en el 0,5 al 1% de la población y en individuos fenotípicamente anormales (Seuáñez, 1979).

La heterocromatina representa un sistema polimórfico en el que los cromosomas pueden presentar una variación de tamaño del bloque heterocromático pudiendo también, modificar la posición del mismo, parcial o totalmente, cambio que se conoce como inversión pericéntrica. Esto ocurre especialmente en los pares 1, 9 y 16, en los cromosomas acrocéntricos y en el Y.

Si bien existen numerosos trabajos en poblaciones humanas, no hay información acerca del significado potencial de estas variantes y es, por lo tanto, de interés averiguar su sentido biológico y su utilidad en citogenética clínica (Lubs, 1977).

Los estudios realizados en poblaciones normales tratando de determinar la frecuencia de heteromorfismos en las bandas C, son muchos, siendo uno de los primeros el efectuado por Craig-Holmes, quien encuentra variantes en los pares 1, 9 y 16 así como en los cromosomas de los grupos D, F y G (Craig-Holmes, 1973).

1.3.1.1. Cromosoma 1

El número de heteromorfismos que se observan en este cromosoma varía de acuerdo a lo publicado por diferentes autores con lo que sólo se puede demostrar su existencia, siendo muy difícil atribuirle un valor a estas variantes.

Si consideramos primero, los heteromorfismos de tamaño, existen trabajos efectuados en raza blanca que determinan la frecuencia de aparición del bloque aumentado o disminuído en un 2% (Tür, 1973) o en un 28% (Carnevale, 1976). Por otro lado, estudios realizados en raza amarilla, muestran una frecuencia que oscila entre 0,4% (Sofuni, 1977) y 24% (Inuma, 1973), atribuible fundamentalmente a la presencia de bloque heterocromático aumentado.

Cuando se comparan las observaciones efectuadas en individuos blancos y negros, no se observan diferencias significativas, se trate de aumento o de disminución de la banda C (Lubs, 1977; Verma, 1981).

Estudios efectuados en nativos de la India, muestran entre un 18 y un 19% de variantes de tamaño (Ghosh, 1975), mientras que analizando indígenas y blancos de Brasil, no se hallaron diferencias entre ambos grupos en cuanto a frecuencia de variantes de tamaño (Erdtmann, 1981).

Por último, no se detectaron diferencias significativas al comparar las frecuencias observadas en ambos sexos (Craig-Holmes, 1977) o en muestras de diferentes edades (Buckton, 1976).

Al analizar la frecuencia de inversión pericéntrica halladas para este cromosoma, se advierte que es muy baja, tanto que en la mayoría de los estudios no se detecta. Se señala para raza blanca un 0,2% de inversiones parciales y un 0,03% para raza negra (Lubs, 1977). En tanto que otros autores establecen para blancos, desde un 1,6% (Muller, 1975) hasta un 9% (Verma, 1978).

1.3.1.2. Cromosoma 9

En poblaciones normales, el cromosoma 9 presenta un nivel de polimorfismo de tamaño del bloque heterocromático semejante al observado para el cromosoma 1. Se ha descrito un 15% de variantes para la raza blanca (Craig-Holmes, 1973; Mackenzie, 1975), detectándose el mismo valor en nativos de la India (Ghosh, 1975).

Cuando se analizan estas variantes de tamaño en raza amarilla, se observan discrepancias en los resultados; en japoneses se detecta desde el 0,2% (Sofuni, 1977) hasta el 26% (Iinuma, 1973), en tanto que en orientales radicados en Estados Unidos de Norteamérica, se describe un 12% (Park, 1974).

Finalmente, si se comparan distintos grupos étnicos, no se encuentran diferencias significativas en los valores observados para este par (Buckton, 1976).

Al analizar la presencia de inversión pericéntrica para este cromosoma, se encuentran datos para frecuencia de inversión parcial, pasaje de parte del bloque heterocromático al brazo corto, o total, traslado de todo el bloque al brazo corto. Los resultados obtenidos por distintos autores son variables para inversión parcial se han descrito en blancos frecuencias poblacionales que van desde 0,3% (Lubs, 1977) y 2,2% (Buckton, 1976) hasta 10,7% (Muller, 1975). Mientras que para inversión total, los mismos autores describen valores que van desde 0,06% hasta 0,6%.

Estudios efectuados en raza negra, detectan una preva-

lencia de 0,53% para inversión parcial y un 0,22% para inversión total (Lubs, 1977). Para orientales se describe un 0,6% de inversión total y no hay referencia sobre inversión parcial (Sofuni, 1977).

Finalmente, cuando se compara frecuencia de inversión pericéntrica entre ambos sexos, no se encuentran diferencias significativas (Verma, 1978).

1.3.1.3. Cromosoma 16

El cromosoma 16 presenta niveles equivalentes a los encontrados para los cromosomas 1 y 9, cuando se analiza la frecuencia de variantes de tamaño de la banda C (Sofuni, 1977).

Estudios realizados en raza blanca muestran para aumento del bloque heterocromático, valores que van desde el 3,3% (Lubs, 1970) hasta el 7% (Craig-Holmes, 1973). Zankl detecta un 1,1% de individuos normales que presentan bandas C mayores y un 0,8% que presentan disminución (Zankl, 1971).

En nativos de la India está descripto entre 3,0 y 4,0% de variantes de tamaño, siendo esta frecuencia debida a la presencia de bloque mayor (Ghosh, 1976). Valores similares del 4% y del 5,6% son observados en raza negra y orientales respectivamente (Lubs, 1971; Sofuni, 1977).

Comparaciones efectuadas en diferentes grupos etarios, que no mostraron diferencias significativas, presentaron frecuencia

cias del 3% para disminución del bloque y 1,8% para aumento (Buckton, 1976).

En este cromosoma no se observaron diferencias raciales entre blancos y negros (Lubs, 1971).

Una característica de la heterocromatina de este cromosoma es que es muy rara la aparición de variantes de posición o inversión pericéntrica, dado que se conoce sólo un trabajo que refiere una frecuencia del 1,4% (Müller, 1975) y otro, que describe un caso familiar sin valor poblacional (Fonatsch, 1977).

1.3.1.4. Otros cromosomas

El análisis de las bandas C ha sido realizado en el complemento cromosómico humano completo, existiendo trabajos que describen variantes en todos los cromosomas (McKenzie, 1975).

Se ha descrito que los cromosomas del grupo F, algunos del grupo C y el X, presentan poca variación en bloque heterocromático. Para el primero, se señala que entre el 1,6% y el 2% de la población de raza blanca estudiada, presenta heteromorfismo de tamaño y para el segundo, una frecuencia de aparición de banda C larga que va desde el 0,4% para el cromosoma 10, y 0,6% para el 8, hasta el 10,3% para el 7 y 12,5% para el número 11. (Müller, 1975).

El cromosoma Y, en cambio, varía más en tamaño que los otros (Erdtmann, 1979). Un estudio sobre diferencias raciales en el largo del cromosoma Y, muestra que los japoneses presentan ta-

maño mayor del brazo largo seguido por judíos, negros y anglosajones (Cohen, 1966). Posteriormente, con técnicas de bandeado, se demostró que el responsable de esta variabilidad es el bloque heterocromático distal de este cromosoma (Bobrow, 1971).

Cuando se realizan estudios específicos para un determinado par, la frecuencia de heteromorfismos que se observa, siempre es mayor que la detectada cuando se analiza el cariotipo en general (Mikelsaar, 1978; Madan, 1979; Crossen, 1975). Esto puede ocurrir ya que existen ciertas bandas, especialmente los satélites de los grupos D y G, que son muy variables en su reacción a los métodos de identificación de bandas C, se deben entonces, aplicar técnicas específicas y especiales en estas regiones para así poder detectar nuevos polimorfismos entre estos cromosomas.

Los grupos D y G, en lo que se refiere a tamaño de la banda C, han sido analizados en numerosos trabajos denominando a la presencia de bloque aumentado Dph+ y Gph+. En el grupo D, en blancos, se ha detectado una frecuencia de Dph+ de 13,6% (Lubs, 1970) y 14,1% (Lubs, 1971). En tanto que en indígenas, se ha descrito una prevalencia mucho menor, que va de 6% a 9% (Ghosh, 1975) y, en raza negra, por el contrario un alto porcentaje, 22% (Lubs, 1971).

Sofuni, para orientales, describe específicamente un 0,9% de individuos que presentan aumento del bloque heterocromático del cromosoma 15, 15ph+ (Sofuni, 1977).

El grupo G, presenta en todos los estudios, menor frecuencia de heteromorfismo, Gph+, que el grupo D. Siendo además,

muy semejantes los valores hallados en las distintas razas. En blancos, la frecuencia de variantes de tamaño, es de 3,5% (Lubs, 1970) y 2,4% (Lubs, 1971). Para indígenas, los valores son de 2% y 4% (Ghosh, 1975) y en raza negra, se detecta un 5,6% (Lubs, 1971). Para último, en japoneses se ha encontrado un 0,1% de variantes para el cromosoma 22 (22ph+).

Todos estos datos demuestran que las bandas C son altamente variables en tamaño y posición. De esto surge, entonces, que lo fundamental es determinar cual es el tipo "normal" o tipo "silvestre" en lo que a bloques heterocromáticos se refiere, así como realizar este tipo de análisis en ambas poblaciones de referencia, la normal o control y la población en estudio.

1.3.2. Heredabilidad

La heredabilidad de cualquier variante biológica es un aspecto crítico en la caracterización de la misma como un polimorfismo.

El primer estudio específico sobre la heredabilidad de las bandas C y sus polimorfismos en los cromosomas 1, 9 y 16, describe un 15% de aparición de mutantes (Craig-Holmes, 1975), en tanto que otros autores encuentran un 3% (Sekhon, 1975). Ambos explican la aparición de estas variantes nuevas por ocurrencia de "crossing-overs" desiguales o bien la aparición de mosaicos por recombinaciones somáticas.

Otros autores, sugieren una segregación preferencial para variantes de banda C con tamaño aumentado, principalmente en el cromosoma 9 (Palmer, 1971; Carnevale, 1976).

Existen varios trabajos que indican que los polimorfismos hallados en la heterocromatina constitutiva, son altamente heredables, siendo rara la aparición de mutantes (Palmer, 1971; McKenzie, 1975; Robinson, 1976; Carnevale, 1976; Phillips, 1977; Magenis, 1977).

En un estudio con cuatro familias, se determinó que todas las variantes encontradas eran heredadas (McKenzie, 1975). Además, en 17 descendientes de una familia, pertenecientes a tres generaciones, se encontró un cromosoma 9 con una larga banda C a lo largo de la progenie (Fitzgerald, 1973). Asimismo, Hoehn, observa una variante en el cromosoma 1, en cultivos tratados con mitomicina durante varias generaciones (Hoehn, 1973).

Trabajando con mellizos monocigóticos y dicigóticos, se demostró la heredabilidad de la región 1qh, ya que cada uno de los pares de mellizos monocigóticos analizados, mostraron concordancia en este bloque heterocromático (van Dyke, 1977). Por otra parte, Craig-Holmes, describe que de 99 variantes de bandas C observadas, el 86% fue heredada sin ningún tipo de modificación sugiriendo que la mayoría de estas variaciones pueden ser transmitidas de padres a hijos y así, mantenerse en la población (Craig-Holmes, 1977).

La heredabilidad de las variantes del cromosoma Y, en cambio, parece clara. Inicialmente, Bishop, y más tarde McKenzie y

Beltrán, efectuando estudios familiares y medidas del complemento de este cromosoma, establecieron la alta heredabilidad del tamaño del bloque heterocromático (Bishop, 1962; McKenzie, 1972; Beltrán, 1979). Esta característica particular del cromosoma Y, permite su utilización como marcador en la determinación de la paternidad (De La Chapelle, 1967).

Por último, numerosos estudios sobre la heredabilidad de los bloques heterocromáticos, principalmente en los cromosomas 1, 9 y 16, indican que estas regiones se comportarían como rasgos mendelianos (Angell, 1975; Magenis, 1977; Sadamoris, 1981). Pudiendo concluirse que, los polimorfismos de bandas C, son diferencias heredables y estables que son transmitidas de acuerdo a leyes mendelianas (Magenis, 1977).

1.4. Objetivos

La heterocromatina constitutiva representa un sistema polimórfico que muestra claramente una continua variación respecto a tamaño del bloque heterocromático como así también a su posición relativa. Durante mucho tiempo se ha considerado que estas variantes no producían efectos detectables en el fenotipo.

Por otra parte, diferentes investigaciones han permitido sostener que para que un individuo desarrolle una neoplasia, debe observarse alguna mutación genética, presencia de factores hereditarios o ambos.

Con referencia a esto, se ha sugerido que puede haber un vínculo entre los polimorfismos frecuentes en esta heterocromatina y la susceptibilidad a desarrollar una neoplasia, con lo que cobra importancia analizar si alguna variante heterocromática en particular tiene relación con el riesgo a padecer cáncer, y de qué manera pueden estar involucradas en los cambios genéticos que acompañan a la transformación maligna.

Considerando lo anterior, los objetivos de este trabajo son:

- Señalar la constitucionalidad de las variantes heterocromáticas
- Establecer la frecuencia de heteromorfismo en las poblaciones control y neoplásica para los cromosomas 1, 9 y 16
- Determinar si existe alguna variable característica de la población leucémica
- Valorar el significado biológico de estas variantes heterocromáticas en la población leucémica
- Analizar el polimorfismo de la heterocromatina constitutiva en neoplasias..

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Muestra

2.1.1. Características generales

El estudio cromosómico se llevó a cabo en linfocitos de sangre periférica (SP) y en células de médula ósea (MO) con la utilización de la técnica de bandas C, analizándose ambos tejidos o sólo SP, según el caso.

El estudio fue realizado en 175 individuos: 55 controles y 120 enfermos de leucemia.

Se consideró control a todo individuo sano y normal, es decir, sin enfermedad aparente ni malformación alguna. Los pacientes provinieron fundamentalmente de las Secciones Oncología y Clínica Médica del Instituto de Investigaciones Hematológicas "Mariano R. Castex" de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires.

Las leucemias constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades malignas de etiología desconocida, caracterizadas por una deficiente producción de tejido hematopoyético y por la proliferación generalizada de leucocitos anormales o inmaduros en la médula ósea y otros tejidos reticuloendoteliales.

Esta patología puede ser diferenciada de acuerdo con las características morfológicas de su tipo celular en linfoblástica y no linfoblástica, incluyendo este último grupo, las mieloblásticas, promielocíticas, mielomonocíticas, monoblásticas y eritroleucemias.

Por otra parte, tomando como parámetro la madurez celular, se las puede clasificar en agudas y crónicas, encontrándose en las primeras, un infiltrado medular compuesto de células muy jóvenes, en tanto que las últimas, presentan una mayoría de células diferenciadas.

Los 120 pacientes estudiados presentaron los siguientes diagnósticos: 56 con Leucemia Mieloide Crónica (LMC); 45 con Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) y 19 con Leucemia No Linfoblástica Aguda (LNLA) (Tabla IV).

Tabla IV: CARACTERIZACION DE LA MUESTRA POR GRUPO, DIAGNOSTICO Y SEXO

Grupo estudiado	Diagnóstico	n° de individuos		
		mujeres	varones	total
Control		24	31	55
Leucemias	LMC	20	36	56
	LLA	15	30	45
	LNLA	7	12	19
Total		66	109	175

En los controles, se advierte una cantidad similar de individuos de ambos sexos en tanto que en los enfermos, los hombres prácticamente duplicaron en número a las mujeres ya sea para cada diagnóstico en particular como para el total de los mismos.

En la Tabla V se puede ver la distribución de edades en los controles y en los enfermos. Cada uno de los diagnósticos tiene una distribución particular (para ambos sexos) por edades, que depende de la incidencia de cada leucemia en los distintos grupos etarios.

En la LMC, el 16% de los pacientes tenía entre 60 y 75 años, más de la mitad de ellos (69%) con 45 años o más, en tanto que sólo el 9% tenía entre 0 y 15 años.

Lo contrario ocurrió con las leucemias agudas, especialmente con la linfoblástica aguda, donde la mayor cantidad de los pacientes (78%) se encontró entre los 0 y 15 años y sólo el 11% tenía más de 45 años. En la LNLA, el 68% tenía menos de 30 años y el 21%, 45 años o más.

2.1.2. Caracterización de las muestras

2.1.2.1. Leucemias crónicas

La LMC se puede clasificar citogenéticamente en dos grupos: Ph^{1+} y Ph^{1-} , de acuerdo a la presencia o no, en las células leucémicas, del cromosoma Filadelfia (Ph^1) que es el marcador característico de esta enfermedad.

Tabla V: DISTRIBUCION DE EDADES POR GRUPO, DIAGNOSTICO Y SEXO

Edades (años)	Grupo estudiado	Diagnóstico	n° de individuos		
			varones	mujeres	total
Controles					
0-15			17	15	32
15-30			7	7	14
30-45			7	2	9
Leucemias					
0-15		LMC	2	3	5
15-30			8	5	13
30-45			7	2	9
45-60			14	6	20
60-75			5	4	9
LLA					
0-15			27	8	35
15-30			2	3	5
30-45			7	2	9
45-60			1	4	4
LNLA					
0-15			2	3	5
15-30			5	3	8
30-45			1	1	2
45-60			4	0	4

Teniendo en cuenta el estudio citogenético en médula ósea, se analizaron 45 pacientes (Tabla VI). También se incluyeron en este estudio, pacientes en los cuales no se pudo efectuar el estudio citogenético en este material desconociéndose por tal motivo, la presencia o no del marcador, dando un total de 56 pacientes.

Tabla VI: CARACTERIZACION DE LA MUESTRA POR ESTUDIO CITOGENETICO DE MEDULA OSEA

Sexo	Con estudio citogenético		Sin estudio citogenético	Total de pacientes
	Ph ¹⁺	Ph ¹⁻		
Femenino	15	1	4	20
Masculino	20	9	7	36
Total	35	10	11	56

Los pacientes estudiados se pudieron clasificar de acuerdo al momento en el cual se les efectuó el estudio en: a) no tratados (analizados al momento del diagnóstico) y b) en tratamiento (en etapa de control clínico o en crisis blástica) (Tabla VII).

Tabla VII: DISTRIBUCION DE LOS PACIENTES DE ACUERDO AL ESTADIO CLINICO

Sexo	Sin Tratamiento	Con tratamiento		Total
		Control clínico	Crisis blástica	
Femenino	11	7	2	20
Masculino	29	1	6	36
Total	40	8	8	56

2.1.2.2. Leucemias Agudas

De los 64 pacientes con leucemia aguda estudiados, 45 tuvieron el diagnóstico de linfoblástica (LLA) y 19 de no linfoblástica (LNLA).

Entre los enfermos con LLA (15 mujeres y 30 varones), se estudiaron 30 pacientes sin tratamiento, al momento del diagnóstico y 15 tratados, en remisión clínica, parcial o completa (Tabla VIII).

Tabla VIII: DISTRIBUCION DE LOS PACIENTES CON LLA DE ACUERDO AL ESTADIO CLINICO

Sexo	Sin Tratamiento	Con tratamiento		Total
		remisión parcial	remisión completa	
Femenino	11	1	3	15
Masculino	19	1	10	30
Total	30	2	13	45

En cuanto a los pacientes con leucemia no linfoblástica (LNLA), 7 fueron mujeres y 12 hombres. Dentro de este grupo se estudiaron dos variedades: leucemia mieloblástica y mielomonocítica y como en las anteriores, los pacientes podían o no estar en tratamiento.

En la Tabla IX se pueden ver los pacientes estudiados para cada uno de los diagnósticos y sexo.

Tabla IX: DISTRIBUCION POR SEXO Y VARIEDAD DE LNLA

Sexo	Tratamiento				Total
	Mieloblástica		Mielomonocítica		
	S.T.	C.T.	S.T.	C.T.	
Femenino	5	1	1		7
Masculino	8	2	1	1	12
Total	13	3	2	1	19

S.T.: Sin Tratamiento

C.T.: Con Tratamiento

2.2. Técnicas de Cultivo

2.2.1. Sangre periférica

El cultivo de linfocitos de sangre periférica se efectuó según la técnica de Buckton y Evans (1973). En un Erlenmeyer de 50 ml, se colocaron 10 cc de medio F-10 (GIBCO); 1.5 cc de suero fetal bovino; 0.1 cc de fitohemaglutinina utilizada como estimulante mitótico de los linfocitos y 0.8 cc de sangre periférica heparinizada, incubándose en estufa a 37°C durante 72 hs.

La cosecha del material se comenzó con el agregado al cultivo de 0.2 cc (10^{-4} M) de colcemid (CIBA) durante 1 1/2 h como detenedor de la mitosis en metafase. Posteriormente, se centrifugó para separar el sobrenadante, se sometió el sedimento a tratamiento hipotónico con CLK al 0.53% y se efectuó la fijación con metanol: ácido acético (3:1) haciéndose los extendidos por goteo.

2.2.2. Médula ósea

Las muestras fueron obtenidas mediante una punción de cresta ilíaca o de esternón por aspiración de aproximadamente 1cc de material medular, sin heparina; se separaron en dos alícuotas y se procesaron de dos maneras diferentes:

a. Método directo: la primera de las fracciones se recogió en 50 cc de una solución salina glucosada (PBS) con esfe-

ras de vidrio para desfibrinar y se agitó durante 10 minutos centrifugando y desechando luego, el sobrenadante. El sedimento, al igual que la sangre periférica, fue sometido a tratamiento hipotónico de CLK y fijación con alcohol metílico: ácido acético.

b. Cultivo de 48 horas: la segunda fracción se recogió en medio F-10 con suero fetal bovino al 15% y se colocó en estufa de cultivo a 37°C durante 48 hs. A continuación, se obtuvo un sedimento por centrifugación y se lo sometió a tratamiento hipotónico y posterior fijación, trabajando exactamente igual que en el método directo. Finalmente, se procedió a efectuar los extendidos.

2.3. Estudio citogenético

2.3.1. Obtención de bandas C

Para obtener las bandas C se empleó la técnica de Summer (1972) modificada. Esta consiste básicamente en una hidrólisis ácida con ClH 0,2N durante 30 min con posterior desnaturalización del ADN con solución de $(OH)_2Ba$ al 5% y seguido de renaturalización con una solución salina citratada (SSC) 2X durante 2 hs a 60°C. A continuación, se efectuó la coloración con Giemsa en buffer de fosfato a pH 6,8 (1 cc de Giemsa en 50 cc de buffer).

2.3.2. Análisis de bandas C

Se analizaron las bandas C de los cromosomas 1, 9 y 16

por observación directa al microscopio de un mínimo de 10 metafases del mismo individuo.

Se consideró heteromorfismo a la presencia de una variación en tamaño o posición de la banda heterocromática.

El primer tipo de variante estuvo dado por una modificación del 25% o más (ya sea aumento o disminución) de la banda de un cromosoma, respecto de su homólogo o de la banda normal. La variante de posición, denominada inversión pericéntrica, puede ser parcial o total, en caso de producirse el pasaje de parte o de toda la región heterocromática del brazo largo al corto del mismo cromosoma, respectivamente. Para designar estas variaciones, se utilizó la nomenclatura establecida en la Conferencia de París (1971), denominado:

h: bloque heterocromático (banda C)
qh+: bloque heterocromático aumentado
qh-: bloque heterocromático disminuído
inv: inversión pericéntrica

2.4. Análisis estadístico

Para efectuar las comparaciones de los distintos resultados obtenidos, se utilizó la prueba χ^2 (Bliss, 1967) y distintas modificaciones de ella.

Las comparaciones de proporciones se efectuaron mediano

te ensayos G (Woolf, 1957) y fue utilizada una alternativa de la prueba χ^2 para tablas de contingencia cuando las frecuencias esperadas son pequeñas (Fisher, 1959). En toda tabla de contingencia se aplicó previamente, la corrección de Yates para continuidad (Yates, 1934).

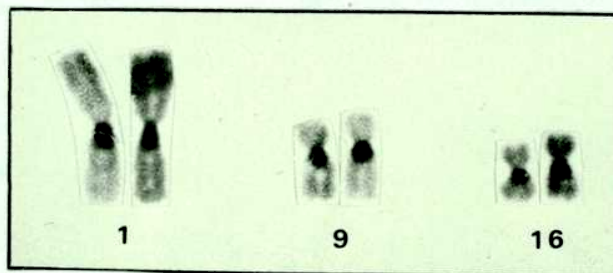
3. RESULTADOS

3.1. Valoración del heteromorfismo
3.1.1. Variabilidad entre ambos sexos
3.1.1.1. Variantes totales

Se describen a continuación, los resultados correspondientes a la valoración del polimorfismo de los bloques heterocromáticos de los cromosomas 1, 9 y 16, realizados en 175 individuos.

En la figura 2, se observan los pares cromosómicos en estudio con su característico bloque heterocromático, puesto en evidencia con la técnica de bandeado C, utilizada para este análisis.

Figura 2: BANDAS C EN LOS CROMOSOMAS 1, 9 y 16



Los individuos estudiados pertenecían a dos poblaciones: una de 55 personas normales, considerada grupo control, y la otra, integrada por 120 pacientes con distintos tipos de leucemias: 56 casos de LMC, 45 de LLA y 19 de LNLA. La presencia de polimorfismos de tamaño o posición en los pares analizados, se observó tanto en varones como en mujeres de las poblaciones analizadas. Esta situación motivó una comparación para detectar la posible existencia de diferencias según el sexo. En la misma, se tuvo en cuenta el número de individuos que presentaron heteromorfismos, sin considerar el tipo de variante o cromosoma involucrado.

Se analizó el comportamiento de ambos sexos para cada una de las poblaciones comparando las frecuencias observadas en hombres (Tabla IX) y mujeres (Tabla X), tanto en los controles como en cada uno de los diagnósticos y en la población neoplásica.

Tabla IX: PROPORCION DE VARONES CON HETEROMORFISMO CROMOSOMICO

Grupo Estudiado	Nº de individuos analizados	Nº de individuos con heteromorfismo (%)
Control	31	13 (42)
LMC	36	27 (75)**
LLA	30	23 (77)**
LNLA	12	8 (67)**
LMC+LLA+LNLA	78	58 (75)**

** : Diferencias altamente significativas respecto del control
 $p < 0,001$

Tabla X: PROPORCION DE MUJERES CON HETEROMORFISMO CROMOSOMICO

Grupo Estudiado	N° de individuos analizados	N° de individuos con heteromorfismo(%)
Control	24	11 (46)
LMC	20	15 (75)**
LLA	15	14 (93)**
LNLA	7	5 (71)**
LMC+LLA+LNLA	42	34 (81)**

** : Diferencias altamente significativas respecto del control
 $p < 0,001$

El número de individuos controles analizados para cada sexo fue similar y las frecuencias observadas fueron del 42% y 46% para varones y mujeres respectivamente, valores que no difieren estadísticamente. En las leucemias, el número de varones casi duplicó al de mujeres y la proporción de cada sexo con variantes en cada uno de los diagnósticos, tampoco mostró diferencias significativas; esto indicaría un comportamiento similar en ambos sexos en lo relativo a variantes totales.

Sabiendo que ambos sexos se comportaban de igual manera, tanto en pacientes como en los individuos normales, se trató de determinar si dentro del mismo sexo había diferencias, de acuerdo a la población que se analizara o que presentaran la misma proporción de heteromorfismos en bandas C. Para ello, se comparó la proporción de mujeres que presentaba variantes en el grupo control

con la correspondiente a cada diagnóstico y a la población neoplásica. De este análisis, surgió que la prevalencia de polimorfismos en el grupo control es menor que lo observado para las distintas leucemias (Tabla X) con diferencias altamente significativas ($p < 0,001$). Cuando se efectuó la misma comparación en hombres (Tabla IX), se obtuvieron iguales resultados. Estas observaciones permitieron afirmar que en el grupo control, tanto las mujeres como los varones diferían del grupo leucémico, con idéntico comportamiento.

Al enfrentar los valores obtenidos para cada sexo en los distintos diagnósticos, no se observaron diferencias ni en varones ni en mujeres, es decir, que ambos presentaron igual frecuencia de heteromorfismo, sin importar el tipo de leucemia analizada.

3.1.1.2. Variantes por cromosoma

Hasta el momento, se analizó la frecuencia de individuos con variantes, sin tener en cuenta cada par cromosómico en particular. En la Tabla XI se observa la proporción de mujeres que presentaron variantes en cualquiera de los tres cromosomas. Estos datos se compararon con los correspondientes a varones (Tabla XII), para determinar si el comportamiento de ambos sexos era el mismo en los tres pares cromosómicos.

Ambos sexos presentaron igual proporción de individuos con variantes heterocromáticas tanto en el cromosoma 1 como en el 9 y el 16, no encontrándose diferencias significativas entre sexos en ninguno de los grupos estudiados, fueran éstos controles o pacientes (Figura 3).

Figura 3: FRECUENCIA DE INDIVIDUOS DE AMBOS SEXOS CON VARIANTES EN LOS TRES PARES CROMOSOMICOS

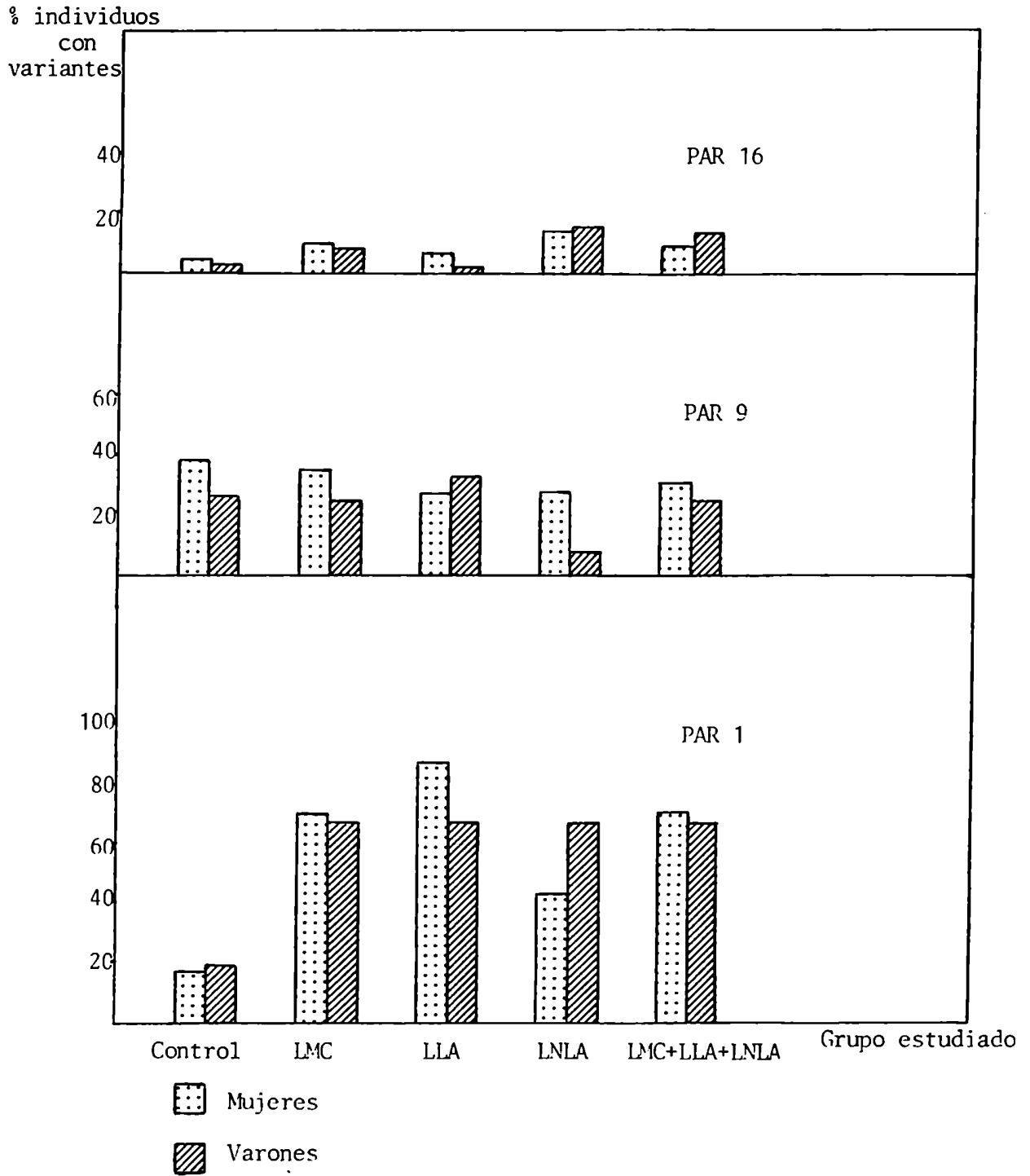


Tabla XI: PROPORCION DE MUJERES CON VARIANTES EN CADA UNO DE LOS CROMOSOMAS

Grupo Estudiado	N° de individuos analizados	N° individuos con heteromorfismo (%)		
		Cr.1	Cr.9	Cr.16
Control	24	4(17)	9(38)	1(4)
LMC	20	14(70)	7(35)	2(10)
LLA	15	13(87)	4(27)	1(7)
LNLA	7	3(43)	2(28)	1(14)
LMC+LLA+LNLA	42	30(71)	13(31)	4(10)

Tabla XII: PROPORCION DE VARONES CON VARIANTES EN CADA UNO DE LOS CROMOSOMAS

Grupo Estudiado	N°de individuos analizados	N°individuos con heteromorfismo(%)		
		Cr.1	Cr.9	Cr.16
Control	31	6(19)	8(26)	1(3)
LMC	36	24(67)	9(25)	3(8)
LLA	30	20(67)	10(33)	6(2)
LNLA	12	8(67)	1(8)	2(16)
LMC+LLA+LNLA	78	52(67)	20(25)	11(14)

Teniendo en cuenta estos resultados y asumiendo que ambos sexos se comportaron de la misma manera, en las valoraciones subsiguientes se trabajó con el número total de individuos para cada grupo.

3.1.2. Variabilidad poblacional

3.1.2.1. Prevalencia del heteromorfismo total

El primer interrogante que debió contestarse fue si estas dos poblaciones presentaban o no diferencias en cuanto a cantidad de individuos con variantes. Para ello, se determinó la proporción de personas con heteromorfismo en alguno de los cromosomas estudiados, tanto en el grupo control como en cada uno de los diagnósticos y en la población neoplásica (LMC+LLA+LNLA) (Tabla XIII).

Tabla XIII: PROPORCION DE INDIVIDUOS CON VARIANTES HETEROCROMATICAS

Grupo Estudiado	N° de individuos estudiados	% de individuos con variantes
Control	55	44
LMC	56	75**
LLA	45	82**
LNLA	19	68*
LMC+LLA+LNLA	120	77**

* : Diferencias significativas respecto del control ($p < 0,05$)

** : Diferencias altamente significativas respecto del control ($p < 0,001$).

Estos valores indicaron que en las leucemias existía una mayor proporción de individuos con variantes heterocromáticas que en los controles. Al efectuarse la valoración estadística, ésta indicó la presencia de diferencias altamente significativas en pacientes de LLA y LMC con respecto a los controles ($p < 0,001$), mientras que aquellos con LNLA sólo mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$).

Cuando se confrontaron las tres leucemias entre sí, no se observaron diferencias, por lo que se consideró que tenían el mismo comportamiento, permitiendo así, reunir las en una única población neoplásica. Su comparación con los controles evidenció diferencias altamente significativas ($p < 0,001$).

3.1.2.2. Prevalencia del heteromorfismo por cromosoma

El incremento de individuos leucémicos con variantes respecto de la población normal estudiada, puso en evidencia la necesidad de establecer si este aumento se debía a los tres cromosomas o a alguno de ellos en particular. Se debió entonces determinar la proporción de individuos de cada grupo que presentaba heteromorfismo para cada uno de los cromosomas (Tabla XIV).

La comparación de estos resultados indicó que tanto las leucemias como los controles, presentaban la misma proporción de individuos con variantes en los cromosomas 9 y 16.

Por el contrario, cuando se comparó el cromosoma 1, se vio que las tres entidades estudiadas tenían mayor cantidad de

Tabla XIV: PROPORCION DE INDIVIDUOS CON VARIANTES POR CROMOSOMA

Grupo Estudiado	N° de individuos estudiados	N°de individuos con variantes en los cromosomas (%)		
		1	9	16
Control	55	10(18)	17(31)	2(4)
LMC	56	38(68)**	16(29)	5(9)
LLA	45	33(73)**	14(31)	7(16)
LNLA	19	11(58)**	3(16)	3(16)
LMC+LLA+LNLA	120	82(68)**	33(28)	15(12)

** : Diferencias altamente significativas respecto del control
($p < 0,001$)

individuos con variantes que la población de referencia, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$).

Quando se cotejaron los resultados de las distintas leucemias para los tres cromosomas, no se detectaron diferencias significativas, observación que permitió reunir las en la población neoplásica. Esta última al ser comparada con el grupo normal, sólo presentó diferencias altamente significativas ($p < 0,001$) para el cromosoma 1, con valores del 68% y 18%, respectivamente.

En la figura 4, se advierten claramente las diferencias y similitudes existentes entre los controles y la población neoplásica para cada uno de los cromosomas examinados.

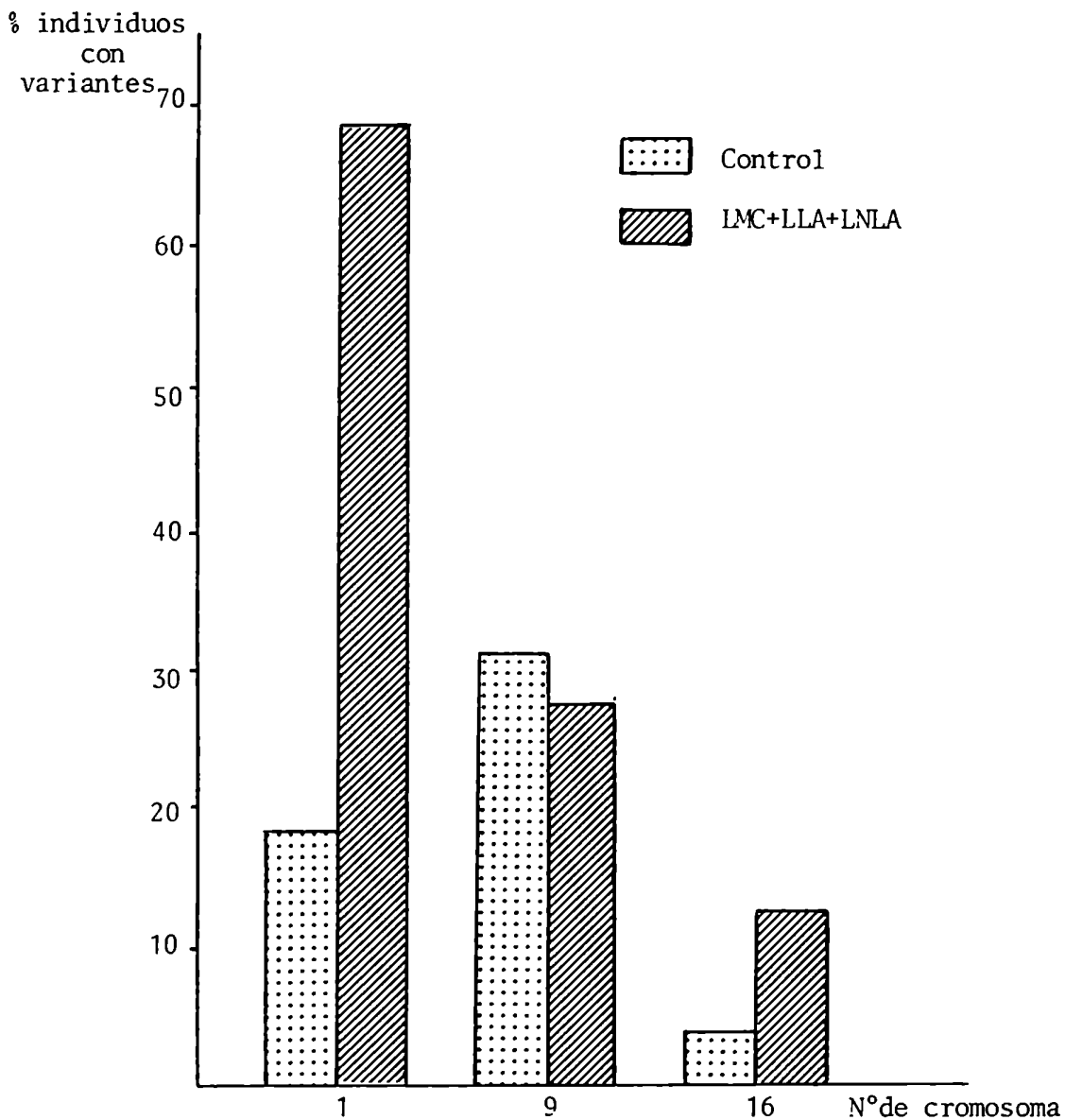


Figura 4: PROPORCION DE INDIVIDUOS CON VARIANTES HETEROCROMATICAS EN LOS PARES 1, 9 y 16

Posteriormente, fue de interés determinar los valores poblacionales de cada una de las variantes detectadas para los controles y pacientes; esto permitió realizar la comparación en tre ellas y con otras poblaciones normales descriptas en la lite ratura.

Tal como fue especificado, las variantes analizadas en cada cromosoma fueron divididas en variantes de tamaño: qh+ y qh-, o de posición: inversión pericéntrica, denominando inversión parcial, al pasaje de parte del bloque heterocromático desde el brazo largo (q) al brazo corto (p) e inversión total al pasaje del bloque completo.

Para efectuar este análisis, se tomó cada uno de los cro mosomas por separado y, dentro de estos, se analizó la cantidad de individuos con cada una de las variantes.

Cromosoma 1

Considerando los valores de heteromorfismo para el cro mosoma 1, y viendo que el 18% de los individuos controles, así como el 68% de los pacientes presentaron variantes en este cromosoma, se determinó dentro de esos valores, cuales correspondían a cada una de las variantes. En la Tabla XV, se puntualiza la cantidad de in dividuos con polimorfismos en este cromosoma, con el detalle para cada variante.

El aumento de tamaño del bloque heterocromático, 1qh+ (Fi gura 5), se observó en el 9% de los controles y entre el 16% y el

Tabla XV: FRECUENCIA DE INDIVIDUOS CON LAS DISTINTAS VARIANTES DEL CROMOSOMA 1

Grupo Estudiado	N° de individuos analizados	Variante observada (%)		
		1qh+	1qh-	inv 1
Controles	55	5(9)	3(5)	2(4)
LMC	56	9(16)	26(46)**	7(12)
LLA	45	8(18)	23(51)**	5(11)
LNLA	19	4(21)	9(47)**	3(16)
LMC+LLA+LNLA	120	21(18)	58(48)**	15(12)

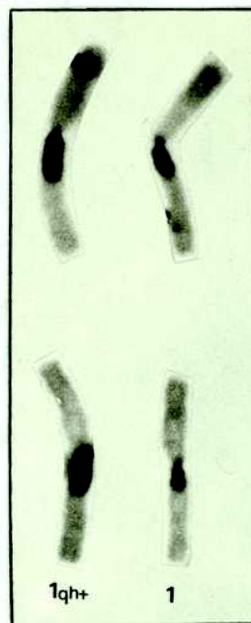
** : Diferencias altamente significativas respecto del control
 $p < 0,001$

21% en las leucemias, siendo el valor para la población neoplásica del 18%. Tanto la población normal como la de pacientes, presentaron una proporción similar de individuos con 1qh+, no observándose diferencias significativas al efectuarse la comparación de estos valores.

Por otra parte, cuando se tuvo en cuenta la disminución de tamaño de la banda C, 1qh-, se pudo determinar que los controles presentaron un 5% de individuos con esta variante y en las distintas leucemias entre el 46% y el 51%. La proporción de individuos de la

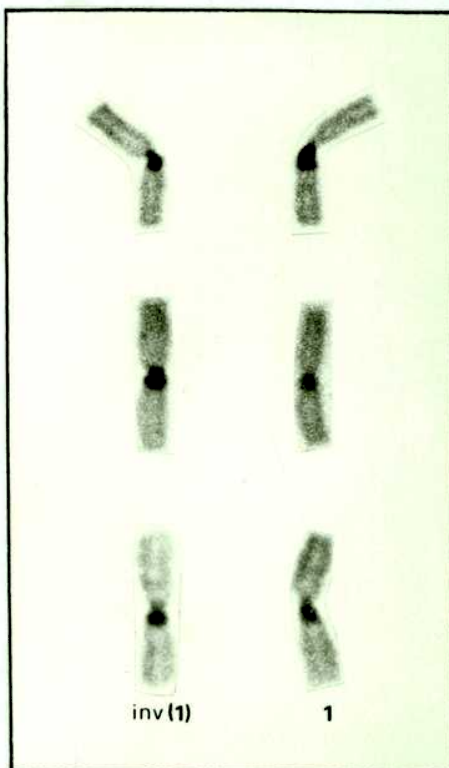
población neoplásica que presentó 1qh- fue del 48%. Estos valores de las poblaciones enfermas respecto de la control, mostraron diferencias altamente significativas en todos los casos ($p < 0,001$). Por el contrario, al enfrentar las distintas poblaciones leucémicas entre sí, no se detectaron diferencias significativas.

Figura 5: BANDA C EN CROMOSOMA 1 CON VARIANTE 1qh+



Por último, al analizar los datos correspondientes a inversión pericéntrica, inv (1), (Figura 6), se detectaron valores semejantes para todos los grupos, indicando que tanto controles como enfermos, tenían una proporción similar de individuos con esta variante, entre el 4% y el 16%. Cabe destacar la ausencia de inversión total del bloque heterocromático para este cromosoma.

Figura 6: CROMOSOMA 1 CON BLOQUE HETEROCROMATICO NORMAL Y CON IN-
VERSION, INV (1)



Estas comparaciones permiten concluir que en la población normal, la prevalencia de cada una de las variantes ha sido prácticamente la misma, mientras que en los tres grupos con leucemia y por ende en la población neoplásica, la gran proporción existente de individuos con heteromorfismo para este cromosoma, se debió al elevado porcentaje de pacientes que presentaron 1qh-.

Cromosoma 9

Para cada una de las variantes detectadas en el cromosoma 9, se analizó la proporción de individuos de los distintos grupos, que presentaban cada una de ellas (Tabla XVI).

Tabla XVI: FRECUENCIA DE INDIVIDUOS CON LAS DISTINTAS VARIANTES DEL CROMOSOMA 9

Grupo Estudiado	N° de individuos analizados	Variante observada (%)		
		9qh+	9qh-	inv 9
Controles	55	8(14)	6(11)	3(5) [°] 1(2) ^{°°}
LMC	56	7(12)	4(7)	5(9)
LLA	45	3(7)	7(16)	5(11)
LNLA	19	1(5)	2(11)	1(5)
LMC+LLA+LNLA	120	11(9)	13(11)	11(9)

[°]: Inversión parcial

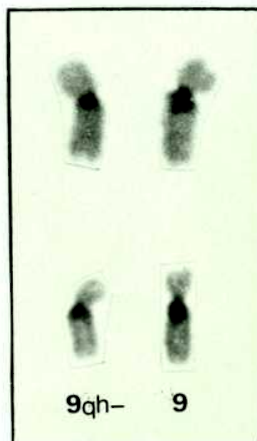
^{°°}: Inversión total

El examen de cada uno de los polimorfismos, permitió determinar que el 14% de los individuos de la población control presentó el 9qh+, oscilando estos valores en las leucemias, entre el 5% y el 12%. La comparación de las distintas leucemias entre sí, no demostró diferencias significativas y se obtuvieron al comparar los pacientes con los controles, idénticos resultados.

La presencia de 9qh- (Figura 7), en todas las poblaciones, se determinó de manera similar a lo ocurrido con el 9qh+ ya que la proporción de individuos fue la misma en los distintos grupos, no existiendo ningún tipo de diferencia.

Del mismo modo, la proporción de individuos que mostró 9qh+ fue prácticamente la misma que presentó 9qh-, tanto en pacientes como en controles.

Figura 7: CROMOSOMA 9 CON BANDA C NORMAL Y CON VARIANTE 9qh-



Cuando se analizó la variante de posición para este cromosoma, inv(9), se encontró que los controles presentaron un 7% de individuos con este polimorfismo, correspondiendo el 5% a inversión parcial y el 2% a inversión total. En los pacientes se detectaron entre el 5% y el 11% de individuos con inversión parcial y no se observó ningún individuo con inversión total. Cuando se compararon estos valores, no se hallaron diferencias significativas entre leucemias, ni con respecto a controles.

Los niveles de individuos con variantes en este cromosoma, no ofrecieron diferencias y fueron muy similares, mostrando que existía la misma cantidad de individuos con 9qh+, con 9qh- y con inversión, cualquiera fuera el grupo humano que se tuviera en cuenta.

Cromosoma 16

Este cromosoma fue el que presentó la menor cantidad de individuos con variantes (Tabla XVII), ya fueran estos, normales o pacientes.

La presencia de la banda C aumentada se observó en un 4% de individuos controles, mientras que en las leucemias se halló entre un 9% y un 16%, y en la población neoplásica fue del 10%. Estas cifras no presentan diferencias significativas y son muy similares a las vistas para el 9qh+.

Tabla XVII: FRECUENCIA DE INDIVIDUOS CON LAS DISTINTAS VARIANTES DEL CROMOSOMA 16

Grupo Estudiado	N° de individuos analizados	Variante observada (%)		
		16qh+	16qh-	inv 16
Control	55	2(4)		
LMC	56	5(9)		
LLA	46	4(9)	9(6)	
LNLA	19	3(16)		
LMC+LLA+LNLA	120	12(10)	3(2)	

El bloque heterocromático disminuído, 16qh-, (Figura 8), es la variante vista con menor frecuencia; sólo se observó en tres pacientes con LLA no existiendo en las otras leucemias o en controles. Dado que la proporción observada en los individuos con LLA, (6%), no fue estadísticamente diferente de la hallada en los otros diagnósticos, a pesar de no haberse encontrado esta variante, fue factible reunirlos en la población neoplásica. De esta manera, la proporción de individuos con cáncer que presentó la variante 16qh-, fue del 2%. En ningún caso se observó inversión pericéntrica, inv (16), ya sea parcial o total.

De acuerdo a lo observado, se deduce que este cromosoma es el que presenta mayor estabilidad del bloque, pues ya sea que se tuvieran en cuenta controles o pacientes, la cantidad de individuos

que presentó variantes fue muy baja respecto de los otros dos pa
res estudiados.

Figura 8: CROMOSOMA 16 CON BLOQUE HETEROCROMATICO NORMAL Y CON
16qh-.



3.1.3. Determinación de la frecuencia de dos variantes

Una vez determinadas las variaciones poblacionales, resultó importante analizar las frecuencias de aparición del heteromorfismo cromosómico, ya fueran totales o particulares. Para ello, se analizó la cantidad de variantes detectadas tanto en la población control como en pacientes en cada uno de los cromosomas en estudio (Tabla XVIII).

Tabla XVIII: NUMERO DE VARIANTES EN CONTROLES Y PACIENTES

Grupo Estudiado	N° individuos analizados	1			9			16			Total variantes
		qh+	qh-	inv	qh+	qh-	inv	qh+	qh-	inv	
Control	55	5	3	2	8	7	4	2			31
LMC	56	9	30	7	7	4	5	5			67
LLA	45	8	24	5	3	7	5	4	3		59
LNLA	19	4	10	3	1	2	1	3			24
LMC+LLA+LNLA	120	21	64	15	11	13	11	12	3		150

Observando estos datos, se advirtió que la cantidad de variantes totales encontradas en los controles, era menor que el número de individuos analizados, en tanto que en las 3 leucemias, la cantidad de heteromorfismos observados superaba al número de personas.

Para determinar el significado de esta diferencia se comparó la cantidad de individuos de cada grupo que presentó va riantes, con la cantidad de variantes observadas (Tabla XIX).

Tabla XIX: PRESENCIA DE INDIVIDUOS CON DOS VARIANTES CROMOSOMICAS

Grupo Estudiado	Nºde individuos con variantes	Nºde variantes observados	Individuos con 2 variantes (%)
Control	24	31	7(29)
LMC	42	67	25(60)**
LLA	37	59	22(60)**
LNLA	13	24	11(85)**
LMC+LLA+LNLA	92	150	58(63)**

** : Diferencias altamente significativas respecto del control
 $p < 0,01$

En todos los grupos, se pudieron observar individuos con más de una variante cromosómica. Específicamente, en los controles, un 29% de los que presentaron algún tipo de polimorfismo, tenían dos variantes, en tanto que en los pacientes, estos valores fueron desde el 60% en LMC y LLA, hasta el 85% en LNLA, valores que sólo mostraron diferencias significativas respecto del grupo control ($p < 0,01$).

De acuerdo a esto, se determinó la distribución de heteromorfismos y la composición de variantes en los individuos que pre-

sentaron dos de ellas. Ningún individuo de la población normal presentó más de un polimorfismo para el cromosoma 1, observación que se puntualiza en la Tabla XX. En la población neoplásica, de los 80 individuos que presentaban heteromorfismo, el 25% tenía dos variantes, siendo este porcentaje variable según el diagnóstico de referencia. Estos últimos valores comparados con los controles, evidenciaron diferencias significativas ($p < 0,05$). Es importante notar que la presencia de dos variantes en el mismo par cromosómico puede indicar la existencia de una en cada homólogo, o bien las dos en el mismo cromosoma.

Tabla XX: PRESENCIA DE INDIVIDUOS CON DOS VARIANTES EN EL CROMOSOMA 1

Grupo Estudiado	N° de individuos con variante	N° de variantes observadas	Individuos con 2 variantes (%)
Control	10	10	
LMC	36	46	10(28)
LLA	33	37	4(12)
LNLA	11	17	6(55)
LMC+LLA+LNLA	80	100	20(25)

Quando se usó el cromosoma 9 para realizar la comparación del número de individuos con variantes con el número de individuos

con dos de ellas (Tabla XXI), se observó que las personas con dos variantes eran muy escasas, no existiendo diferencias significativas entre ellas, independientemente de la población que se tuviera en cuenta.

Tabla XXI: PRESENCIA DE INDIVIDUOS CON DOS VARIANTES CON EL CROMOSOMA 9

Grupo Estudiado	Nº de individuos con variante	Nº de variantes observadas	Individuos con 2 variantes (%)
Control	17	19	2 (12)
LMC	16	16	
LLA	14	15	1 (7)
LNLA	3	4	1 (33)
LMC+LLA+LNLA	33	35	2 (6)

Cuando se realizó el mismo estudio para el cromosoma 16 (Tabla XXII), el número de variantes observadas, fue igual al número de individuos con variantes, tanto en controles como en pacientes. Esto indicó que no existían individuos con dos variantes en este par cromosómico.

Por lo expuesto, se piensa que en los pacientes las di-

ferencias observadas entre cantidad de individuos con variantes y número total de las mismas, se atribuyen en gran parte al cromosoma 1. La LMC sólo presentó variantes en este par y la LNLA, un 55% en este cromosoma y sólo el 33% en el 9. La población leucémica presentó valores del 25% y del 6% para el 1 y el 9, respectivamente. Por el contrario, la escasa diferencia en los controles, se debió a la existencia de dos variantes en el cromosoma 9.

Tabla XXII: PRESENCIA DE INDIVIDUOS CON DOS VARIANTES EN EL CROMOSOMA 16

Grupo Estudiado	Nºde individuos con variante	Nºde variantes observadas	Individuos con 2 variantes(%)
Control	2	2	
LMC	5	5	
LLA	7	7	
LNLA	3	3	
LMC+LLA+LNLA	15	15	

Este análisis tuvo en cuenta sólo la presencia de dos variantes en el mismo par, y no su existencia en dos cromosomas distintos, estudio que se efectuó posteriormente.

Cuando se analizaron los tres cromosomas al mismo tiempo, se determinó que en controles, sobre 7 individuos que presentaron dos variantes, dos de ellos las presentaban sólo en el cromosoma 9. En la población neoplásica, de los 58 pacientes analizados, 20 de ellos tenían dos variantes en el cromosoma 1 y dos pacientes las presentaron en el 9, haciendo un total de 22 personas con ambas variantes en el mismo par cromosómico. De esto se deduce que los 36 individuos restantes presentaron dos variantes en distintas combinaciones cromosómicas en tanto que en los controles, esto ocurrió en 5 individuos.

Estas observaciones puntualizaron el interés en el análisis de la frecuencia de heteromorfismo cromosómico de acuerdo a las variantes encontradas y al número de cromosomas estudiados.

3.1.4. Incidencia del heteromorfismo cromosómico

3.1.4.1. Frecuencia de variantes totales

En cada una de las poblaciones, se analizó primero la frecuencia de variantes totales respecto del número de cromosomas estudiados (Tabla XXIII).

Los controles presentaron un 9% de variantes en tanto que los pacientes mostraron entre un 20% y un 22%. Cuando se compararon estos valores entre los distintos diagnósticos, no se observaron diferencias significativas, por lo cual también fue válido reunir las tres poblaciones en una única población leucémica que mostró un 21% de variantes. Cuando se compararon las diferentes leucemias con la

población control, éstas presentaron mayor frecuencia de variantes mostrando diferencias altamente significativas en LMC y LLA ($p < 0,01$) y significativas ($p < 0,05$) en LNLA. Para la población leucémica, las diferencias fueron altamente significativas ($p < 0,01$).

Tabla XXIII: FRECUENCIA DE VARIANTES TOTALES

Grupo Estudiado	Nº de individuos estudiados	Nº de cromosomas analizados	Nº variantes observadas (%)
Control	55	330	31 (9)
LMC	56	336	67 (20)**
LLA	45	270	59 (22)**
LNLA	19	114	24 (21)*
LMC+LLA+LNLA	120	720	150 (21)**

* : Diferencias significativas respecto del control $p < 0,05$

** : Diferencias altamente significativas respecto del control $p < 0,01$

3.1.4.2. Frecuencia de variantes por cromosoma

A partir de las diferencias observadas en las frecuencias de variantes en controles y pacientes, se efectuó el análisis por

cromosoma, determinando la incidencia de variantes en cada uno de ellos. Esto se realizó para visualizar el par cromosómico responsable de estas desigualdades encontradas en ambas poblaciones. En la Tabla XXIV se detallaron los valores observados en cada cromosoma para todos los grupos.

Tabla XXIV: FRECUENCIA DE HETEROMORFISMO POR CROMOSOMA

Grupo Estudiado	N° cromosomas por par	Cantidad de variantes (%)		
		Cr1	Cr9	Cr16
Control	110	10(9)	19(17)	2(2)
LMC	112	46(41)**	16(14)	5(4)
LLA	90	37(41)**	15(17)	7(8)
LNLA	38	17(45)**	4(11)	3(8)
Total	240	100(42)**	35(15)	15(6)

** : Diferencias altamente significativas respecto del control
 $p < 0,01$

Al observar cada uno de los cromosomas, se analizó primero el par 1 donde los controles presentaron una frecuencia de variantes cromosómicas del 9%, en tanto que las leucemias tuvieron, según el diagnóstico, entre el 41% y el 45%, siendo el valor de la

población leucémica del 42%. Se compararon estas frecuencias entre sí y se vio que entre las diferentes leucemias no existían diferencias significativas permitiendo reunir las a todas en la población leucémica. Cuando las comparaciones se realizaron respecto de los controles, las diferencias observadas fueron altamente significativas ($p < 0,01$).

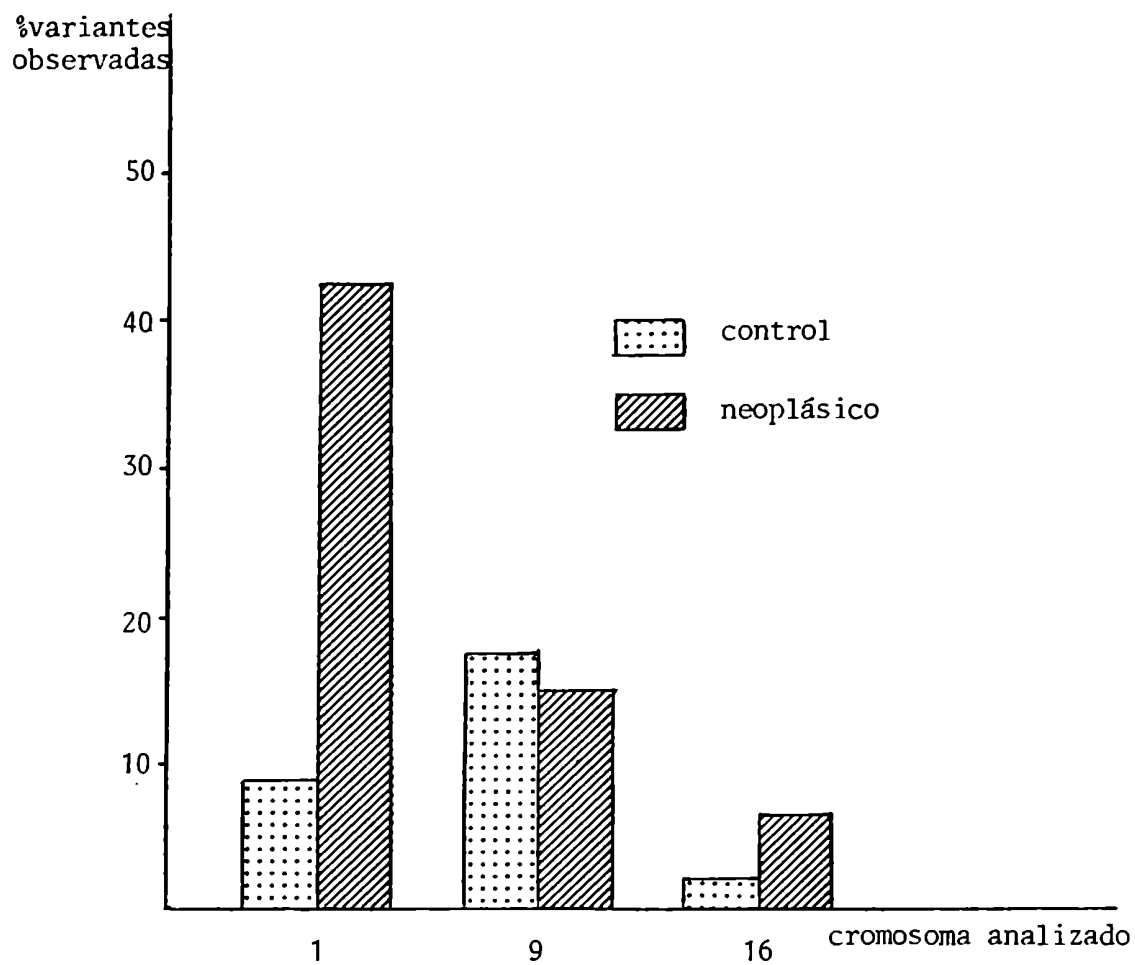
A continuación, se analizó el par 9, que presentó frecuencias de variantes similares para las distintas poblaciones. En los individuos normales, se detectó un 17% de variantes y en las leucemias, entre un 11% en LNLA y un 17% en LMC, siendo la incidencia en la población neoplásica de un 15%. Estos resultados indicaron que tanto en controles como en pacientes, el cromosoma 9 presentaba igual comportamiento en cuanto a número de variantes.

Por último, se estudió también el par 16, donde se observó un comportamiento semejante en todas las poblaciones al igual que en el cromosoma 9, pero mostrando frecuencias menores en todos los casos. En los controles se vio un 2% de variantes y en la población neoplásica un 6%, cifras que no arrojaron diferencias significativas.

Las frecuencias de variantes observadas por cromosoma para los tres pares analizados, tanto en la población normal como en la neoplásica, se pueden observar graficadas en la Figura 9.

En cuanto a la frecuencia de variantes observadas por

Figura 9: FRECUENCIA DE VARIANTES OBSERVADA POR CROMOSOMA



cromosoma dentro de cada población, se vio que en la control, la incidencia de heteromorfismo para los cromosomas 1 y 9 fue de 9% y 17%, respectivamente, valores que no mostraron diferencias significativas. Cuando estos dos pares fueron comparados con el cromosoma 16, éste último presentó una menor proporción de variantes (2%), siendo este valor significativamente menor que en los otros dos pares analizados ($p < 0,05$).

En los pacientes, la conducta de estos tres pares fue claramente diferente. Cuando se analizó el par 1, se observó una mayor incidencia de variantes que en el 9 y en el 16, para todos los diagnósticos y con diferencias altamente significativas ($p < 0,01$). Por el contrario, cuando se compararon el 9 y el 16, se repitió lo observado en la población control debido a que el par 16 siempre presentó menor frecuencia de variantes que el 9, con diferencias significativas ($p < 0,05$).

3.1.4.3. Incidencia de las variantes por cromosoma

3.1.4.3.1. Cromosoma 1

En lo que respecta a este cromosoma, se valoraron las variantes 1qh+, 1qh- e inv(1) (Tabla XXV). Comparándose cada una de ellas en los distintos grupos. Primero, se observó la frecuencia de 1qh+ en la población control y en los pacientes, con valores muy semejantes, entre 4% y 11%. Ninguna de las comparaciones efectuadas mostró diferencias significativas, indicando que la frecuencia de aparición de 1qh+ es independiente de la población analizada.

Tabla XXV: INCIDENCIA DE CADA VARIANTE EN EL CROMOSOMA 1

Grupo Estudiado	N° de cromosomas analizados	Frecuencia de variantes(%)		
		1qh+	1qh-	inv(1)
Control	110	5(4)	3(3)	2(2)
LMC	112	9(8)	30(27)**	7(6)
LLA	90	8(9)	24(27)**	5(6)
LNLA	38	4(11)	10(26)**	3(8)
LMC+LLA+LNLA	240	21(9)	64(27)**	15(6)

** : Diferencias altamente significativas respecto del control
 $p < 0,01$

Al determinar la frecuencia de inversión pericéntrica, inv(1), en las distintas poblaciones, se pudieron observar resultados similares. Se detectaron valores del 2% para los controles en tanto que en los pacientes, estos valores oscilaron entre el 6% y el 8%. En la población leucémica, la frecuencia correspondió a un 6%. Todas las inversiones detectadas correspondieron a inversiones parciales y sus valores, al ser comparados, no mostraron diferencias significativas.

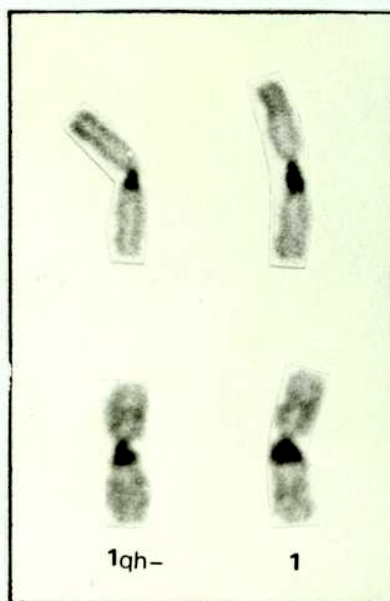
Por otro lado, cuando en la misma población se analizaron las variantes 1qh+ e inversión, y se compararon sus frecuen-

cias, no se observaron diferencias significativas en ninguna población, lo que indicaría que ambas se encontraban en igual proporción.

Al efectuar el estudio para 1qh- (Figura 10), se detectó que la frecuencia en controles era del 3% y en leucemias del 27%. Estos valores fueron comparados, detectándose diferencias altamente significativas ($p < 0,01$) entre las diferentes leucemias y controles, no así en la comparación de leucemias entre sí, análisis que no mostró diferencias significativas.

La comparación de esta variante con la 1qh+ e inv(1), dentro de la misma población, mostró que en controles, las frecuencias no presentaban diferencias significativas, indicando que la variante 1qh- aparecía en igual proporción que 1qh+ e inv(1). Sin embargo, cuando estas comparaciones se efectuaron en las leucemias, se pudo observar una proporción mayor de 1qh- respecto de las otras dos variantes con diferencias altamente significativas ($p < 0,01$).

Figura 10: CROMOSOMA 1 CON BANDA C NORMAL Y CON VARIANTE 1qh-



3.1.4.3.2. Cromosoma 9

Para este par se analizaron las variantes 9qh+, 9qh- e inv(9) (Tabla XXVI), habiéndose hallado y comparado la frecuencia de cada una de ellas.

Tabla XXVI: INCIDENCIA DE CADA VARIANTE EN EL CROMOSOMA 9

Grupo Estudiado	N° de cromosomas analizados	Frecuencia de variantes(%)		
		9qh+	9qh-	inv(9)
Control	110	8(7)	7(6)	4(4)
LMC	112	7(6)	4(4)	5(4)
LLA	90	3(3)	7(8)	5(6)
LNLA	38	1(3)	2(5)	1(3)
LMC+LLA+LNLA	240	11(5)	13(5)	11(5)

Inicialmente, se analizó el aumento del bloque heterocromático 9qh+, habiéndose encontrado valores similares en la población control, 7%, en las leucemias entre 3% y 6% y una frecuencia de 9qh+ (Figura 11) para la población leucémica de 5%. Estas cantidades cuando fueron confrontadas, no mostraron diferencias significativas indicando que las frecuencias observadas eran independientes de la población en consideración.

Figura 11: CROMOSOMA 9 CON BANDA C NORMAL Y CON VARIANTE 9qh+



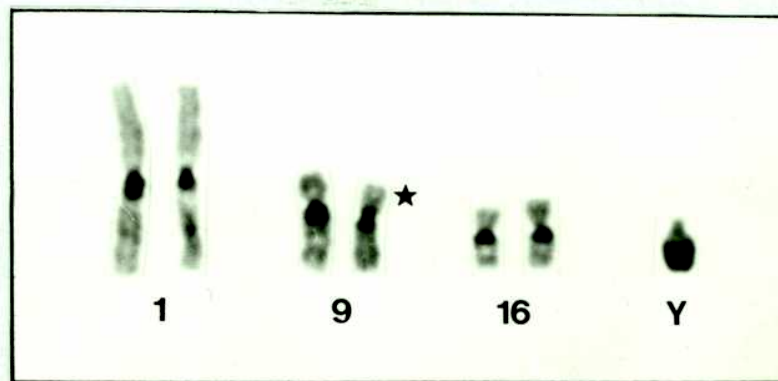
El análisis de la variante 9qh+ mostró frecuencias similares tanto en los controles como en los pacientes, con valores entre el 6% para los primeros, y el 5% para los últimos.

Entre los tres diagnósticos no se observaron diferencias significativas ante lo cual se decidió tomar la frecuencia de toda la población que no difería de la incidencia observada en la población control.

Al analizar la inversión pericéntrica parcial del bloque heterocromático inv(9) (Figura 12), se pudo observar una situación similar dada por la semejanza de las frecuencias observadas en las

distintas poblaciones, 4% para la normal y 5% para la leucémica.

Figura 12: CROMOSOMA 9 CON BANDA C NORMAL Y CON INVERSION PARCIAL



Al analizar la inversión pericéntrica total se creyó con veniente destacar que en la población control se halló un único ejemplar de inversión total de este cromosoma (Figura 13) con una frecuencia de 0,9% que no fue observado en los pacientes estudiados.

Cuando se compararon dentro de la misma población las fre cuencias de cada una de las variantes, no se observaron diferencias significativas ni en controles ni en pacientes. Esto indicó que la incidencia de las tres variantes era la misma en las poblaciones es tudiadas, no existiendo discrepancias ni entre variantes de la misma población ni entre las poblaciones entre sí.

Figura 13: CROMOSOMA 9 CON BANDA C NORMAL Y CON INVERSION TOTAL



3.1.4.3.3. Cromosoma 16

En este par cromosómico, al igual que en los anteriores, se analizó la incidencia de las variantes 16qh+, 16qh- e inv(16) (Tabla XXVII).

Tabla XXVII: INCIDENCIA DE CADA VARIANTE EN EL CROMOSOMA 16

Grupo Estudiado	N° de cromosomas analizados	Frecuencia de variantes (%)		
		16qh+	16qh-	inv(16)
Control	110	2(2)		
LMC	112	5(4)		
LLA	90	4(4)	3(3)	
LNLA	38	3(8)		
LMC+LLA+LNLA	240	12(5)	3(1)	

La presencia de 16qh+ (Figura 14) fue observada en todas las poblaciones estudiadas, con frecuencias del 2% para los individuos normales y del 5% para la población leucémica, oscilando entre el 4% y el 8% para los diferentes diagnósticos.

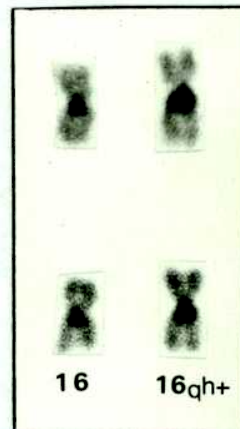
Estos valores no mostraron diferencias significativas y fueron similares a los encontrados para la misma variante en el cromosoma 9.

La disminución de tamaño de la banda C, 16qh- observada sólo en LLA y en muy baja frecuencia, 3%, permitió reunirlos con los otros diagnósticos para formar la población leucémica transformando esta incidencia en el 1%. Los valores de esta variante no difirieron

ron de los hallados para 16qh+.

En ningún caso, se detectó inversión pericéntrica de este cromosoma; esta observación, asociada a la escasa frecuencia de heteromorfismo de tamaño, muestra la gran estabilidad de este cromosoma tanto en la población control como en la leucémica.

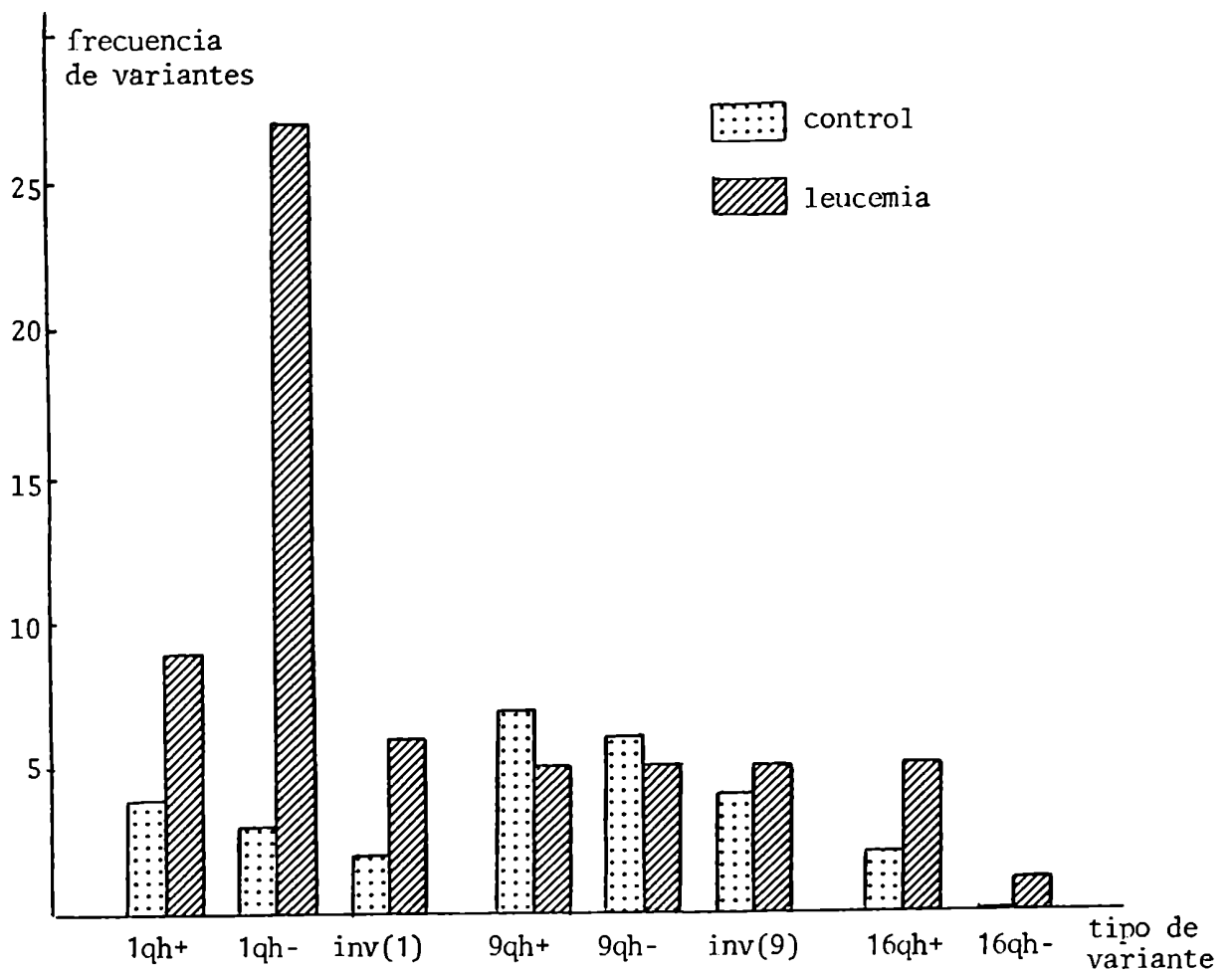
Figura 14: CROMOSOMA 16 CON BANDA C NORMAL Y CON VARIANTE 16qh+



En la Figura 15, se graficaron las frecuencias de cada una de las variantes heterocromáticas en los tres pares cromosómicos para la población control y la población leucémica. Se observa que la única variante que presentó un comportamiento diferente fue la 1qh-, mostrando una incidencia aumentada en las po-

blaciones enfermas y muy baja en la población control, que mostró para esta variante, una frecuencia similar a la observada para los otros cromosomas.

Figura 15: FRECUENCIA DE VARIANTES HETEROCROMATICAS EN LOS CROMOSOMAS 1, 9 y 16



4. DISCUSSION

La heterocromatina constitutiva representa un sistema polimórfico que involucra determinadas regiones cromosómicas, pudiendo presentar variaciones de tamaño o posición. La cantidad de esta heterocromatina en cada cromosoma puede variar considerablemente de un individuo a otro de la misma especie, como así también dentro de una misma población (Craig-Holmes, 1973). Si bien todos los cromosomas humanos tienen regiones heterocromáticas adyacentes al centrómero, estas variaciones son particularmente evidentes en los cromosomas con mayor cantidad de heterocromatina, como son el 1, 9 y 16.

Dado que aún el rol de la heterocromatina constitutiva no está totalmente comprendido, el significado del polimorfismo en las bandas C está sujeto a variadas interpretaciones (Nielsen, 1974). Hay autores que consideran que un exceso o deficiencia en la cantidad de heterocromatina, o bien una modificación en su ubicación, no produce efecto en el fenotipo del individuo que la presenta. Sin embargo, otros han observado asociación entre variabilidad heterocromática y daño fetal (Kunze, 1975), abortos recurrentes (Tsengki, 1976; Hemmings, 1979) y fenotipos anormales (Gardner, 1974; Fonatsch, 1977).

Estas observaciones ponen en evidencia la probable relación existente entre variabilidad heterocromática y efecto deletéreo, existiendo dos importantes aspectos a considerar en el análisis de esta asociación. El primero es la existencia de variantes de tamaño extremas en un sólo cromosoma del par y el otro, es la presencia de diferencias entre homólogos, no siendo necesaria la observación de grandes variaciones en alguno de ellos. Ambas situaciones podrían inducir modificaciones en el apareamiento so

mático.

Publicaciones recientes describen una mayor incidencia de variaciones de heterocromatina en pacientes con diferentes neoplasias: carcinoma de ovario (Atkin, 1977), carcinoma de testículo (Robson, 1981), desórdenes hematológicos (Prieto, 1977; Berger, 1979; Labal de Vinuesa, 1981, 1982), linfomas y tumor de mama (Labal de Vinuesa, 1981).

Teniendo en cuenta estas observaciones, se estudiaron y compararon células normales de pacientes neoplásicos y de individuos controles, a fin de poner en evidencia si alguna variante heterocromática en particular estaba asociada con el riesgo a padercer cáncer y analizar en qué forma esas variantes pueden facilitar los cambios genéticos que acompañan a la transformación maligna.

Las bandas C constituyen regiones generalmente estables, observándose que presentan la misma apariencia en diferentes tejidos normales de un determinado individuo (Hohen, 1977). En este trabajo se efectuó el análisis de las variaciones heterocromáticas en células de sangre periférica y médula ósea de diferentes individuos, no observándose diferencias entre el tejido normal y el neoplásico. Una situación similar se presentó al analizar simultáneamente sangre periférica y material de biopsia ganglionar de pacientes con linfomas (Labal de Vinuesa, 1981).

Esto corrobora la constitucionalidad de las variantes heterocromáticas, motivo que determinó la elección de un único teji

do de estudio en la presente oportunidad.

El primer análisis efectuado fue el comportamiento de la heterocromatina según el sexo, observándose la similitud del mismo en mujeres y varones para todos los grupos estudiados, tanto en el total de variantes observadas, como para cada cromosoma o variante en particular. Estos hallazgos coinciden con los observados en publicaciones previas (Craig-Holmes, 1977; Verma, 1978) al igual que las frecuencias de individuos con polimorfismos encontradas en los controles (Craig-Holmes, 1973).

En cuanto a los pacientes leucémicos, se observó que presentaban una mayor frecuencia de polimorfismos que la población control, sin existir diferencias en cada uno de los diagnósticos, lo que permitió considerarla como una única población. Estos hallazgos reafirman los detectados en otras entidades oncológicas (Atkin, 1977), sugiriendo de este modo que la población neoplásica presenta mayor frecuencia de individuos con heteromorfismos que los normales.

Este hallazgo determinó el interés de averiguar si dicho incremento se debía a un aumento de variantes en todos los cromosomas analizados o si existía alguno implicado en forma particular.

El análisis de los cromosomas 9 y 16 permitió ver que las frecuencias de individuos con heteromorfismos para cada uno de ellos es similar en los controles y en los leucémicos, siendo el cromosoma 16 el que presenta menor cantidad de individuos con variantes. La incidencia observada en este cromosoma, es debida fundamentalmente a la presencia del bloque mayor: 16qh+, hallazgo similar al de otros

autores (Ghosh, 1976). La cantidad de personas de ambos grupos, controles y leucémicos, que presentó variantes de tamaño o posición en el cromosoma 9 es similar, no existiendo diferencias entre 9qh+, 9qh- e inv(9). Los valores hallados coinciden con los encontrados en la bibliografía (McKenzie, 1975; Ghosh, 1975; Muller, 1975).

No ocurre lo mismo al considerar el comportamiento del cromosoma 1, cuyas características difieren notablemente de lo observado hasta el momento. En primer término, se observa que la población leucémica presenta una mayor frecuencia de variantes en este cromosoma, con diferencias altamente significativas respecto de la población control, la que no difiere de lo observado por otros autores (Ghosh, 1975; Carnevale, 1976; Verma, 1978).

Al determinarse la variabilidad poblacional de ambos grupos, se analizaron las frecuencias de aparición de heteromorfismo cromosómico, tanto de variantes totales como particulares.

Es llamativa la cantidad de variantes totales encontradas en los pacientes, que supera ampliamente el número de individuos estudiados; la diferencia con los controles radica que en estos, la cantidad de variantes halladas, es aproximadamente la mitad del total de individuos. En este último grupo, el 29% de los casos presenta dos variantes, en tanto que esta proporción se eleva al 63% al considerar la población leucémica.

Cuando se analizó la existencia de variantes en los dos miembros del mismo par, ésta no se observó en el cromosoma 16, en

tanto que en el 9, la misma se advirtió con proporciones del 6% y 12% para pacientes y controles, respectivamente. El cromosoma 1 muestra un comportamiento disímil, ya que el 25% de los enfermos presenta dos variantes en el par, observándose la ausencia de esta condición en los controles.

De esto se concluye que, tomando como base la frecuencia poblacional detectada en individuos normales, se puede deducir la frecuencia de heteromorfismo por cromosoma o viceversa. No se puede hacer lo mismo con una población neoplásica, dado que en ésta, la presencia de dos variantes es un fenómeno frecuente que impide efectuar el mismo razonamiento que en el grupo control, donde lo habitual es encontrar una variante por par.

Cuando se analiza la frecuencia de aparición de heteromorfismo cromosómico respecto a número de cromosomas analizados, teniendo en cuenta cada par estudiado y cada variante en particular, se observa que los cromosomas 9 y 16 se comportan de igual modo en ambas poblaciones, ya que el porcentaje de heteromorfismo es prácticamente el mismo en controles y pacientes.

Llama la atención el cromosoma 1, que en la población control analizada presenta el 9% de los cromosomas de este par con variantes, en tanto que en los pacientes ese valor asciende al 42%.

Observando cada variante en particular, se ve que en el cromosoma 16 no existe inversión pericéntrica, coincidiendo con la bibliografía, donde se describe la ausencia casi total de esta va

riante en otras poblaciones (Erdtmann, 1979).

En cuanto a las variantes del cromosoma 9, la inversión pericéntrica parcial fue encontrada en una proporción similar en ambas poblaciones, habiéndose observado en los controles una inversión total, equivalente al 0,9% de los cromosomas analizados, de este par. Las variantes de tamaño 9qh+ y 9qh- tienen igual frecuencia de aparición (10%) que el 16qh+ en ambas poblaciones.

Las variantes del cromosoma 1 en controles, presentan frecuencias similares a las encontradas en los otros dos pares, observándose una baja proporción de inversión pericéntrica y viéndose en los pacientes, valores similares para las variantes 1qh+ (9%) e inv(1) (6%). Cuando se analiza 1qh- se observa que el 27% de los cromosomas analizados presenta esta variante, lo cual difiere significativamente del valor encontrado en controles (3%), así como del hallado en las otras dos variantes del mismo cromosoma (inv(1) y 1qh+).

Se observa entonces que la única variante que presenta un comportamiento diferente en los pacientes respecto de los controles es 1qh-, que muestra una incidencia muy aumentada en las poblaciones leucémicas.

Cuando este análisis se efectuó en tumores sólidos (tumor de mama y linfomas), se comprobó una notable incidencia de inversión pericéntrica de la región heterocromática del cromosoma 1 (Labal de Vinuesa, 1981), hallazgo similar al visto en carcinoma de ovario (Atkin, 1977). Esto hablaría de la alta asociación entre va

riantes heterocromáticas en este cromosoma y existencia de neoplasia, observándose inv(1) en tumores sólidos y 1qh- en leucemias.

Estos hallazgos sugieren que estas modificaciones tendrían una acción en la predisposición a padecer neoplasia, específicamente la variante 1qh-, que estaría altamente asociada con leucemias.

Usualmente la heterocromatina muestra herencia mendeliana, existiendo algunas evidencias de segregaciones preferenciales (Driscoll, 1979).

Dado que no es necesaria la presencia de dos variantes, una en cada homólogo, para que ésta actúe, se sugiere la posibilidad que funcione como un gen autosómico dominante, expresándose como una predisposición.

Se sabe que la transformación celular in vitro está siempre acompañada de cambios en el complemento cromosómico, habiéndose comunicado la modificación de la heterocromatina constitutiva durante la transmisión horizontal in vitro (Hohen, 1972).

Existen evidencias que sugieren que las variaciones en la cantidad o distribución de la heterocromatina ejercen influencia en la aparición de los cambios cromosómicos (Zakharov, 1966; Moore, 1968); en células de mono, Cercopithecus aethiops, se vio que el aumento del contenido génico, con la subsecuente restauración del balance génico por un proceso de heterocromatinización, sería el principal evento que precedería a la transformación celular (Bianchi, 1971).

Sabemos que la heterocromatina se caracteriza por la presencia de ADN repetitivo, el que incluye varios tipos de ADN-Sat, localizados en diferentes cromosomas y que contienen sólo unos pocos genes. Estas características, sumadas a su disposición en interfase y a su expresión génica, permitieron postular un importante rol en la protección del genoma (Hsu, 1975) impidiendo que los genes estructurales, localizados en la eucromatina, sean agredidos por agentes físicos, químicos o biológicos.

Por otra parte, la especificidad de la distribución de los diferentes tipos de ADN-Sat, ha sugerido que ellos tienen una función en los procesos de reconocimiento y que pueden jugar un papel crítico cuando los cromosomas homólogos se relacionan en meiosis, mitosis e interfase (Peacock, 1977).

La recombinación entre homólogos tiene gran importancia, tanto en organismos normales como en procesos patológicos (Miklos, 1979). El crossing-over desigual entre homólogos, tanto durante la meiosis como en la mitosis de una línea germinal, puede originar cromosomas con mayor o menor cantidad de heterocromatina, así como también pueden ocurrir eventos recombinantes entre regiones no homólogas (Ferguson-Smith, 1974). Sin duda, tales procesos, que pueden involucrar la oposición de secuencias palindrómicas y ocurrir durante el proceso de replicación del ADN (Kurnit, 1979), pueden producirse también en células somáticas, generando heteromorfismos o traslocaciones de tipo Robertsoniano.

En una variedad de animales y plantas, la recombinación en meiosis se reduce a la eucromatina que se encuentra cerca o alrededor de la heterocromatina. Un aumento de heterocromatina en un cromosoma, puede incrementar los valores de recombinación de las regiones eucromáticas de otros cromosomas (Miklos, 1979). Este autor también observó que si bien el centrómero puede reducir la recombinación, cualquier modificación de la distancia de la eucromatina al mismo, como la producida por una inversión, puede aumentarla.

De esta manera, las variantes heterocromáticas pueden facilitar las mutaciones cromosómicas, como así también promover la formación de quiasmas mitóticos que pueden llevar a la homocigidad de genes mutantes.

En el campo de las neoplasias, se ha sugerido que las mutaciones recesivas en locus críticos, son importantes en la iniciación de un cáncer. En los individuos heterocigotas para tal mutación, el crossing-over desigual entre homólogos puede originar células hijas homocigotas para el gen mutante (Festa, 1979). Estos crossing-over se producen en células somáticas de Síndrome de Bloom y se los relaciona con la incidencia de leucemias y linfomas que presenta esta patología (German, 1972, 1977). Una distribución asimétrica de la heterocromatina en dos cromosomas homólogos, puede llevar a una mala reparación durante el intercambio de la región heterocromática y aumentar el nivel de asincronía en la replicación cromosómica, que puede producir a su vez una mala reparación de los sitios de cross-over en otras zonas del cromosoma.

Aparentemente estos cambios podrían producir un efecto en determinados genes del mismo o de otros cromosomas. Estudios realizados en Drosophila melanogaster permiten sugerir que, cuando se produce una ruptura e inversión de un segmento cromosómico cercano a la heterocromatina, ésta puede ejercer un efecto en la producción de material heterocromático en el mismo cromosoma, no siendo aún claro el mecanismo responsable de tal efecto (Baimai, 1976). También un cambio de posición o de cantidad de este material, trae aparejada una modificación en la expresión de aquellos genes que se encuentran bajo su influencia.

Uno de los aspectos más intrigantes de la heterocromatina es su habilidad para causar la supresión de la actividad genética de la eucromatina que se sitúa en su proximidad por una traslocación. Este concepto, que implica que la actividad de un gen puede depender de su relación con la heterocromatina, es conocido como efecto de posición.

Otro agregado a las dificultades conceptuales del efecto de posición es la observación ocasional de algunos genes cercanos a la heterocromatina que pueden no ser afectados, mientras que sí lo son algunos más distantes.

Esto podría interpretarse como indicador de que: 1) cualquiera de los factores elaborados por la heterocromatina no actúa exclusivamente como represor no específico ó 2) algunos genes o sus reguladores son controlados por una baja dosis del factor represor de la heterocromatina. Los diversos factores del efecto de posición variegado sugieren que la heterocromatina puede elaborar

alguna sustancia que se extiende localmente a lo largo del cromosoma. Esta podría ser una proteína no histónica que tiene capacidad de supresión génica y puede mostrar algún grado limitado de especificidad (Baimai, 1976).

También existiría un efecto de posición estable o S (Cummings, 1972) que no depende de la presencia de un rearrreglo cromosómico. Una posible explicación de este fenómeno es la existencia de dos genes que controlan cada uno de los pasos de una serie secuencial de reacciones, tal que ellos actuarían más efectivamente cuando involucran diferentes cromosomas.

Los genes de cáncer muestran considerable especificidad tisular en su expresión, aún cuando resulte más de un tumor. Parece probable que los alelos normales de estos genes de cáncer humano son importantes para la diferenciación tisular (Knudson, 1978). Aún cuando estos genes de cáncer heredados de forma dominante causan neoplasias específicas con alta probabilidad, un tumor constituye un suceso raro a nivel de las células.

Se puede postular que los genes que están en los sitios de mutación neoplásica germinal o somática, pueden interferir con la diferenciación de células en individuos heterocigotas y causar cáncer en células homocigotas. La caracterización y aislamiento de tales genes aclararía el defecto fundamental de un cáncer.

Diferentes estudios efectuados en neoplasias sugieren que la génesis del cáncer estaría relacionada con cambios discretos, que ocurren al azar y con un rango constante debidos a eventos mu

tacionales. Kopelovich (1982) sugiere que la transformación in vitro sería debida, en la mayoría de las neoplasias, a una mutación autosómica dominante, que se correspondería con un estado de iniciación de la carcinogénesis.

Desde el punto de vista epidemiológico, los individuos que están genéticamente predispuestos a desarrollar neoplasias pueden ser divididos en tres categorías. La primera, en la que la predisposición genética aumenta el riesgo alrededor de mil veces, es la que incluye al retinoblastoma. La segunda, con cánceres para los cuales la incidencia en individuos predispuestos es del orden de 10 a 100 veces más alta que en el resto de la población. La tercera categoría es aquella para los cuales el riesgo genético es menor de diez veces.

La mayoría de los cánceres comunes están dentro de la segunda categoría donde la susceptibilidad genética estaría relacionada con las modificaciones de la heterocromatina constitutiva.

Se ha sugerido que la susceptibilidad puede tener un rol importante en el desarrollo del cáncer (Peto, 1980) permitiendo esto, la comprensión de alguno de los mecanismos de la carcinogénesis.

De este modo, resultaría importante el papel de la heterocromatina constitutiva en dicho proceso dado que los cambios ocurridos en ella, determinarían su actuación en el progreso de una neoplasia mediante desrepresión de genes por efecto de posición. Su comportamiento sería el de un gen autosómico dominante y su expresión, la predisposición a desarrollar cáncer.

5. CONCLUSIONES

Se exponen a continuación las conclusiones extraídas del presente trabajo de tesis, destacando el posible significado biológico de los hallazgos detectados.

- La constitucionalidad de la heterocromatina constitutiva se puso en evidencia mediante su análisis en distintos tejidos.

- La población leucémica presenta mayor frecuencia de heteromorfismo que la población normal.


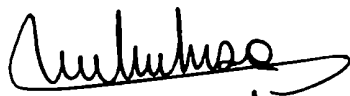
- Las leucemias se caracterizan por una mayor prevalencia de variantes en el cromosoma 1.

- El exceso de heteromorfismo en el cromosoma 1 es debido a la alta incidencia de la variante 1qh-.

- Existe una alta asociación entre heteromorfismo en el cromosoma 1 y neoplasia.

- La población leucémica presenta una variante característica: 1qh-.

- Se propone un comportamiento de gen autosómico dominante capaz de expresarse como predisposición a desarrollar neoplasia.



6. BIBLIOGRAFIA

- ABE, T.; MORITA, M.; KAWAI, K. Cd banding of human chromosomes observed in the C-banding procedure. *Lancet* II (7942):981,1975.
- ALWINE, J.C.; KEMP, D.J.; STARK, G.R. Method for detection RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5350-5354, 1977.
- ANGELL, R.R.; JACOBS, P.A. Lateral asymmetry in human constitutive heterochromatin. *Chromosoma* 51: 301-310, 1978.
- ARRIGHI, F.E.; HSU, T.C. Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics* 10: 81-86, 1971.
- ARRIGHI, F.E.; HSU, T.C.; PATHAK, S.; SAWADA, H. The sex chromosomes of the Chinese hamster: Constitutive heterochromatin deficient in repetitive DNA sequences. *Cytog. Cell. Genet.* 13: 268-274, 1974.
- ARRIGHI, F.E.; HSU, T.C.; SAUNDERS, P.; SAUNDERS, G.F. Localization of repetitive DNA in the chromosomes of Microtus agrestis by means of in situ hybridization. *Chromosoma* 32: 224-236,1970.
- ARRIGHI, F.E.; HSU, T.C.; SAUNDERS, P.; SAUNDERS, G.F. Distribution of repetitive DNA in human chromosomes. *Experientia* 27(8): 964-966, 1971.
- ATKIN, N.B.; BRITO-BABAPULLE, V. Heterochromatin polymorphism and human cancer. *Cancer Genet. and Cytog.* Vol.3(3):261-272, 1981.
- ATKIN, N.B.; BAKER, M.C. Pericentric inversion of chromosome 1: frequency and possible association with cancer. *Cytog. Cell. Genet.* 19: 180-184, 1977.
- ATKIN, N.B.; PICKTHALL, V.J. Chromosomes 1 in 14 ovarian cancers: Heterochromatin variants and structural changes. *Hum. Genet.* 38: 25-33, 1977.
- BAIMAI, V. Chromosomal polymorphisms of constitutive heterochromatin and inversions in Drosophila. *Genetics* 85: 85-93, 1977.
- BELTRAN, I.C.; ROBERTSON, F.W.; PAGE, B.M. Human Y chromosome variation in normal and abnormal babies and their fathers. *Ann.Hum. Gen.* 42: 315-325, 1979.
- BENTON, W.D.; DAVIS, R.W. Screening λ gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. *Science* 196: 180-182, 1977.

- BERGER, R.; BERNHEIM, A.; LE CONIAT, M.; VECCHIONE, D. C-banding studies in various blood disorders. *Cancer Genet. and Cytog.* Vol 1 (2): 95-102, 1979.
- BIANCHI, N.O. Duplicación cromosómica y heterocromatina a nivel molecular y citológico. *Monografía N°19, OEA*, 1978.
- BIANCHI, N.O.; AYRES, J. Heterochromatin location on chromosomes of normal and transformed cells from African Green Monkey (Cercopithecus aethiops). *Exp. Cell. Res.* 68: 253-258, 1971.
- BIANCHI, N.O.; BIANCHI, M.S.; VIDAL-RIOJA, L. Heterochromatin and late replication in the chromosomes of the rat. *Genetica* 44: 513-519, 1973.
- BIANCHI, N.O.; SWEET, B.H.; AYRES, J. Heterochromatin in cells derived from Aedes albopictus (Skuse) mosquito tissue culture. *Exp. Cell Res.* 69: 236-239, 1971.
- BISHOP, A.; BLANCK, C.E. Heritable variation in the length of Y chromosome. *Lancet* II: 18-20, 1962.
- BLISS, C.I. *Statistics in biology.* McGraw-Hill. New York, Vol. I, 1967.
- BOBROW, M.; PEARSON, P.L.; PIKE, M.C.; EL-ALFI, O.S. Length variation in the quinacrine-binding segment of human Y chromosome of different sizes. *Cytogenetics* 10: 190-198, 1971.
- BRITTEN, R.J.; DAVIDSON, E.H. Repetitive and non-repetitive DNA sequences and a speculation on the origins of evolutionary novelty. *Quant. Rev. Biol.* 42(2): 111-133, 1971.
- BRITTEN, R.J.; KOHNE, D.E. Repeated sequences in DNA. *Science* Vol. 161, 3841: 529, 1968.
- BROWN, S.W. Heterochromatin. *Science* 151: 417-425, 1966.
- BROWN, A.K.; WILMORE, P.J. Location of repetitious DNA in the chromosomes of the desert locust (Schistocerca gregaria). *Chromosoma* 47: 379-383, 1974.
- BUCKTON, K.; EVANS, H. Method for the analysis of human chromosome aberrations. *Who Publications.* Ginebra. 1973.
- BUCKTON, K.E.; O'RIORDAN, M.L.; JACOBS, P.A.; ROBINSON, J.A.; HILL, R.; EVANS, H.J. C and Q band polymorphisms in the chromosomes of three human populations. *Ann.Hum.Genet.* 40: 99-111, 1976.

- CARNEVALE, A.; BLANCO IBAÑEZ, B.; DEL CASTILLO, V. The segregation of C-band polymorphisms on chromosomes 1, 9 and 16. *Am. J. Hum. Genet.* 28: 412-416, 1976.
- CERVENKA, J.; THRON, H.L.; GORLIN, R.J. Structural basis of banding pattern of human chromosomes. *Cytogenet. Cell. Genet.* 12: 81-86, 1973.
- COHEN, M.M.; SHANE, M.W.; MAC CLUER, J.W. Racial differences in the length of the human Y chromosome. *Cytogenetics*, 5: 34-52, 1966.
- COMMINGS, D.E. The structure and function of chromatin in "Advances in human genetics". Ed. Harris H.; Hirschhorn K. Plenum Press pp. 237-431.
- COMMINGS, D.E. Mechanisms of chromosomes banding and implications for chromosome structure. *Ann. Rev. Genet.* 12: 25-46, 1978.
- COMMINGS, D.E.; AVELINO, E. Mechanisms of chromosomes banding. VII. Interaction of methylene blue with DNA and chromatin. *Chromosoma* 51: 365-381, 1975.
- COMMINGS, D.E.; AVELINO, E.; OKADA, T.A.; WYANDT, H.E. The mechanism of C- and G-banding of chromosomes. *Exp. Cell. Res.* 77: 469-493, 1973.
- CORNEO, G.; GINELLI, E.; POLLI, E. A satellite DNA isolated from human tissues. *J. Mol. Biol.* 23: 619-622, 1967.
- CORNEO, G.; GINELLI, E.; POLLI, E. Isolation of the complementary strands of a human satellite DNA. *J. Mol. Biol.* 33: 331-335, 1968.
- CORNEO, G.; GINELLI, E.; POLLI, E. Repeated sequences in human DNA. *J. Mol. Biol.* 48: 319-327, 1970.
- CORNEO, G.; GINELLI, E.; POLLI, E. Renaturation properties and localization in heterochromatin of human satellite DNA's. *Biochim. Biophys. Acta* 247: 528-534, 1971.
- CORNEO, G.; ZARDI, L.; POLLI, E. Elution of human satellite DNA's on a methylated albumin kieselguhr chromatographic column; isolation of satellite DNA IV. *Biochim. Biophys. Acta* 269: 201-204, 1972.
- CRAIG-HOLMES, A.P. C-band polymorphism in human populations. *Population Cytogenetics studies in humans*. Ed. Hook, E.B. and Porter L.H. Academic Press, Inc. New York, 1977.
- CRAIG-HOLMES, A.P.; MOORE, F.B.; SHAW, M.W. Polymorphism of human C-band heterochromatin. I. Frequency of variants. *Amer. J. Hum. Genet.* 25: 181-192, 1973.

- CRAIG-HOLMES, A.P.; MOORE, F.B.; SHAW, M.W. Polymorphism of human C-band heterochromatin. II. Family studies with suggestive evidence for somatic crossing over. *Am. J. Hum. Gen.* 27: 178-189, 1975.
- CROSSEN, P.E. Variation in the centromeric banding of chromosome 19. *Clin. Genetics* 8: 218-222, 1975.
- CHUANG, C.R.; SAUNDERS, G.F. Complexity of human satellite A DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 57: 1221-1230, 1974.
- DARLINGTON, C.D.; LA COUR, L.F. Nucleic acid starvation of chromosomes in Trillium. *J. Genet.* 40: 185-213, 1940.
- DE LA CHAPELLE, A.; FELLMAN, J.; UNNERUS, V. Determination of human paternity from the length of the Y chromosome. *Ann. Génét.* 10: 60-64, 1967.
- DRISCOLL, D.J.; PALMER, C.G.; MELMAN, A. Non homologous associations of C-heterochromatin at human male meiotic prophase. *Cytogenet. Cell. Genet.* 23: 23-32, 1979.
- EIBERG, H. New selective Giemsa technique for human chromosomes. *Cd. Staining. Nature* 248: 55, 1974.
- ERDTMANN, B. Analise quantitativa das bandas-C dos cromosomas A.1, C.9, E.16 e Y em indigenas e brancos brasileiros. Tese de doutoramento. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1979.
- ERDTMANN, B.; SALZANO, F.M.; MATTEVI, M.S.; FLORES, R.Z. Quantitative analysis of C bands in chromosomes 1, 9 and 16 of Brazilian Indians and caucasoids. *Hum. Genet.* 57(1): 58-63, 1981.
- EVANS, H.J. Molecular architecture of human chromosomes. *Br. Med. Bull.* 29(3): 196-203, 1977.
- FERGUSON-SMITH, M.A. Autosomal polymorphism. *Birth Defects: Original article series* 10: 19-29, 1974.
- FESTA, R.S.; MEADOWS, A.T.; BOSHER, R.A. Leukemia in a black child with Bloom's syndrome. Somatic recombination as a possible mechanism for neoplasia. *Cancer* 44: 1507-1510, 1979.
- FISHER, R.A. *Statistical methods for research workers.* Oliver and Loyd Ltd. Edinburgh, 1959.
- FITZGERALD, P.H. The nature and inheritance of an elongated secondary constriction on chromosome 9 of man. *Cytog. Cell. Genet.* 12:404-413, 1973.

- FLAMM, W.G.; WALKER, P.M.B.; Mc CALLUM, M. Some properties of the single strands isolated from the DNA of the nuclear satellite of the mouse (Mus musculus). J. Mol. Biol. 40: 423-443, 1969.
- FONATSCH, C. New chromosome polymorphism inv(16) (p11q12 or 13). Cytog. Cell. Genet. 18: 106-107, 1977.
- GAGNE, R.; LABERGE, C. Specific cytological recognition of the heterochromatin segment of number 9 chromosome in man. Exptl. Cell. Res. 73(1): 239-242, 1972.
- GALTON, M.; HOLT, S.F. DNA replication patterns of the sex chromosomes in somatic cells of the Syrian hamster. Cytogenetics 3: 97-111, 1964.
- GARDNER, R.J.M.; Mc GREANOR, H.R.; PARSLow, M.I.; VEALE, A.M. O. Are 1q+ chromosomes harmless?. Clinical Genet. 6: 383-393, 1974.
- GERARDTS, J.; PEARSON, P. Specific staining of the human N°1 chromosome in spermatozoa. Humangenetik 20: 171-173, 1973.
- GERMAN, J. Genes which increase chromosomal instability in somatic cells and predispose to cancer. In: Stinberg and Bearn Progress in Medical Genetics, Vol. 8. Eds. Grune and Stratton, New York, 61-101, 1972.
- GERMAN, J.; BLOOM, D.; PASSARGE, E. Bloom's syndrome. V. Surveillance for cancer in affected families. Clin. Gen. 12: 162-168, 1977.
- GHOSH, P.K.; SINGH, I.P. Morphological variability of the human chromosomes in two Indian populations: Rajputs and Punjabis. Humangenetik 29: 67-78, 1975.
- GHOSH, P.K.; SINGH, I.P. Morphologic variability of human chromosomes: Polymorphism of constitutive heterochromatin. Hum. Genet. 32: 149-154, 1976.
- GOSDEN, J.R.; BUCKLAND, R.A.; CLAYTON, R.P.; EVANS, H.J. Chromosomal localization of DNA sequences in condensed and dispersed human chromatin. Exp. Cell. Res. 92: 138-147, 1975.
- GOSDEN, J.R.; MITCHELL, A.R.; BUCKLAND, R.A.; CLAYTON, R.P.; EVANS, H.J. The location of four human satellite DNAs on human chromosomes. Exp. Cell. Res. 92: 148-158, 1975.
- GRUNSTEIN, M.; HOGNESS, D.S. Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 3961-3965, 1975.

- HEITZ, E. Des heterochromatin der moose. Jahrb. Wiss. Bot. 69: 762-818, 1928.
- HEITZ, E. Heterochromatin, chromozentren, Chromomeren. Ber. Dtsch. Botan. Gesellsch. 47: 274-284, 1929.
- HEITZ, E. Die somatische heteropyknose bei Drosophila melanogaster und ihre genetische bedeutung. Z. Zellforsch. 20: 237-287, 1933.
- HEMMING, L.; BURNS, C. Heterochromatic polymorphism in spontaneous abortions. J. Med. Genet. 16: 358-362, 1979.
- HOEHN, H.; MARTIN, G.M. Heritable alteration of human constitutive heterochromatin induced by mitomycin. Exp. Cell. Res. 75: 275-278, 1972.
- HOEHN, H.; MARTIN, G.M. Clonal variants of constitutive heterochromatin of human fibroblasts after recovery from mitomycin treatment. Chromosoma 43: 203-210, 1973.
- HOEHN, H.; AU, K.; KARP, L.E.; MARTIN, G.M. Somatic stability of variant C-band heterochromatin. Hum. Genet. 35: 163-168, 1977.
- HSU, T.C. Heterochromatin pattern in metaphase chromosomes of Drosophila melanogaster. J. Hered. 62: 285-287, 1971.
- HSU, T.C. Longitudinal differentiation of chromosomes. Ann. Rev. of Genetics 7: 153-176, 1974.
- HSU, T.C. A possible function of constitutive heterochromatin: the body guard hypothesis. Genetics 79(Suppl.):137-150, 1975.
- HSU, T.C. ; ARRIGHI, F.E. Distribution of constitutive heterochromatin in mammalian chromosomes. Chromosoma 34: 243-253, 1971.
- IINUMA, K.; MATZUNAGA, E.; NAKAGOME, Y. Polymorphisms of C and Q bands in human chromosomes. Inst. Gen. Ann. Report 23: 112-114, 1973.
- JONES, K.W. Chromosomal and nuclear location of mouse satellite DNA in individual cells. Nature 225: 912-915, 1970.
- JONES, K.W. Satellite DNA. J. Med. Genet. 10: 273, 1973.
- JONES, K.W.; PROSSER, J.; CORNEO, G.; GINELLI, E. The chromosomal location of human satellite DNA III. Chromosoma 42: 161-171, 1973.

- KELLY, R.B.; COZZARELLI, N.R.; DEUTSCHER, M.P.; LEHMAN, I.R.; KORNBERG, A. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. XXXII. Replication of duplex deoxyribonucleic acid by polymerase at a single strand break. J. Biol. Chem. 245: 39-45, 1970.
- KIT, S. Equilibrium sedimentation in density gradients of DNA preparations from animal tissues. J. Mol. Biol. 3: 711-716, 1961.
- KNUDSON, A. Jr. Human Cancer Genes. In Genes, chromosomes and neoplasia. Eds. Arrighi, F.E.; Rao, P.N.; Stubbenfield, E., Raven Press, 1981.
- KNUDSON, A.G.; MEADOWS, A.T. Developmental genetics of neural tumors in man. Cell differentiation and neoplasia (The University of Texas System Cancer Center 30th. Annual Symposium on Fundamental Cancer Research, 1977). Raven Press, New York, pp. 83-92, 1978.
- KOPELOVICH, L. Hereditary adenomatosis of the colon and rectum: relevance to cancer promotion and cancer control in humans. Can. Gen. Cytog. 5: 333-351, 1982.
- KUNZE, J.; MAN, G. A1 and C9 marker chromosomes in children with combined minor and major malformations. Lancet 1: 273, 1975.
- KURNIT, D.M. Satellite DNA and heterochromatin variants: the case for unequal mitotic cross-over. Hum. Genet. 47/2: 169-186, 1979.
- LABAL de VINUESA, M.L.; LARRIPA, I.; BRIEUX de SALUM, S. Variantes heterocromáticas y su asociación con neoplasia. XXVII Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata, Argentina, 1982.
- LABAL de VINUESA, M.L.; SLAVUTSKY, I.; LARRIPA, I.; BRIEUX de SALUM, S. Estudio de la heterocromatina constitutiva en neoplasias. V Congreso Latinoamericano de Genética. Viña del Mar, Chile, 1981.
- LABAL de VINUESA, M.L.; SLAVUTSKY, I.; LARRIPA, I.; BRIEUX de SALUM, S. Análisis de bandas C en desórdenes hematológicos. Sangre 26: 319-323, 1981.
- LE CONIAT, M.; VECCHIONE, D.; BERNHEIM, A.; BERGER, R. C-banding studies in acute non lymphocytic leukemia. Can. Gen. Cytog. 5: 327-331, 1982.

- LEE, J.C.; YUNIS, J.J. A developmental study of constitutive heterochromatin in Microtus agrestis. *Chromosoma* 32: 237-250, 1971.
- LIMA de FARIA, A.; BIRNSTIEL, M.; JAWORSKA, H. Amplification of ribosomal cistrons in the heterochromatin of Acheta. *Genetics* 61(Suppl.): 145-159, 1959.
- LUBS, H.A.; KIMBERLING, W.Y.; HECHT, F.; PATIL, S.A.; BROWN, J.; GERALD, P.; SUMMITT, P. Racial difference in the frequency of Q and C chromosomal heteromorphism. *Nature* 268: 631-633, 1977.
- LUBS, H.A.; Mc KENZIE, W.H.; MERICK, S. Comparative methodology and mechanisms of banding. In *Chromosome Identifications - Techniques and Applications in Biology and Medicine*. Ed. Casperson, T.; Zeck, L. New York: Academic, 1973.
- LUBS, H.A.; PATIL, S.A.; KIMBERLING, W.J.; BROWN, J.; COHEN, M.; GERALD, P.; HECHT, F.; MYRIANTHOPOULOS, N.; SUMMITT, R.C. Q and C banding polymorphisms in seven and eight year old children: Racial differences and clinical significance. In *Population Cytogenetics studies in humans*. Ed. Hook, E.B. and Porter, L.H. Academic Press, New York, 1977.
- LUBS, H.A.; RUDDLE, F.H. Application of quantitative karyotype to chromosome variation in 4400 consecutive newborns. In *Human Population Cytogenetics*. Eds. Jacobs, P.A.; Prince, W.H.; Law, P. Edinburgh, University-Press, pp. 120-142, 1970.
- LUBS, H.A.; RUDDLE, F.H. Chromosome polymorphism in american negro and white populations. *Nature* 233: 134-136, 1970.
- LYON, M.F. Gene action in the X-chromosome of the mouse (Mus musculus). *Nature* 190: 372-373, 1961.
- MAC GREGOR, H.C.; HORNER, H.; OWEN, C.A.; PARKER, I. Observation on centromeric heterochromatin and satellite DNA in salamanders of the genus Plethodon. *Chromosoma* 43: 329-348, 1973.
- MADAN, K. An extra band in human 9qh+ chromosome. *Hum. Genet.* 43: 259-264, 1978.
- MADAN, K.; BRUINSMA, A.H. C-band polymorphism in human chromosome N°6. *Clinical Genetics* 15: 193-197, 1979.
- MAGENIS, R.E.; DONLON, T.A. Giemsa-11 heteromorphism of chromosome 1. *Amer. J. Hum. Genet.* 29(6): 74A, 1977.
- Mc KAY, R.D.G. The mechanism of G and C banding in mammalian metaphase chromosomes. *Chromosome* 44: 1-14, 1973.

- MCKENZIE, W.H.; HOSTETTER, T.L.; LUBS, H.A. Y family study: Heritable variation in the length of the human Y chromosome. *Am. J. Hum. Gen.* 24: 686-693, 1972.
- MCKENZIE, W.H.; LUBS, H.A. An analysis of the technical variables in the production of C bands. *Chromosoma* 41: 175-182, 1973.
- MCKENZIE, W.H.; LUBS, H.A. Human Q and C chromosomal variations; distribution and incidence. *Cytogen. Cell. Gen.* 14: 97-115, 1975.
- MIKELSAAR, A.V.; ILUS, T.; KINI, S. Variant chromosome 3(inv3) in normal newborns and their parents and in children with mental retardation. *Hum. Genet.* 41: 109-113, 1978.
- MIKLOS, G.L.G.; JOHN, B. Heterochromatin and satellite DNA in man: properties and prospects. *Am. J. Hum. Genet.* 31: 264-280, 1979.
- MILLER, O.J.; SCHNEDL, W.; ALLEN, J.; ERLANGER, B.F. 5-methyl cytosine localized in mammalian constitutive heterochromatin. *Nature* 251: 636-637, 1974.
- MOORE, R.; RADLEY, J.M. The nature of aneuploid change in JV56 cells and its relationship to continued cell proliferation. *Exp. Cell. Res.* 49: 638-643, 1968.
- MOORHEAD, P.S. A closer look at chromosomal inversions. *Am. J. Hum. Genet.* 28: 294-296, 1976.
- MORISHIMA, A.; GRUMBACH, M.M.; TAYLOR, J.H. Asynchronous duplication of human chromosomes and the origin of sex chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48: 756-763, 1962.
- MULLER, H.J.; KLINGER, H.P.; GLOSSER, M. Chromosome polymorphism in a human newborn population. *Cytogenet. Cell. Genet.* 15: 239-255, 1975.
- NIELSEN, J.; FRIEDRICH, U.; HREIDARSSON, A.B.; ZEUTHEN, E. Frequency of 9qh+. *Humangenetik* 2: 211-216, 1974.
- PALMER, C.G.; SCHRODER, J. A familial variant of chromosome 9. *J. Med. Genet.* 8: 202-208, 1971.
- PARDUE, M.L.; GALL, J.G. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science* 168: 1356-1358, 1970.
- PARIS CONFERENCE (1971). Standardization in human chromosomes Birth defects: Original Article Series VIII, 7, The National Foundation, New York, 1972.

- PARK, J.; ANTLEY, R.M. C-band autosomal polymorphism in orientals. *Amer. J. Hum. Gen.* 26(6): 65A, 1974.
- PATHAK, S.; ARRIGHI, F.E. Loss of DNA following C-banding procedures. *Cytogenet. Cell. Genet.* 12: 414-422, 1973.
- PEACOCK, W.J.; APPELS, R.; DUNSMIUR, P.; LOHE, A.R.; GERLACH, W.L. Highly repeated DNA sequences: chromosomal localization and evolutionary conservatism. In: *International Cell Biology*. Eds. Porter, K.R.; Brinkley, B.R. Rockefeller University Press, New York, 1977.
- PETO, J. Genetic predisposition to cancer. In: *Cancer Incidence in defined populations. Bombay Report 4*. Eds. Cairns, J.; Lyon, J., Skolnick, M., 1980.
- PHILIPS, R.B. Inheritance of Q and C band polymorphisms. *Can. J. Genet. Cytol.* 19: 405-413, 1977.
- POPESCU, N.C.; DI PAOLO, J.A. Heterochromatin, satellite DNA and transformed neoplastic cells. *J. Natl. Can. Inst.* 49, 2: 603-606, 1972.
- PRIETO, F.; BADIA, L.; MAYANS, J.; AMIGO, V.; SOLER, M.A.; MARTY, M.L. Heteromorfismo cromosómico en enfermos con leucosis linfoides crónica. *Sangre* 22 (5-B): 807-813, 1977.
- REISER, J.; RENART, J.; STARK, G.R. Transfer of small DNA fragments from polyacrylamide gels to diazobenzylaxymethyl-paper and detection by hybridization with DNA probes. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 85: 1104-1112, 1978.
- RIGBY, P.W.J.; DIECKMANN, M.; RHODES, C.; BERG, P. Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polimerase I. *J. Mol. Biol.* 113: 237-251, 1977.
- ROBINSON, J.A.; BUCKTON, K.E.; SPOWART, G.; NEWTON, M.; JACOBS, P.A.; EVANS, H.J.; HILL, R. The segregation of human chromosome polymorphism. *Ann. Hum. Genet.* 40: 113-121, 1976.
- ROBSON, M.K.; ANDERSON, J.M.; GARSON, O.M.; MATTHEWS, J.P.; SANDEMAN, T.F. Constitutive heterochromatin (C-banding) studies in patients with testicular malignancies. *Can. Gen. Cytog.* 4: 319-323, 1981.
- SADAMORI, N.; NONAKA, H.; ICHIMARU, M.; IGARASHI, H.; HIROTA, M.; SAWADA, H. Familial acute myelogenous leukemia associated with RNA virus and polymorphism of 1qh+. *Cancer Genet. Cytog. Vol.* 4 (1): 23-30, 1981.

- SAUNDERS, G.F.; CHUANG, C.R.; SAWADA, H. Genome complexity and in vivo transcription in human leukemic leucocytes. Acta Haematol. 54: 227-233, 1975.
- SAUNDERS, G.F.; HSU, T.C.; GETZ, M.J.; SIMES, E.L.; ARRIGHI, F. E. Locations of a human satellite DNA in human chromosomes. Nature (London), New Biol. 236: 244-246, 1972.
- SCHERES, J.M.J.C. CT banding of human chromosomes. Hum. Genet. 31: 293-307, 1976.
- SCHMID, M.; VOGEL, W.; KRONE, W. Attraction between centric heterochromatin of human chromosomes. Cytogenet. Cell. Genet. 15: 66-80, 1975.
- SCHWEIZER, D.; AMBROS, P.; ANDRLE, M. Modification of DAPI banding of human chromosomes by prestaining with a DNA-binding oligopeptide antibiotic, Distamycin A. Exp. Cell. Res. 111: 327-332, 1978.
- SEKHON, G.S.; SLY, W.S. Inheritance of Q and C polymorphism. Am. J. Hum. Gen. 27(6): 79A, 1975.
- SEJANEZ, H.N. The phylogeny of human chromosomes. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, 1979.
- SMITH, G.P. Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. Science Vol. 191: 528-535, 1976.
- SOFUNI, T.; NARUTO, J.; AWA, A.A. Chromosome polymorphism in a human population ascertained by C-staining method. Jap. J. Hum. Genet. Vol. 22: 178-179, 1977.
- SOUTHERN, E.M. Base sequence and evolution of Guinea pig-satellite DNA. Nature (London) 227: 794-798, 1970.
- STURTEVANT, A.H. Effects of unequal crossing over at the Bar locus in Drosophila. Genetics 10: 117, 1925.
- SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Exp. Cell. Res. 75: 304, 1972.
- SUMNER, A.T.; EVANS, H.J.; BUCKLAND, R.A. Mechanisms involved in the banding of chromosomes with quinacrine and Giemsa. Exp. Cell. Res. 81: 214-222, 1973.
- TAYLOR, J.H. Asynchronous duplication of chromosomes in cultured cells of Chinese hamster. J. Biophys. Biochem. Cytol. 7: 455-464, 1960.

- THOMAS, C.A. Jr. The rolling helix: A model for the eukaryotic gene?. Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 38: 342-352, 1973.
- TSENGKI, C.; METAXOTOV-STAVRIDAKI, C.; STRATAKI-BENETON, M.; KAIPINI-MAUROV, A.; MATSANIOTIS, N. Chromosome studies in couples with repeated spontaneous abortions. Obs. and Gynec. 47: 463-468, 1976.
- TÜÜR, S.; KÄOSAAR, M.; MIKELSAAR, A.V. 1qh+ variants in a normal adult population (one with a pericentric inversion). Humangenetik 24: 217-220, 1974.
- VAN DYKE, D.L.; PALMER, C.G.; NANCE, W.E.; YU, P.L. Chromosome polymorphism and twin zigosity. Am. J. Hum. Genet. 29: 431-447, 1977.
- VERMA, R.S.; DOSIK, H.; LJBS, H.A. Size and pericentric inversion heteromorphisms of secondary constriction regions (h) of chromosomes 1, 9 and 16 as detected by CBG technique in caucasians: classification, frequencies and incidence. Am. J. Hered. Genet. 2: 331-339, 1978.
- VERMA, R.S.; LJBS, H.A. Variation in human acrocentric chromosomes with acridine orange reverse banding. Humangenetik 30: 225-235, 1975.
- VERMA, R.S.; RODRIGUEZ, J.; DOSIK, H. Human chromosome heteromorphisms in american blacks. II. Higher incidence of pericentric inversions of secondary constriction regions (h). Am. J. Med. Genet. 8(1): 17-25, 1981.
- WALKER, P.M.B.; Mc CLAREN, A. Fractionation of mouse deoxyribonucleic acid on hydroxyapatite. Nature (London) 208: 1175-1179, 1965.
- WOOLF, B. The log likelihood ratio test (the G test). Ann. Human Genet. 21: 397-409, 1957.
- YATES, F. Contingency tables involving small numbers and the X^2 test. Suppl. I. Roy Statist. Soc. 1: 217-235, 1934.
- ZAKHAROV, A.F.; EGOLINA, N.A.; KAPKAKOVA, E.S. Late-replicating chromosomal segments in aneuploid Chinese hamster cell lines as determined by autoradiography. J. Natl. Cancer Inst. 36: 215, 1966.
- ZANKL, H.; ZANG, K.D. Structural variability of the normal human karyotype. Humangenetik 160-162, 1971.