

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE
BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS**



DETERMINACION DE LAS VARIANTES DE LOS
CROMOSOMAS ACROCENTRICOS Y FRECUENCIAS DE
APARICION EN UNA POBLACION HUMANA NORMAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

PRESENTA

GUILLERMO BOJORQUEZ RANGEL

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS


DETERMINACION DE LAS VARIANTES DE LOS CROMOSOMAS
ACROCENTRICOS Y FRECUENCIAS DE APARICION
EN UNA POBLACION HUMANA NORMAL

TESIS PROFESIONAL QUE PRESENTA:
GUILLERMO BOJORQUEZ RANGEL


Aprobada por:



M. C. Carlos Márquez B.
Presidente del Jurado



Olivia M. Tapia V.
Secretario



Dr. Jorge de la Rosa V.
Vocal

RESUMEN

Los cromosomas acrocéntricos de 56 sujetos fueron analizados por medio de técnicas de Giemsa pH 7 y de bandas G, C y NORs para detectar los heteromorfismos cromosómicos de los brazos cortos que incluyen la región pericentromérica (p11), tallos (p12) y satélites (p13).

Los heteromorfismos encontrados fueron incluidos en cinco tipos básicos: 1) sin tallos ni satélites, 2) con tallos y satélites sencillos, 3) tallos largos y satélites, 4) tallos gruesos y satélites y 5) con doble tallo y doble satélite. Las frecuencias con que se presentaron estas variantes en la población analizada fueron 29.2%, 54.4%, 10.5%, 2.7% y 0.72%, respectivamente.

Con bandas G se determinó que la distribución de estos heteromorfismos presenta un patrón similar para los cromosomas 13, 15 y 22, y que los cromosomas 14 y 21 muestran un incremento del 20% en la presencia de la variante tipo 2, disminuyendo la frecuencia de la variante tipo 1, mientras que las variantes tipo 3, 4 y 5 se presentan con la misma frecuencia que para los cromosomas 13, 15 y 22.

Se analizó la distribución de la heterocromatina constitutiva sobre los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos encontrándose 4 patrones de variación: banda centromérica normal (p), cuando se presentó con una cantidad adicional del 50% aproximadamente (p+), cuando la cantidad de heterocromatina se vio disminuida con respecto a lo normal (-p) y cuando su distribución incluyó todo el brazo corto (p++). La incidencia de estas variantes es de 61.9%, 19.9%, 16.2% y 5% respectivamente.

Se aplicaron bandas NORs, para ayudar a caracterizar las variaciones de los tallos y estas mostraron un incremento en el tamaño de las NORs para las variantes tipo 3, 4 y 5.

Abstract

Acrocentric chromosomes of 56 subjects were analyzed using conventional staining techniques and G, C and NOR bands to detect the chromosomic heteromorphism of the short arm, including centromere, short arm (p11), stalk (p12) and satellites (p13). The heteromorphisms that were found were included in 5 basic types: 1) without stalks and satellites, 2) with single stalk and satellites, 3) long stalk and satellite, 4) thick stalks and satellite and double stalk and double satellite. The frequencies of the five variants mentioned were 29.2%, 57.4%, 10.5% , 2.7% and 0.72% respectively.

The distribution of this heteromorphism present a similar pattern for the chromosomes 13, 15 and 22. The chromosomes 14 and 21 show an increase of 20% in the presyence of the variant type 2. The ocurrence of the variant type 1 disminishes, whereas the heteromorphisms type 3, 4 and 5 are present with the same frequencies as there of the chromosomes 13, 15 and 22.

The distribution of the constitutive heterochromatin was analyzed for the short arms of the acrocentric chromosomes were four patterns of variations: C-band normal (p), C-band larger by 50% (p+), when the quantity of heterochromatin seems to disminish (-p) and (p++) when the C band includes the whole short arm. The incidence of there variants is 61.9%, 16.9%, 16.2% and 5% respectively.

To characterize the variations the technique of NORs band was apllied, finding that the NOR band increases in size in types 3, 4, and 5.

RECONOCIMIENTO:

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias, U A B C. Dicho laboratorio ha tenido por proyecto central: "DETECCION DE AGENTES MUTAGENICOS EN LAS COSTAS DE BAJA CALIFORNIA" y a través de tal proyecto se han obtenido fondos que han contribuído a que también se lleven a cabo otras investigaciones en Genética, entre las que se encuentra esta tesis.

Los apoyos recibidos han sido principalmente de la Dirección General de Investigación y Posgrado, U A B C, (a quien agradezco la beca-tesis recibida durante 18 meses) y de DGICSA, SEP. (Convenio No. C88-01-0413; No. de registro: 880556).

AGRADECIMIENTOS:

Quiero agradecer sinceramente a mi asesor M. en C. Carlos Márquez Becerra, por el apoyo dado durante todo el desarrollo del trabajo. Al M. en C. Faustino Camarena R., Director de la Facultad de Ciencias, a la M. en C. Irma Rivera G., Subdirector Académico de la Facultad de Ciencias y al Biólogo Elias Torres B., Subdirector administrativo, por el apoyo brindado.

Agradezco también, a la Bióloga Olivia Tapia V. por compartir su experiencia durante toda la carrera y especialmente en la última etapa. Al Dr. Jorge de la Rosa V. por el interés mostrado en la revisión del escrito final y por sus aportaciones que lo hicieron más claro.

Quiero agradecer especialmente a la P. B. Hilda Raquel Moctezuma Fierro por la revisión del trabajo y por sus valiosas sugerencias en la elaboración del escrito.

También agradezco a los P. B. Lorena Chávez. Leonor Juárez, Ramón Pérez, Pedro Arce, Héctor Ruíz, Joel Torres, y al Tec. Lab. Alejandro Mancera, por su compañerismo y el apoyo en el desarrollo de la tesis.

A Benito Jasmín y familia mi más profundo agradecimiento por su desinteresada ayuda para concluir mis estudios y el trabajo de tesis.

Para Moises Dávalos López mi amistad y agradecimiento por todas las vivencias que hemos compartido en todos estos años de formación profesional.

Finalmente, mi eterno reconocimiento a mis hermanos Rodolfo, Miguel, Eduardo, Ana Luisa, Marinita e Isabel así como también a Marina Isabel Ferraez por su apoyo y comprensión.

INDICE.

Introducción	1
Cromosomas Acrocéntricos	5
Técnicas de Bandas	11
Antecedentes	19
Objetivos	24
Metodología	25
Resultados	31
Discusiones	49
Conclusiones	65
Recomendaciones	67
Bibliografía	68

INTRODUCCION

Los cromosomas, como portadores de la información genética han despertado el interés de muchos investigadores aún antes de que se conociera profundamente su estructura y función; por lo que muchos de los fenómenos que determinan el comportamiento de los organismos vivos han sido esclarecidos en base a observaciones de sucesos en los que se han visto involucrados.

Con el desarrollo de las técnicas que permitieron visualizar cromosomas humanos en cantidades suficientes a principios de los años sesentas, se generó información basada en el análisis de miles de células mitóticas. Entre las primeras características cromosómicas que llamaron la atención destacan las variantes o heteromorfismos cromosómicos.

Posteriormente, a principios de los setentas con el desarrollo de las técnicas de bandeado cromosómico, los distintos tipos de variantes cromosómicas fueron mejor evidenciadas, así también se logran conocer nuevos tipos de heteromorfismos, tales como los de la heterocromatina constitutiva (bandas C).

Los heteromorfismos cromosómicos son las variaciones en forma, tamaño e intensidad de tinción que pueden presentar

los cromosomas integros o algunas de sus regiones, en los organismos de una población. Por medio de las técnicas de bandeamiento, los cromosomas reciben tratamientos a base de soluciones amortiguadoras, enzimas y colorantes diversos, que permiten la formación de bandas claras y oscuras a lo largo de todo el cromosoma; con ello se logra la observación de regiones específicas y las variaciones de éstas.

Los cromosomas acrocéntricos se caracterizan por el alto grado de heteromorfismo que muestran sus brazos cortos (p) y han sido objeto de especial interés ya que presentan los genes para el ARNr 18S y 28S, los cuales están relacionados con la formación de estructuras indispensables para el desarrollo celular normal, tales como el nucléolo y los ribosomas. Además, están constantemente involucrados en situaciones patológicas entre las cuales las translocaciones robertsonianas o fusiones céntricas D/D, D/5 y 5/5 se presentan con relativa frecuencia (Cassperson y cols., 1971; Choo y cols., 1988), así como las trisomías 13 y 21 (Síndrome de Patau y Síndrome de Down, respectivamente).

Los heteromorfismos cromosómicos han sido estudiados bajo diversos enfoques, intentando relacionarlos con algunas malformaciones físicas y/o mentales o como variaciones cromosómicas normales presentes en los individuos. Actualmente se acepta en forma general que las regiones más heteromórficas incluyen los brazos cortos de los cromosomas

acrocentricos (13, 14, 15, 21 y 22), el brazo largo del cromosoma Y, las regiones centroméricas de los cromosomas 3 y 4, y las regiones pericentroméricas de los cromosomas 1, 9 y 16, (Pearson y cols., 1973; ISNC, 1985). Se sabe que los heteromorfismos cromosómicos son constantes en cada individuo pero varían de uno a otro, se expresan de forma continua y se heredan en forma mendeliana, (Verma y Dosik, 1980) con algunas excepciones, (Craigh-Holmes y cols., 1975; Phillips, 1977; Olson y cols., 1986.). Además es bien conocido que la distribución de algunos heteromorfismos y sus frecuencias varían entre poblaciones con características raciales diferentes, lo que resulta interesante desde el punto de vista de la antropología biológica (Lubs y cols., 1977). Sin embargo su significado clínico y biológico sigue siendo dudoso (Pearson y cols., 1973; Lubs y cols., 1977, Verma y Dosik, 1980, 1988; Márquez, 1985).

Por otra parte, los heteromorfismos cromosómicos han sido ampliamente utilizados con muy diferentes fines: para determinar el origen parental de anomalías cromosómicas, en la determinación de paternidad en caso de duda, para diferenciar entre células fetales y maternas en cultivos de líquido amniótico, o bien entre células de receptores y donadores en transplantes de órganos. Así mismo, como marcadores para investigar los mecanismos cromosómicos que participan en la formación de mosaicos y en estudios de mellizos o nacimientos múltiples. También se han

empleado extensamente en estudios de mapeo cromosómico y en diversos análisis de tipo evolutivo (Verma y Dosik, 1980; Olson y cols., 1986).

Con el desarrollo de las técnicas de bandas a principios de los setentas, los heteromorfismos cromosómicos pudieron ser mejor evidenciados y las diferencias en los tipos y frecuencias de variantes entre grupos étnicos diversos se hicieron más claras, con lo que su uso como marcadores poblacionales y en estudios evolutivos ha cobrado gran importancia. Actualmente existen gran número de reportes sobre heteromorfismos cromosómicos en diversas poblaciones, principalmente en países del primer mundo. En México estos estudios se han limitado a poblaciones del centro del país y la información existente debe ser enriquecida con la obtenida en otras áreas diferentes.

En el presente estudio se muestran las variantes cromosómicas y sus frecuencias encontradas en una muestra de 56 estudiantes universitarios normales.

CROMOSOMAS ACROCENTRICOS

Los cromosomas acrocéntricos pertenecen a los grupos D (13-15) y G (21-22); se caracterizan por presentar el centrómero en posición subterminal y algunas regiones especiales que normalmente no se encuentran en otros cromosomas.

Estos cromosomas han recibido especial interés debido a que presentan un alto grado de heteromorfismo en sus brazos cortos, que incluyen una región basal próxima al centrómero, tallos y satélites. Son además portadores de los genes que codifican el ARNr 18S y 28S (Fig. 1). Se encuentran frecuentemente asociados a ciertos estados patológicos entre los que destacan, por su alta frecuencia, las trisomías, las cuales representan mutaciones cromosómicas de número producidas por la no disyunción o por la distribución desigual de las cromátidas hermanas durante los procesos de meiosis y mitosis, y que conducen, para estos casos, a la presencia de un cromosoma adicional (Fig. 2). Las translocaciones robertsonianas constituyen otro de los estados anormales y son producidas por el rompimiento parcial de las regiones pericentroméricas de los cromosomas acrocéntricos y la subsecuente fusión con otro cromosoma del mismo tipo para dar origen a un cromosoma metacéntrico o submetacéntrico (Fig. 3). Ello provoca tanto cambios en el

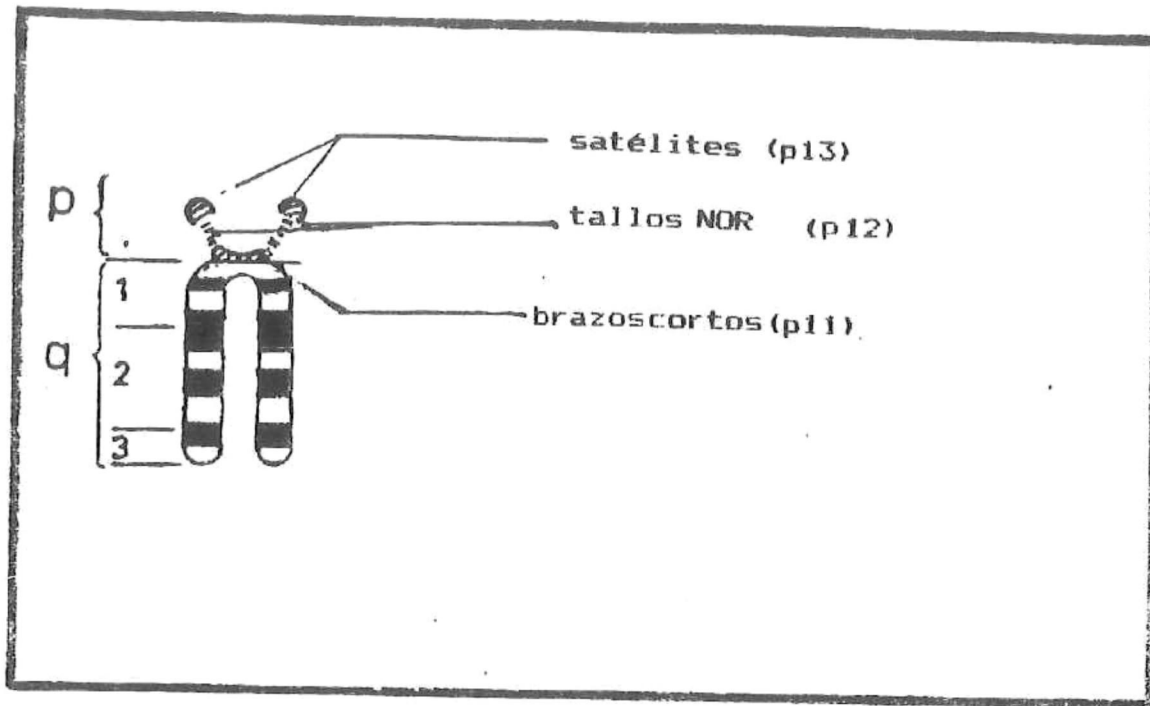


Figura 1.- Cromosoma acrocéntrico. En ellos se pueden distinguir sus partes: brazos largos (q) y brazos cortos (p).. Cada uno de ellos presentan diversas regiones: en los brazos cortos destacan la región pericentrómerica (p11), los tallos o NORs (p12) y los satélites (p13). Esquema basado en el Sistema Internacional de Nomenclatura en Citogenética Humana.

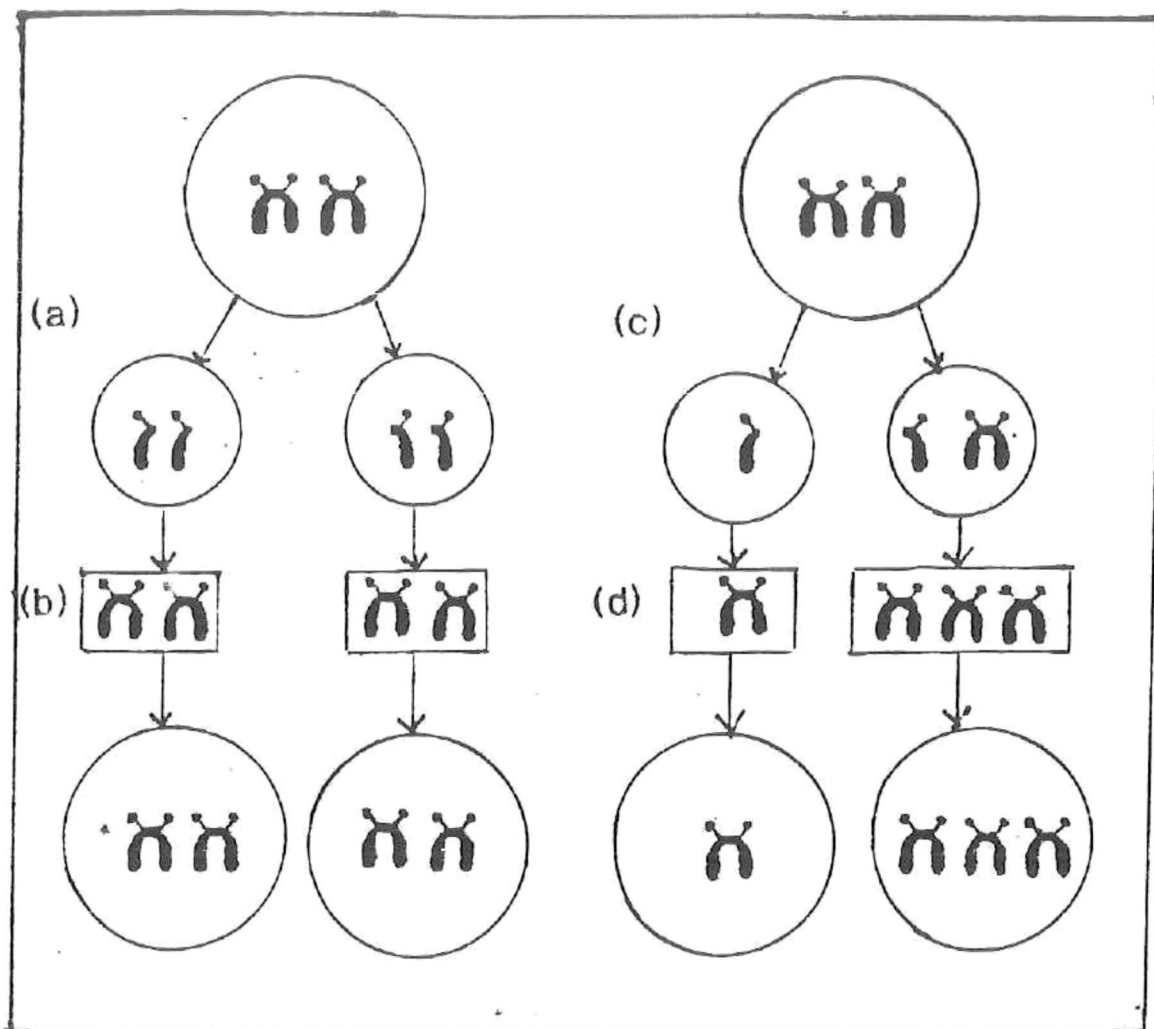


Figura 2.- Mecanismo de segregación de la trisomía. Cuando existe una segregación normal de cromátidas (a), éstas emigran hacia polos opuestos para posteriormente duplicarse durante la interfase y repetir el ciclo normal (b). Cuando no hay segregación normal de cromátidas hermanas, al dividirse la célula, una portará una cromátida extra, producto de la no-disyunción, mientras que la otra carecerá de un cromosoma (c) por lo que en la subsecuente división una célula portará un cromosoma adicional (trisomía) mientras que la otra aparecera con un cromosoma menos (d).

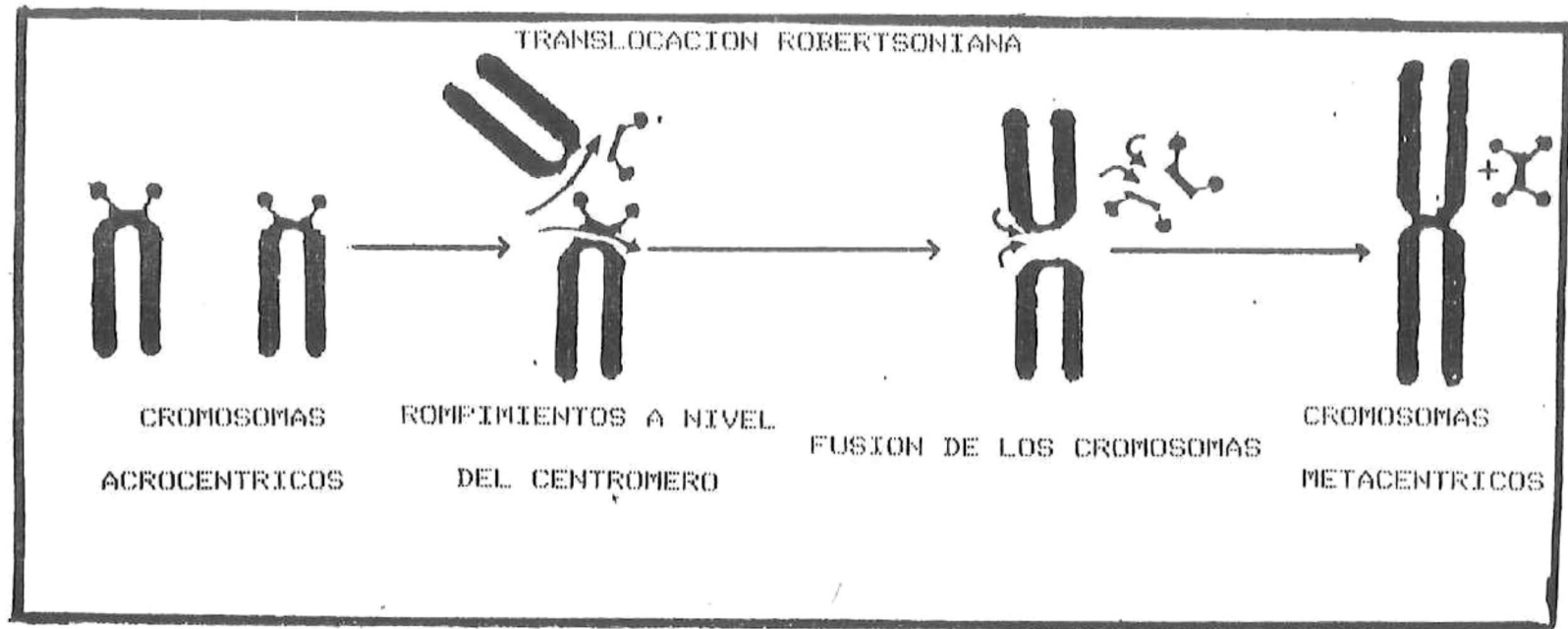


Figura 3.- Mecanismos de formación de traslocaciones robertsonianas. Se producen por rompimientos que ocurren a nivel de los centrómeros o brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos dando lugar posteriormente a fusiones de los cromosomas, a nivel del mismo rompimiento, para producir cromosomas, ya sea submetacéntricos o metacéntricos.

número de cromosomas como estados patológicos, cuyos cuadros clínicos se manifiestan de diversas formas, como por ejemplo las malformaciones físicas y el retraso mental. Estos fenómenos también se consideran importantes mecanismos de la evolución de los cariotipos y promotores de la especiación en algunos grupos (Jones y cols., 1973). Otros tipos de translocaciones, parciales y recíprocas han sido frecuentemente reportadas en la literatura, (Miller y cols., 1977; Statton y cols., 1986). Se les considera también como el origen de algunas estructuras tales como cromosomas hisatélizados, con y sin manifestaciones fenotípicas (Armendares y cols., 1969; Buhler y Malik., 1988; Babu y Wenna, 1988; Martín-Lucas y cols., 1986). Han sido también ampliamente estudiados por la frecuencia con que aparecen asociados por sus brazos cortos en la llamada asociación de monocéntricos o de satélite. (Cooke., 1971; Jacobs y cols., 1976; Warburton y cols., 1977; Miller y cols., 1977; Ardito y col., 1979; Galperin-Lemaître y cols., 1980; Dumort y cols., 1989; Wachtler y Musil, 1989).

Los cromosomas acrocéntricos difieren de los otros cromosomas no sólo por la posición distal del centrómero, sino por la presencia de diversas regiones en sus brazos cortos las cuales presentan un alto grado de heteromorfismo y estas se describen en los párrafos siguientes:

Los tallos son regiones que se tiñen negativamente

con técnicas convencionales y se encuentran localizadas entre la región pericentromérica del brazo (p) y los satélites. Durante la interfase, parte de esta fracción genética forma el nucléolo por acumulación de los productos de transcripción y de maduración del ARNr (Bourgeois y Hubert, 1988), debido a esto se ha denominado a tales sitios Regiones Organizadoras del Nucléolo (NOR). Estas regiones pueden ser analizadas por medio de técnicas Giemsa pH 7, pero se ha desarrollado la técnica de bandas NOR (Bloom y Goodpasture, 1976), la cual tiñe las regiones transcripcionalmente activas. Se caracterizan también por su alto grado de heteromorfismo y se consideran responsables del fenómeno de asociación y de algunos estados patológicos.

Sobre la región más distal de los brazos cortos (tallos), aparecen constantemente unas estructuras esféricas cuyo diámetro es ampliamente variable, que han sido llamadas satélites. Cuando se tiñen con colorantes convencionales es común que estas estructuras aparezcan sin conexiones físicas aparentes. Se considera que estas regiones pueden estar formadas por ADN rico en bases adenina y timina. Su significado biológico es bastante incierto (Babu y Verma, 1988).

TECNICAS DE BANDAS CROMOSOMICAS

Las técnicas de bandeo cromosómico fueron introducidas en el año de 1969 (Caspersson y col., 1969), quienes aplicaron un colorante fluorescente (mostaza de quinacrina) a preparaciones cromosómicas, y observaron diversas regiones a lo largo del cromosoma que se diferenciaban fácilmente de su segmento adyacente por una mayor o menor fluorescencia. Estas regiones fueron posteriormente llamadas bandas Q (ISNC, 1985). En años posteriores se reportaron diversos métodos que producían tinciones con patrones de bandeo parecidas a las obtenidas por Caspersson y cols., así como técnicas que teñían otras regiones específicas de los cromosomas, las cuales se distinguen fácilmente de las tinciones convencionales (fig 4).

Estas técnicas, que parten de tratamientos a base de de soluciones amortiguadoras, enzimas, colorantes y sustancias diversas que inducen a la formación de regiones cromosómicas diferencialmente teñidas, han sido llamadas técnicas de bandas cromosómicas.

Las técnicas de bandas cromosómicas han sido clasificadas dentro de dos grupos principales: aquellas que forman un patrón de bandas a lo largo de todo el cromosoma, y las que tiñen regiones específicas de los cromosomas. De las primeras, las más importantes han sido las llamadas bandas Q,

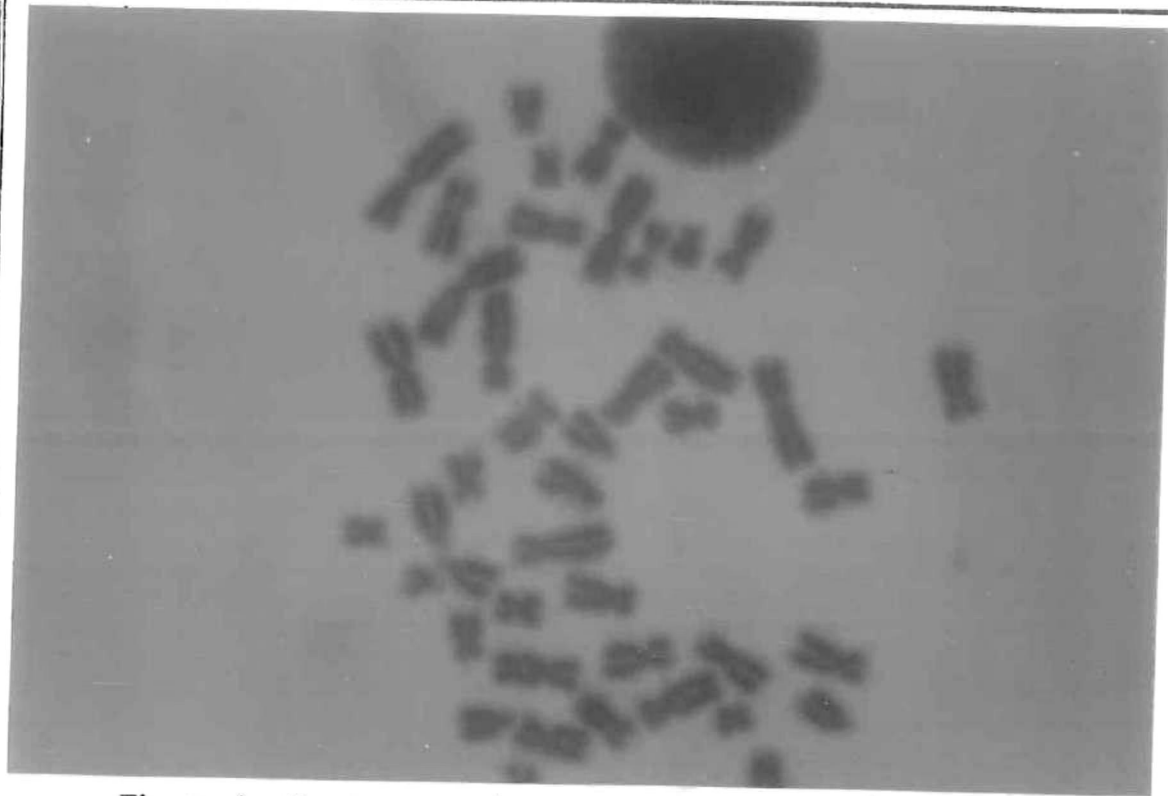


Figura 4.- Cromosomas humanos tratados con técnicas de tinción convencional Giemsa pH 7.

bandas G y bandas R. Del segundo grupo de técnicas destacan por su utilidad las bandas C, las bandas NORs y las bandas T. Las características más importantes de estas bandas se describen a continuación:

BANDAS Q: Este tipo de bandas fueron reportadas por primera vez por Caspersson y cols. (1969); su nombre proviene del colorante con que fueron producidas (mostaza de quinacrina). Este tipo se caracteriza por una serie de bandas a lo largo de todo el cromosoma las cuales son específicas para cada par de cromosomas homólogos, y para cada especie. A partir de la introducción de esta técnica de bandas fue posible identificar a cada par de cromosomas, siendo esta su aplicación más importante, y por ello han sido ampliamente utilizadas en citogenética clínica y para estudiar los heteromorfismos cromosómicos. Presentan la desventaja de requerir equipo y reactivos para fluorescencia, los cuales resultan caros y delicados, además requieren análisis inmediatos ya que las bandas desaparecen al cabo de pocos minutos.

BANDAS G: La técnica de bandas G produce un patrón de bandeamiento similar al de las bandas Q, pero carecen de fluorescencia. Son obtenidas a base de soluciones amortiguadoras o de enzimas. A diferencia de las bandas Q, no requieren equipo caro, son permanentes y resultan mucho más reproducibles y económicas, por lo que han sido las más ampliamente utilizadas para la investigación citogenética.

Tienen múltiples aplicaciones, entre las que destaca la identificación de los cromosomas en citogenética clínica y en estudios de tipo evolutivo (Fig. 5).

BANDAS R: Estas bandas cromosómicas fueron reportadas por primera vez por Lejune y cols. (1974, citado por Verma y Babu, 1989). Su nombre lo deben a que producen un patrón de bandas contrario al de las bandas Q y G, es decir, que las regiones que aparecen teñidas positivamente con bandas Q y G lo son negativas por medio de las bandas R (reverse). Estas técnicas pueden ser producidas tanto por colorantes fluorescentes como por métodos con soluciones amortiguadoras. Han sido utilizadas en genética clínica para estudiar heteromorfismos cromosómicos, y en investigaciones de tipo evolutivo.

BANDAS C: La técnica de bandas C debe su nombre a que las regiones teñidas corresponden a los centrómeros de todos los cromosomas y a los brazos largos del cromosoma Y. Estas regiones son conocidas por corresponder a un tipo especial de cromatina llamado heterocromatina constitutiva. La técnica de bandas C fue introducida por Arrighi y Hsu (1971). Se producen a partir de soluciones de hidróxido de sodio o hidróxido de bario. Han sido principalmente utilizadas para estudiar rearrreglos que ocurren en las regiones centroméricas y pericentromérica, así como para estudiar los heteromorfismos cromosómicos (fig. 6).

BANDAS NOR: Por medio de esta técnica es posible teñir



Figura 5.- Cromosomas humanos tratados con técnicas para bandas G, con solución tris, pH 9.

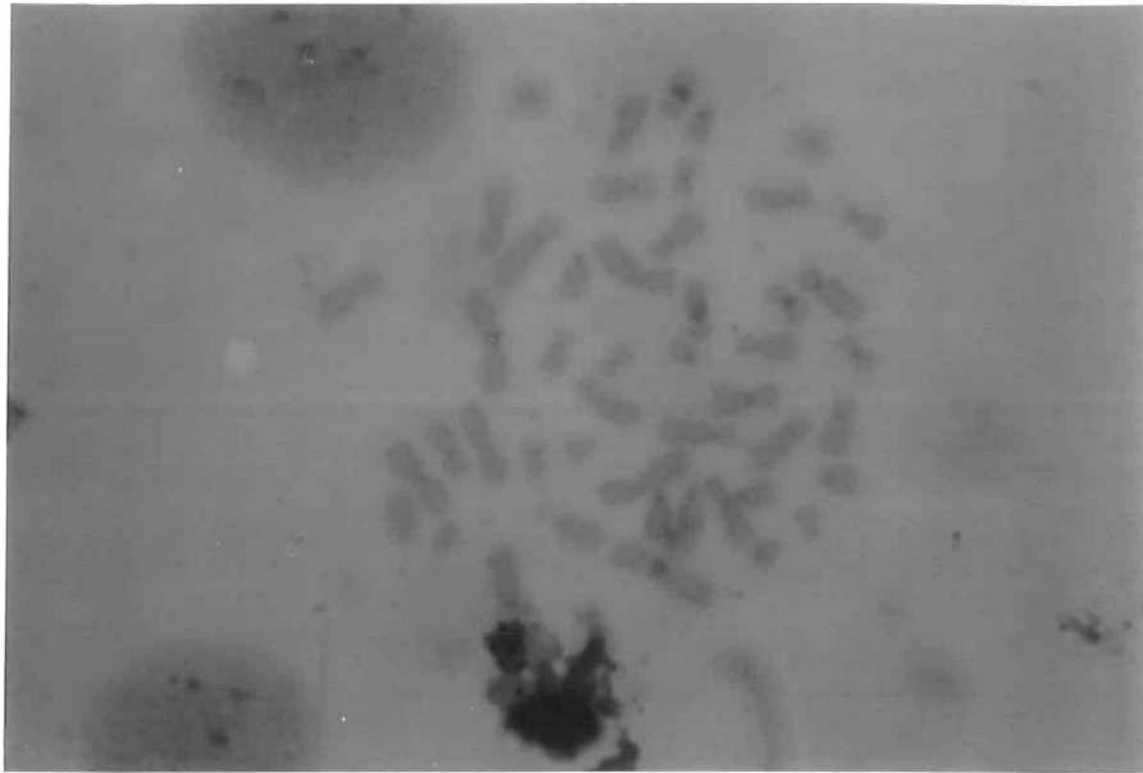


Figura 8.- Cromosomas humanos teñidos con técnica de bandas G, utilizando hidróxido de bario .

diferencialmente las regiones que corresponden a los tallos o regiones organizadoras del nucléolo (NORs). La técnica original fue introducida por Matsui y Sasaki (1973), posteriormente fue modificada por Bloom y Goodpasture (1976), para dar lugar a las bandas NOR. Estas bandas son obtenidas a partir de nitrato de plata y una solución de formalina a pH ácido (2.6 a 4). Han resultado de gran utilidad para estudiar la actividad transcripcional de los organizadores nucleolares, en citogenética clínica y para evidenciar algunos heteromorfismos de los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos (fig. 7).

Muchas otras técnicas de bandas cromosómicas han sido descritas, entre las que se pueden mencionar las bandas F, bandas G 11, bandas T y recientemente han sido introducidas técnicas de bandeado cromosómico a partir de enzimas de restricción, cuyos alcances aún no pueden ser establecidos (Verma y Babu, 1989).

Las técnicas de bandas han permitido logros espectaculares, principalmente en el campo de la biomedicina, donde se ha establecido el origen de múltiples enfermedades genéticas, también se les ha utilizado como marcadores genéticos tanto en medicina como en biología experimental y en estudios poblacionales han permitido establecer el comportamiento de los cromosomas bajo diversos experimentos, además de aportar una importante base de datos que han contribuido al mapeo de los cromosomas en organismos vivos.

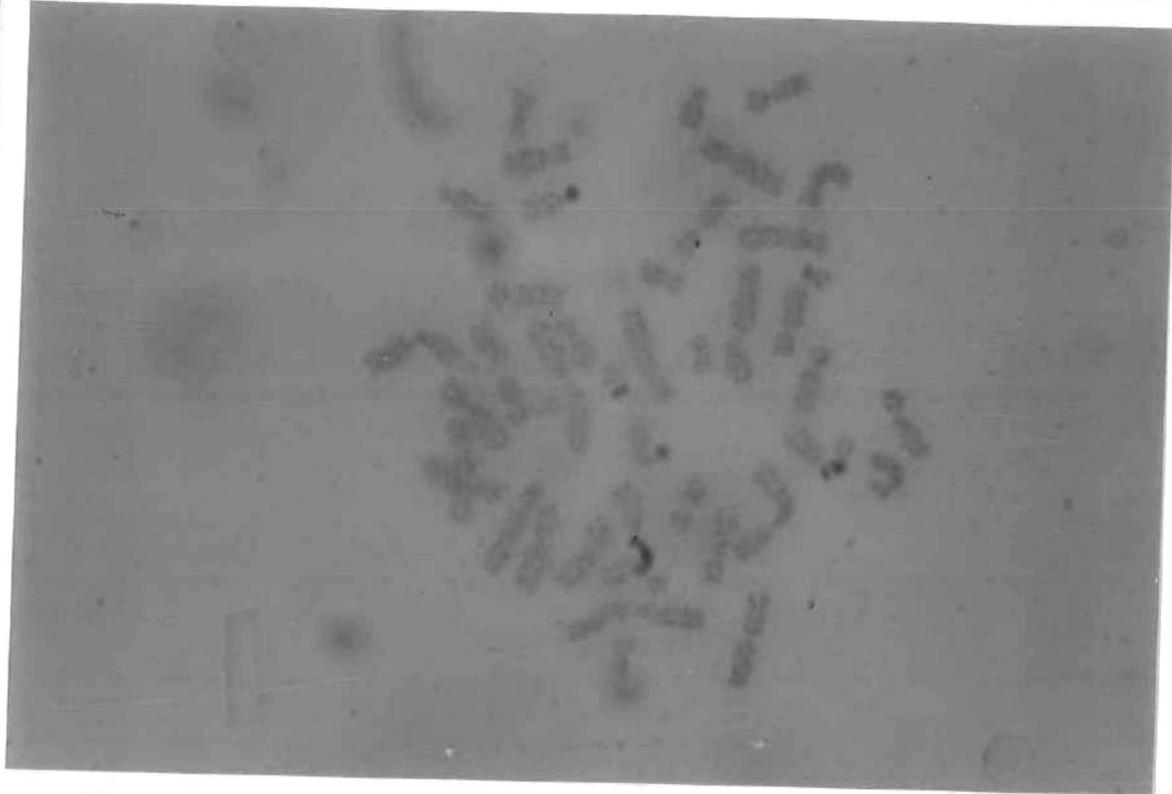


Figura 7.- Cromosomas humanos teñidos con nitrato de plata para obtener bandas NOR.

ANTECEDENTES

Los heteromorfismos cromosómicos han sido estudiados desde que se desarrollaron las técnicas que permitieron la observación de los cromosomas metafásicos, al inicio de los años sesentas.

Los primeros análisis de las variantes de los cromosomas acrocéntricos se hicieron en personas con deficiencias físicas y mentales (Reitalu y cols., 1964; Therkelsen, 1964). Más recientemente, distintos investigadores han sugerido que las variaciones menores, tales como satélites dobles o muy prominentes y variaciones cuantitativas de la heterocromatina constitutiva (bandas C), pueden estar relacionadas con malformaciones congénitas (Funderburk y cols., 1976; Salamanca y Cárdenas, 1982) o con el origen de algunas trisomías (Hansson y Mikkelsen, 1978; Mikkelsen y cols., 1980; Jackson-Cook y cols., 1985). Sin embargo, desde los años sesentas se había observado que las variantes presentes en personas normales no diferían de aquellas presentes en personas con malformaciones físicas y mentales (Sand, 1969). Actualmente existen una gran cantidad de reportes de variantes raras asociadas a fenotipos normales (Gigliani y cols., 1972; Lau y cols., 1979; Spinner y cols., 1989)

Por otro lado, desde la época anterior a la aparición de las técnicas de bandedo cromosómico se conocía de la

variación intrapoblacional en el tamaño de los brazos largos del cromosoma Y. Cohen y cols. (1964) encontraron diferencias significativas entre blancos, judíos, negros y orientales, al estudiar el tamaño de los brazos largos del cromosoma Y.

Los heteromorfismos del cromosoma Y siguen siendo de los más estudiados, (Erdtmann y cols., 1981; Bernsteins, y cols., 1986; Lin y cols., 1988; Wall y Butler, 1989).

Con el advenimiento de la época de las bandas al inicio de los años setentas, los heteromorfismos de regiones específicas empezaron a ser señalados. Craigh-Holmes y Shaw (1971) describieron 7 variantes de las bandas C entre cuatro individuos normales. Poco después, Craigh-Holmes y cols., (1973), reportaron la presencia de 31 variantes de estas mismas bandas entre 20 individuos normales. Lubs y Ruddle (1971), fueron de los primeros investigadores en señalar las variaciones intraraciales de los heteromorfismos cromosómicos entre grupos poblacionales diferentes, haciendo uso de las bandas Q y C. Lubs y cols. (1977), detectaron diferencias significativas en las variantes y sus frecuencias en ambos grupos. Resultados similares, pero utilizando bandas R, fueron obtenidos por Verma y Dosik, (1981). Otros estudios en los que se ha detectado un alto grado de heteromorfismos cromosómicos para las bandas C, han sido realizados; por ejemplo, Ghosh y Singh (1976), reportaron 42 variantes de la heterocromatina constitutiva entre 30 Indios. La mayoría de estas variantes correspondieron a los

cromosomas 1, 9, 16 y grupos D y G.

Geardest y Pearson (1974), al analizar los heteromorfismos de las bandas Q de 221 individuos de origen alemán describieron un promedio de 4 variantes por individuo al estudiar los cromosomas 1, 3, 4, 9, 13, 14, 15, 21 y 22. De los heteromorfismos que fueron detectados en esta población, una cuarta parte de las variantes correspondieron al cromosoma 13. Estos resultados muestran cierta semejanza con los obtenidos por McKenzie y Lubs (1975), quienes describieron 4 variantes por individuo, utilizando bandas Q. Además reportaron 166 variantes de las bandas C entre 76 individuos de origen caucásico, para los cuales analizaron todos los cromosomas del cariotipo.

Buckton y cols. (1976) estudiaron poblaciones suecas (recién nacidos, jóvenes de 14 años y ancianos) mediante bandas C y bandas Q; No encontraron diferencias significativas entre los heteromorfismos de los cromosomas 1, 9, 16, y los cromosomas acrocéntricos.

Yamada y Hasegawa, (1978), analizaron las bandas Q de 400 japoneses y detectaron 4 variantes por individuo al analizar los siguientes siete pares de cromosomas: 3, 4, 13, 14, 15, 21 y 22.

Al-Nassar y cols., (1981) hicieron estudios similares en tres poblaciones de kuwaities y no detectaron diferencias entre estas poblaciones. Señalaron además un promedio de 5 variantes por persona.

Sofuni y cols., (1980), revisaron las variantes de los satélites y brazos cortos de una población de niños japoneses y describieron nueve variantes que incluían dobles satélites y satélites muy prominentes, así como brazos cortos muy largos. Otros autores han reportado variantes similares con frecuencias diferentes en poblaciones distintas. Por ejemplo, Márquez (1982b), reportó en una población de 40 individuos mexicanos de fenotipo normal, dos personas que presentaron un cromosoma con doble satélite. El mismo autor, en 1984, describió seis tipos de heteromorfismos en una muestra de 100 personas sanas o cuyos padecimientos no se relacionaban con cromosomas.

Oka y cols. (1980), utilizando un densitómetro de exploración para evaluar los heteromorfismos de las bandas Q de los cromosomas acrocéntricos, encontraron 9, 11, 7, 10 y 10 variantes para los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22, respectivamente.

Olson y cols. (1986) describieron las variantes de una población caucásica con bandas Q, y encontraron un total de 26, 16, 20, 15 y 24 variantes para los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22, respectivamente. Entre los heteromorfismos detectados señalan cromosomas con dobles satélites, satélites muy grandes y brazos p muy largos aunque la frecuencia con que se presentan estos heteromorfismos es muy baja.

Entre los trabajos poblacionales más extensos que se han

realizado se encuentran los de Ibraimov (1983), Ibraimov y Mirrakhimov, (1982 a,b,c); Ibraimov y Mirrakhimov, (1983); Ibraimov y cols., (1982a,b); Ibraimov y cols., (1986a,b), quienes han determinado los heteromorfismos cromosómicos de diversos grupos étnicos soviéticos que habitan regiones muy diferentes y que han permanecido relativamente aislados por largo tiempo; incluyen mongoles de diversas provincias, rusos de origen caucásico, además de negros africanos de diversas regiones (Angola, Mozambique, y Etiopía). Sus estudios muestran diferencias en las frecuencias y tipos de variantes D entre algunos de los grupos raciales estudiados. Otras investigaciones realizadas en poblaciones soviéticas incluyen la determinación de la incidencia y distribución de las bandas NORs (Mikelssar e Ilus, 1979; Zakharov y cols., 1982). Ambos grupos de investigadores encontraron diferencias en la distribución de las bandas NORs entre los diversos grupos estudiados.

Otros estudios han sido realizados en diversas regiones del mundo, sin embargo, se desconoce mucho acerca de las poblaciones latinoamericanas, las cuales han recibido poca atención y por consiguiente, la literatura es escasa.

El estudio de diversos grupos étnicos y la utilización de diversas técnicas citogenéticas pueden contribuir a entender mejor el significado biológico, evolutivo y las posibles implicaciones patológicas de los heteromorfismos cromosómicos.

OBJETIVOS

1.- Determinar y caracterizar las variaciones de forma, tamaño e intensidad de tinción que presentan los brazos cortos ' (p) de los cromosomas acrocéntricos en una población humana normal.

2.- Establecer las frecuencias de aparición de las variantes detectadas en la misma población.

METODOLOGIA

En este estudio fueron analizados 56 individuos (30 hombres y 26 mujeres), con edades que fluctuaron entre los 20 y 28 años por medio de las técnicas de Giemsa pH 7 y bandas G, C y NOR, para determinar los heteromorfismos cromosómicos de los brazos cortos de los cinco pares de cromosomas acrocéntricos (13, 14, 15, 21 y 22), para lo cual fueron analizados un total de 560 cromosomas a partir de 3600 mitosis.

De la población analizada, formada por estudiantes universitarios, se tomaron un total de 56 muestras de 3 ml de sangre con jeringas estériles, a las que se les agregó una gota de heparina como anticoagulante. A partir de este material se hicieron cultivos de sangre de acuerdo a la técnica de Arakaki y Sparkes (1963), modificada por León-Cázares (Carlos Márquez, comunicación personal). Se virió 1 ml de medio McCoy 5A mod. (SIGMA), 0.05 ml de fitohemaglutinina (PHA-P) y una gota de antibiótico (5000 U/ml penicilina-5mg/ml estreptomina, preparado en NaCl-0.9%), en tubos de ensaye (13x100) debidamente lavados y esterilizados. Se añadieron también 8 gotas de sangre heparinizada, se taparon los tubos con tapones estériles y se cubrieron con un trozo de papel parafilm, para después incubar a 37°C durante 72 horas. Una vez transcurrido el

tiempo se agregaron 3 gotas de colchicina a una concentración de $4\mu\text{g/ml}$ y los tubos se volvieron a incubar a 37°C durante 90 minutos.

Posteriormente, los tubos se centrifugaron por 8 min a 1000 rpm. Transcurrido dicho tiempo se extrajo el medio de cultivo de los tubos con pipetas Pasteur hasta dejar aproximadamente 0.5 ml, procurando mantener el paquete celular intacto, enseguida se agregaron 5 ml de una solución de cloruro de potasio (KCl) 0.075 M a 37°C , y se incubaron nuevamente por 15 min. Se efectuó una nueva centrifugación por espacio de 8 min, a 1000 rpm, para separar la solución hipotónica y extraerla hasta dejar solamente 0.5 ml, a los cuales se añadieron 5 ml de fijador (ácido acético glacial-metanol absoluto 1:3) resuspendiendo el botón celular mediante pipeteo. Durante 15 min se mantuvo a temperatura ambiente y posteriormente se volvió a centrifugar bajo las condiciones ya señaladas repitiéndose el lavado con fijador hasta obtener un botón celular blanquecino como precipitado. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y con el precipitado se hicieron preparaciones por goteo, secado y fijado a la flama. El material así obtenido fue debidamente etiquetado y revisado bajo un microscopio de contraste de fases para seleccionar las mejores preparaciones.

A las laminillas elegidas se aplicarán técnicas de tinción convencional (Giemsa pH 7): 1 ml de Giemsa (solución

madre) + 1 ml de solución amortiguadora de Sorensen (KH₂PO₄ - 0.025M + Na₂HPO₄-0.025M) y 18 ml de agua destilada, con la cual se tiñeron dos preparaciones durante 10 min, al cabo de los cuales se lavaron con agua destilada.

TECNICAS DE BANDAS

Bandas G:

1.- Se colocó 1 ml de colorante de Giemsa en 19 ml de solución amortiguadora de tris-0.1 M (tris-hidroximetil aminometano) ajustado a pH 9, con HCl-0.1M. Con esta solución se tiñeron dos laminillas durante 9 min para luego lavarlas con agua destilada (Márquez, 1982a).

Otro método alternativo para preparaciones frescas fue el siguiente:

1.- Se colocó 1 ml de colorante Giemsa en 19 ml de una solución de borato de sodio (Na₂B₄O₇·10H₂O-0.1 M) ajustado a pH 9 con ácido bórico. Se tiñeron las laminillas durante 9 min para luego enjuagarlas con agua destilada (Márquez, 1982a).

Cuando no fue posible obtener preparaciones con Bandas G mediante los tratamientos de pH 9, se procedió a utilizar la técnica de bandas G con tripsina (TGB), de acuerdo al método de Wang y Fedoroff, (1972):

1.-Se colocaron las laminillas en una solución madre de de tripsina (SIGMA 250) al 0.04% disuelta en BFSCM-EDTA (solución de fosfatos sin Ca ni Mg -EDTA-0.02%), recién

preparada, durante 30 - 90 seg a 37 °C.

2.- Se hicieron dos enjuagues en etanol al 70% y dos en etanol absoluto.

3.- Se secaron al aire.

4.- Se tiñeron con colorante de Wright-50% diluido en solución amortiguadora de Sorensen (Na HPO-0.025 M + KH PO-0.025 M., 1:1) durante dos min.

5.- Posteriormente se tiñeron con Giemsa al 2.5%, diluido en solución amortiguadora de Sorensen, durante 5 min.

6.- Se lavaron con agua destilada y se secaron al aire.

Bandas C:

Se aplicó la técnica de Bandas C descrita por Salamanca y Armendarés (1974), que consistió en:

1.- Se colocaron las laminillas en cajas de Coplin con HCl 0.2N durante 20 min.

2.- Se lavaron con agua destilada.

3.- Se colocaron en una solución de Ba(OH) 8:H D -0.1M (hidróxido de bario) durante 8 min a 37 °C.

4.- Se lavaron con agua destilada.

5.- Posteriormente se colocaron en una solución 2XSSE (NaCl 0.03 + Citrato de sodio 0.03M) a una temperatura de 60 °C durante dos horas.

6.- Se lavaron nuevamente con agua destilada.

7.- Finalmente se tiñeron con una solución de Giemsa al 2%, diluida en una solución amortiguadora de Sorensen.

Bandas NOR:

Se aplicó la técnica de bandas NOR diseñada por Bloom y Goodpasture (1976), modificada (Márquez, comunicación personal).

1.- Se preparó una solución de nitrato de plata (AgNO_3) al 100%, colocando 2 gr de nitrato de plata en 2 ml de agua desionizada (Sol. A)

2.- Se preparó una solución de formalina al 3.5% (3.5 ml de formol en 96.5 ml de agua destilada), y se ajustó a pH 2.6 con ácido fórmico (Sol. B).

3.- De la sol. A se tomó 1 ml y se mezcló con 0.20 ml de sol. B. Con esta solución final se cubrió la laminilla y se incubó a 60 °C durante 15 min para luego ser lavada con agua destilada.

ANALISIS MICROSCOPICO

Las preparaciones cromosómicas fueron revisadas con un microscopio Mikron BX300, de campo claro.

Un mínimo de 15 campos metafásicos con buena dispersión fueron revisados para cada una de las muestras y por cada técnica. Cuando fue necesario se revisó un número mayor de campos metafásicos para disipar dudas sobre la presencia de las variantes. Las regiones se analizaron de acuerdo a las recomendaciones de Márquez (1985) y Olson y cols., (1986), que

comprenden los brazos cortos de los cinco pares de cromosomas acrocéntricos incluyendo la región pericentromérica, los tallos y los satélites.

Para detectar los heteromorfismos cromosómicos, primeramente se realizó el análisis convencional, y luego se procedió a identificar los cromosomas portadores de estas variantes por medio de bandas G. Posteriormente se analizó la distribución de la heterocromatina constitutiva (bandas C), para ubicar su posición en los brazos cortos. Finalmente se seleccionaron algunas preparaciones y fueron analizadas por medio de bandas NOR, para caracterizar los heteromorfismos cromosómicos de la región de los tallos.

RESULTADOS

Un promedio de 20 metafases con buena dispersión fueron analizadas para cada una de las muestras, de lo que resultaron cinco tipos básicos de variantes determinadas en base a las diferencias morfológicas de los brazos cortos de cada cromosoma acrocéntrico. Estos heteromorfismos incluyen: 1) cromosomas sin tallos ni satélites, 2) cromosomas con tallos y satélites sencillos, 3) cromosomas con tallos muy largos y satélites, 4) cromosomas con tallos muy gruesos y satélites y 5) cromosomas con doble tallo y doble satélite (Fig. 8).

La distribución de los 5 tipos de variantes entre los 560 cromosomas de las 56 personas analizadas se observa en la tabla 1. La figura. 9 muestra un histograma comparativo entre los cromosomas del grupo D (13-15) y E (21-22) así como la frecuencia total de apariciones de cada variante.

La variante tipo 2 resultó ser la más abundante seguida del tipo 1, representando estas dos más del 80% del total de las variantes encontradas. La variante tipo 3 apareció en 56 ocasiones entre los 560 cromosomas analizados, representando el 10%, mientras que la variante tipo cuatro constituye el 2.7% de los cromosomas analizados y la variante tipo 5 fue solamente el 0.72% del total (fig. 10).

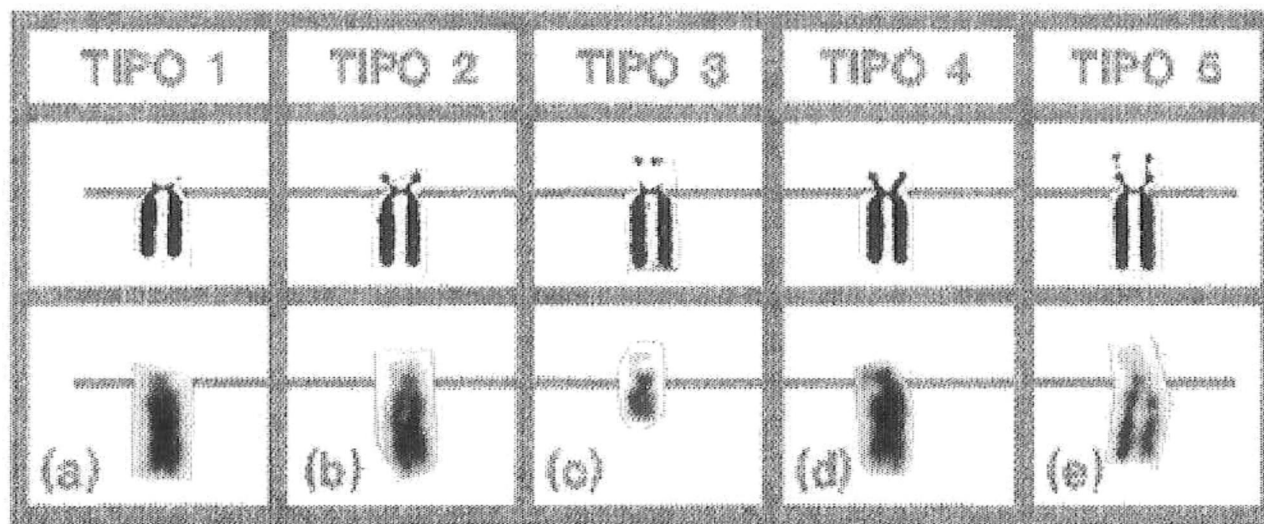


Figura 8.- Representación esquemática y ejemplos de fotografías de los cinco tipos de variantes encontradas en la población analizada

	TIPO 1	TIPO 2	TIPO 3	TIPO 4	TIPO 5
CROMOSOMAS GRUPO G	94	205	25	9	3
CROMOSOMAS GRUPO D	68	115	31	13	1
S U M A	162	320	56	22	4
T O T A L	5 6 0				

TABLA 1.- Frecuencias de aparición de cada una de las cinco variantes, en cada grupo D (13-15) y G (21-22). Asimismo se muestra el total de apariciones de cada variante.

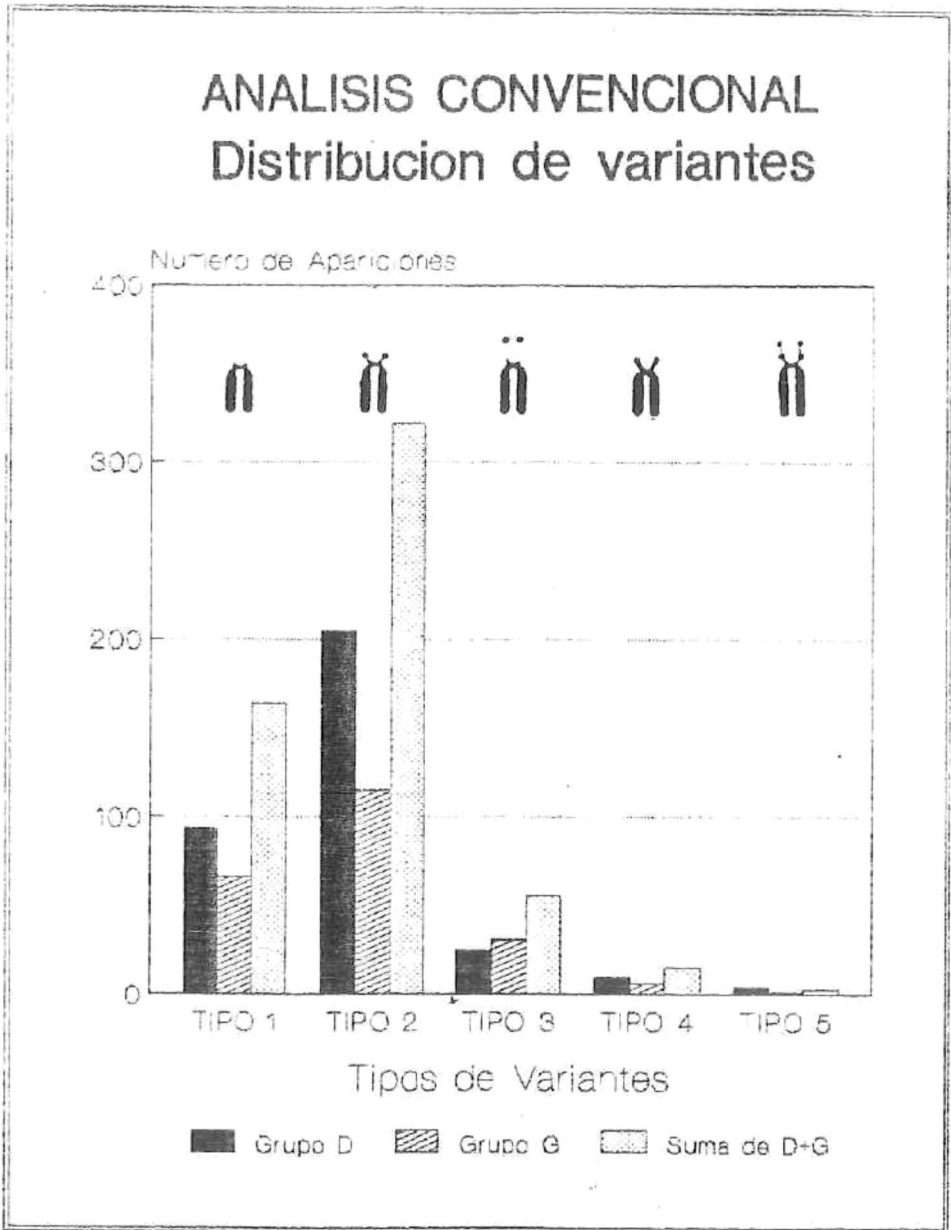


Figura 9.- Tipos de heteromorfismos encontrados por medio del análisis convencional. Frecuencia de apariciones y su distribución entre los grupos G (13-15) y D (21-22).

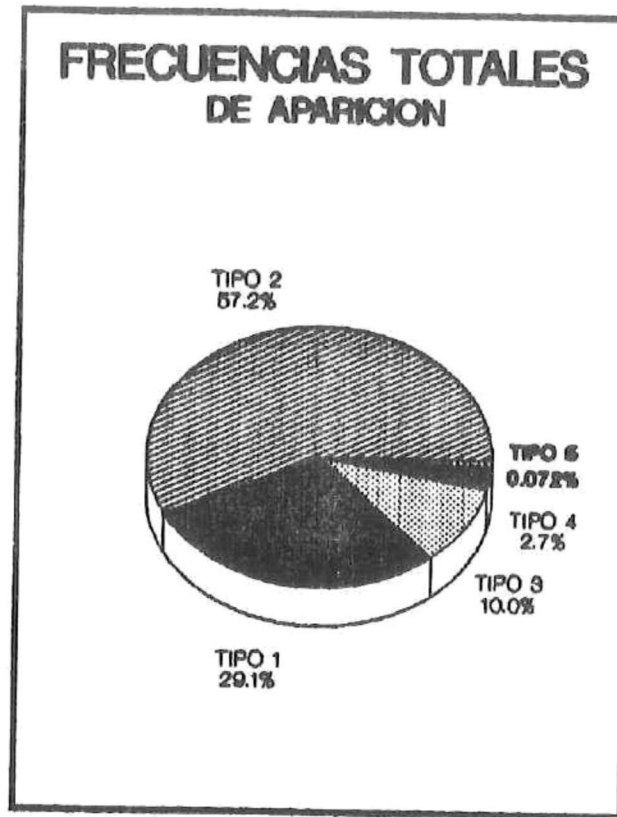


Figura 10.- Frecuencias porcentuales de aparición de cada uno de los cinco heteromorfismos cromosómicos encontrados por medio del análisis convencional.

Como dato adicional, también fueron detectados 14 casos de satélites gigantes entre los 56 sujetos estudiados correspondiendo éstos en su mayoría a los cromosomas del grupo B (fig. 11).

De acuerdo a la prueba de ji-cuadrada, el análisis convencional no muestra diferencias significativas entre los tipos de variantes y su distribución en ambos sexos (fig. 12).

H₀= La distribución de variantes entre hombres y mujeres no muestra diferencias significativas en cuanto a tipos de variantes y frecuencias de aparición.

$$\chi^2 = 0.78, \quad 4 \text{ Grados de libertad} \quad P = 0.941$$

Un promedio de 3 heteromorfismos por persona fueron detectados, con un rango entre 2 y 5 variantes por cada persona analizada mediante tinción convencional.

BANDAS G

De los 56 individuos, 50 (22 mujeres y 28 hombres), fueron analizados por medio de Bandas G con el objetivo de identificar cada par de homólogos y las variantes que portaron. La tabla 2 muestra la distribución de los cinco tipos de variantes entre los 500 cromosomas analizados.

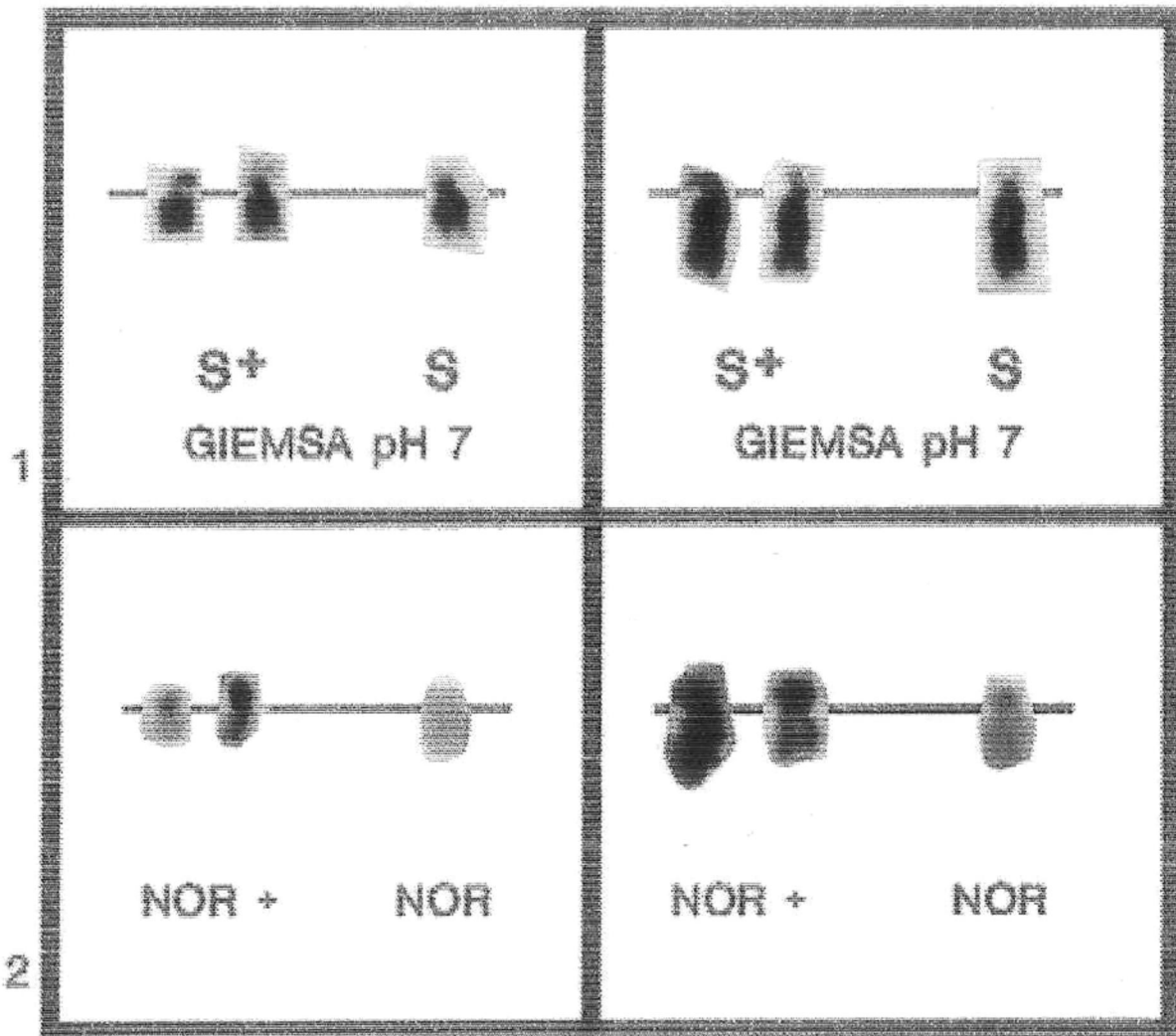


Figura 11.- Ejemplos de las variaciones detectadas para los satélites (1) y los tallos (2) , en donde se ven satélites normales (s) y satélites gigantes (s+) teñidos con Giemsa pH 7, (1). En la parte inferior se muestran tallos normales y tallos largos teñidos con bandas NOR.

ANALISIS CONVENCIONAL FRECUENCIAS DE VARIANTES

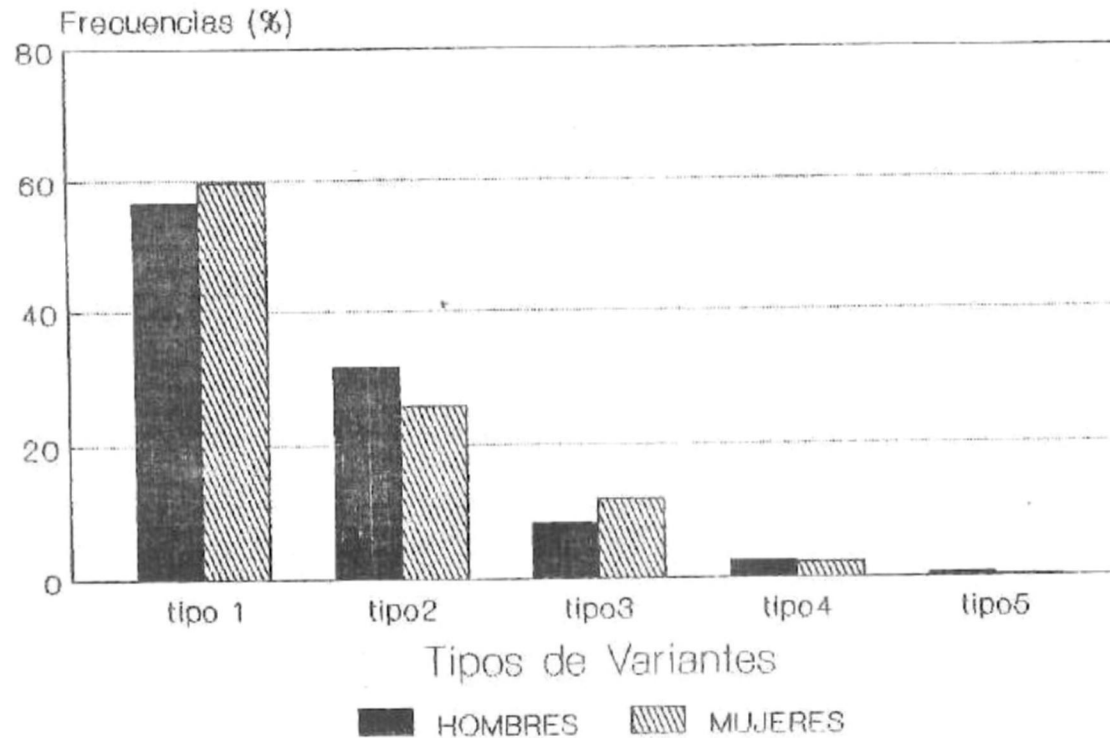


Figura 12.- Análisis comparativo entre ambos sexos, mostrando las frecuencias de aparición de cada uno de los cinco tipos de heteromorfismos encontrados en la población.

	TIPO 1	TIPO 2	TIPO 3	TIPO 4	TIPO 5
CROMOSOMA 13	34	54	10	2	1
CROMOSOMA 14	17	71	8	2	1
CROMOSOMA 15	35	57	7	3	1
CROMOSOMA 21	24	57	16	0	1
CROMOSOMA 22	50	12	12	1	0
T O T A L	147	289	52	8	4

TABLA 2.- Frecuencias de aparición de los cinco tipos de heteromorfismos para cada uno de los cinco pares de cromosomas acrocéntricos analizados.

CROMOSOMA 13

Cinco tipos de variantes fueron identificadas para el cromosoma 13. Incluyen los tipos 2 (el más común, con un 54%), el tipo 1 (33%), seguidos del tipo 3 y 4 (10% y 2% respectivamente). La variante tipo 5 representó sólo el 1% del total (fig. 13a).

CROMOSOMA 14

Los cinco tipos de variantes descritos fueron encontrados en el cromosoma 14. La distribución de los heteromorfismos es similar a la del cromosoma 13; sin embargo, la variante tipo 2 se ve aumentada en un 20% con respecto al cromosoma anterior. El tipo 1 representa en este cromosoma el 17% y los tipos 3-4 presentan frecuencias de 8% y 3%, mientras que el tipo 5 sólo muestra el 1% (fig. 13b).

CROMOSOMA 15

Cuatro tipos de variantes, 1, 2, 3 y 5 estuvieron presentes en este cromosoma. Las frecuencias de los tipos 1, 2 y 3 son muy similares a las del cromosoma 13, y el tipo 5 representa, el 1% de apariciones (fig. 13c).

CROMOSOMA 21

El cromosoma 21 muestra los cinco tipos de variantes encontrados en la población. Las frecuencias de aparición

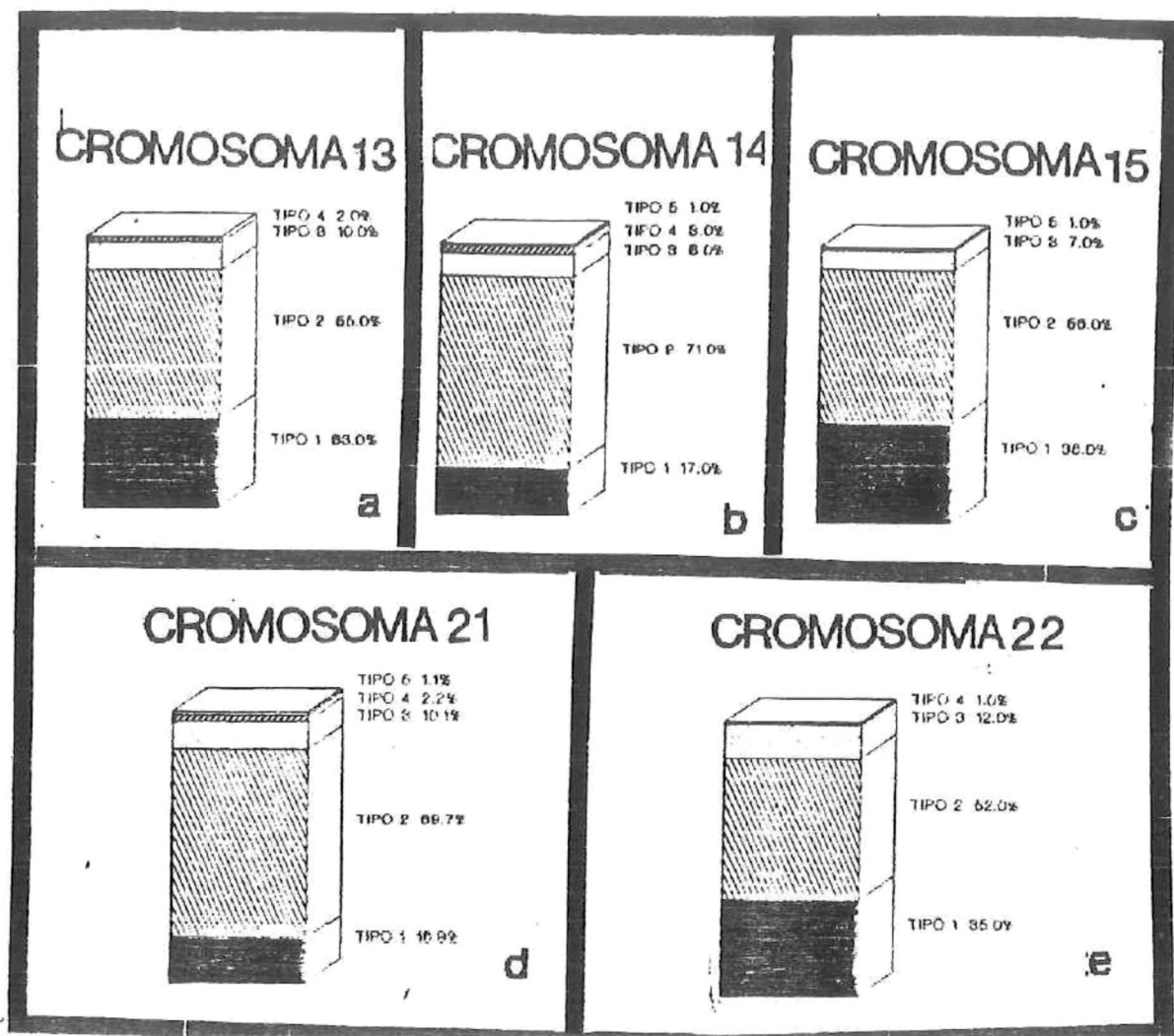


Figura 13.- Frecuencias porcentuales de aparición de cada variante en cada uno de los cinco pares de cromosomas Cacrocentricos.

de los 5 tipos de heteromorfismos presentan una distribución muy semejante a la del cromosoma 14 (fig. 13d).

CROMOSOMA 22

El cromosoma 22 presentó cuatro tipos de variantes, 1, 2, 3 y 4, y las frecuencias de distribución guardan un patrón semejante al de los otros cromosomas analizados, siendo el más común el tipo 2 con 52%, el tipo 1 con 35% y los tipos 3-4 con un 12% y 1% respectivamente (fig. 13e).

BANDAS C

De las 56 personas estudiadas 32 (20 mujeres y 12 hombres) fueron analizadas por medio de bandas C, para determinar la distribución de la heterocromatina constitutiva sobre los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos, detectándose cuatro patrones de distribución de las bandas C. Se clasificaron de la siguiente manera:

- (P) Cuando la banda C se presentó de tamaño normal, considerando que ésta es la más común (fig. 14a).
- (-P) Cuando la banda C estuvo ausente o su tamaño fue muy por debajo de lo normal (fig. 14b).
- (P+) Si la banda C se presentó con un 50% más del tamaño normal (fig. 14c).
- (P++) Cuando el tamaño de la banda excedió a más del 100% de la considerada normal (fig. 14d).

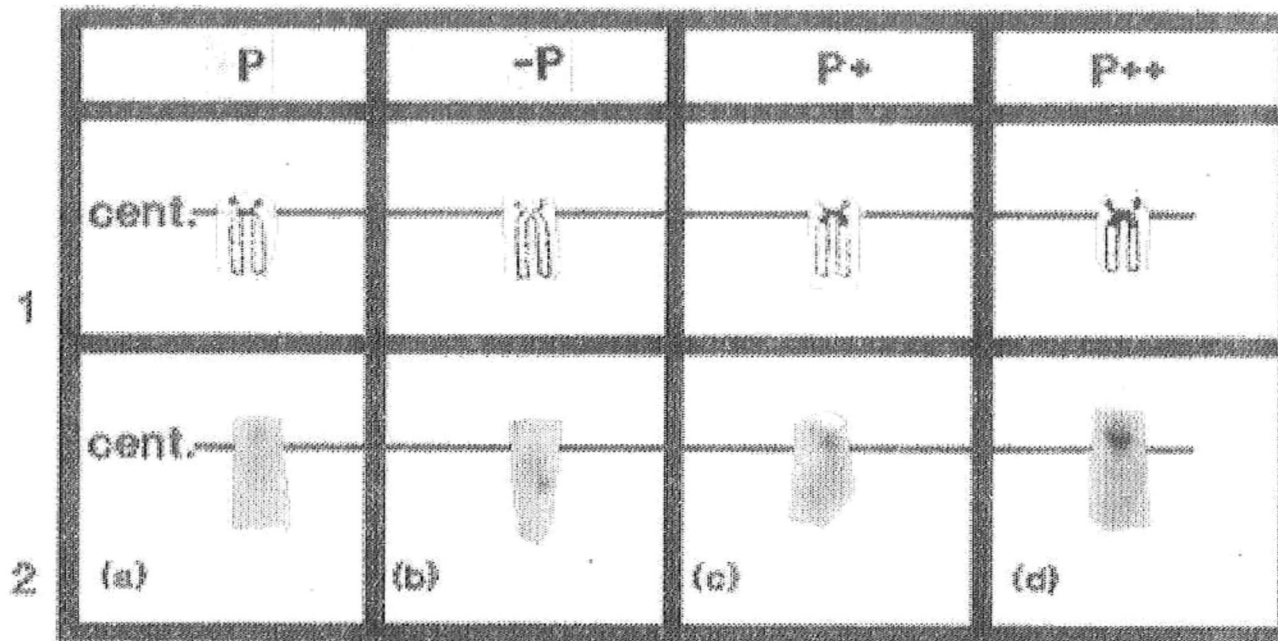


Figura 14.- Representación esquemática (1) y ejemplos fotograficos (2) de la distribución de la heterocromatina constitutiva en cromosomas acrocéntricos .

La distribución de estos 4 tipos de variaciones aparecen en la tabla 3.

El número de apariciones se muestran en la figura 15, y se puede apreciar que la variante P aparece en 201 de los 320 cromosomas analizados para esta técnica constituyendo el 62% del total. -P y P+ se presentaron con un 16.5% y la menos frecuente P++ con sólo un 5% (fig. 16).

No se observaron diferencias importantes entre la distribución de los cuatro tipos de heteromorfismos entre hombres y mujeres (fig. 17).

NOR

Un total de 15 muestras fueron tratadas por medio de técnicas para bandas NOR, considerando las que resultaron ser las más representativas.

Las variantes tipo 2, aparecen teñidas en la región de las NORs como un punto negro cuyo diámetro presenta variación, manteniéndose constante el número de NORs en las diferentes células analizadas para cada muestra.

En general las variantes tipos 3 y 4 muestran bandas NOR de un tamaño considerablemente mayor con respecto al tipo 1, el número de NORs y el tamaño de las mismas se mantiene constante, en la mayoría de las ocasiones.

	-P	P	P+	P++
C R O M O S O M A S D	29	123	34	12
C R O M O S O M A S G	21	78	18	5
S U M A	50	201	52	17
T O T A L	3 2 0			

TABLA 3 Frecuencias de aparicion de los cuatro heteromorfismos de las bandas C para ambos grupos de cromosomas acrocentricos D (13-15) y G (21-22).

BANDAS C

Heteromorfismos Bandas C

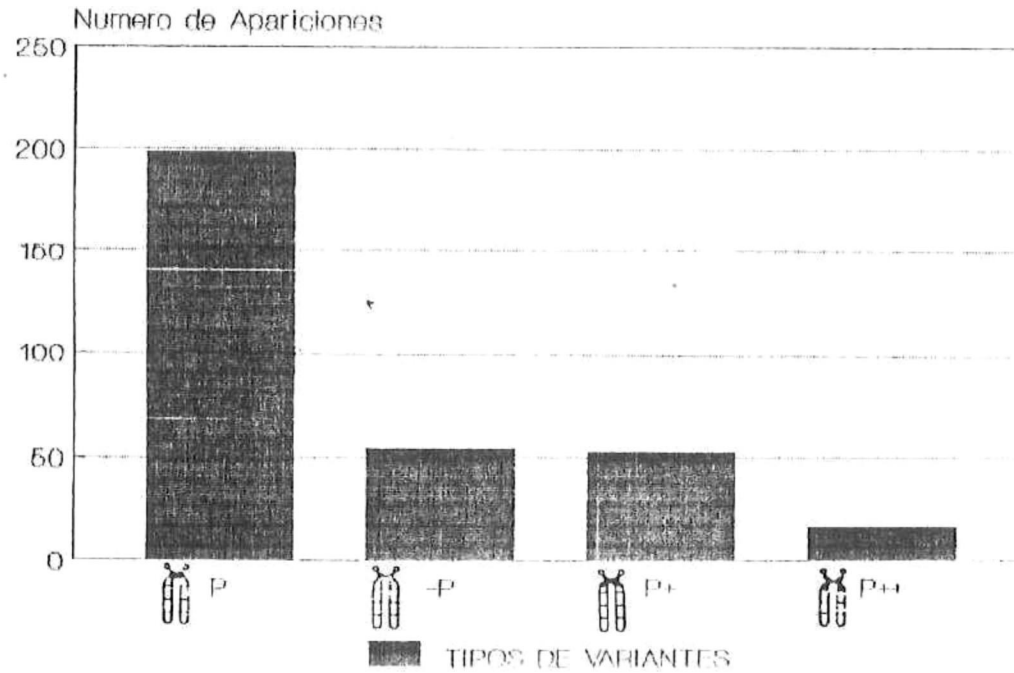


Figura 15.- Frecuencias de apariciones de cada uno de los cuatro tipos de variantes de las bandas C que fueron detectadas para la población estudiada.

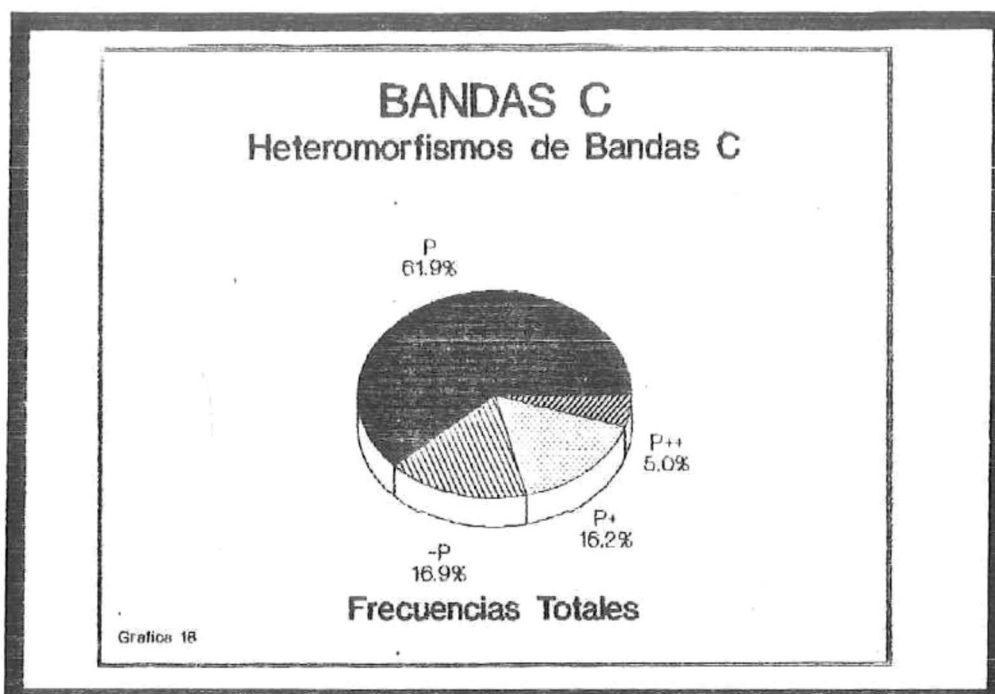


Figura 16.- Frecuencias porcentuales de aparición de los cuatro tipos de heteromorfismos de las bandas C.

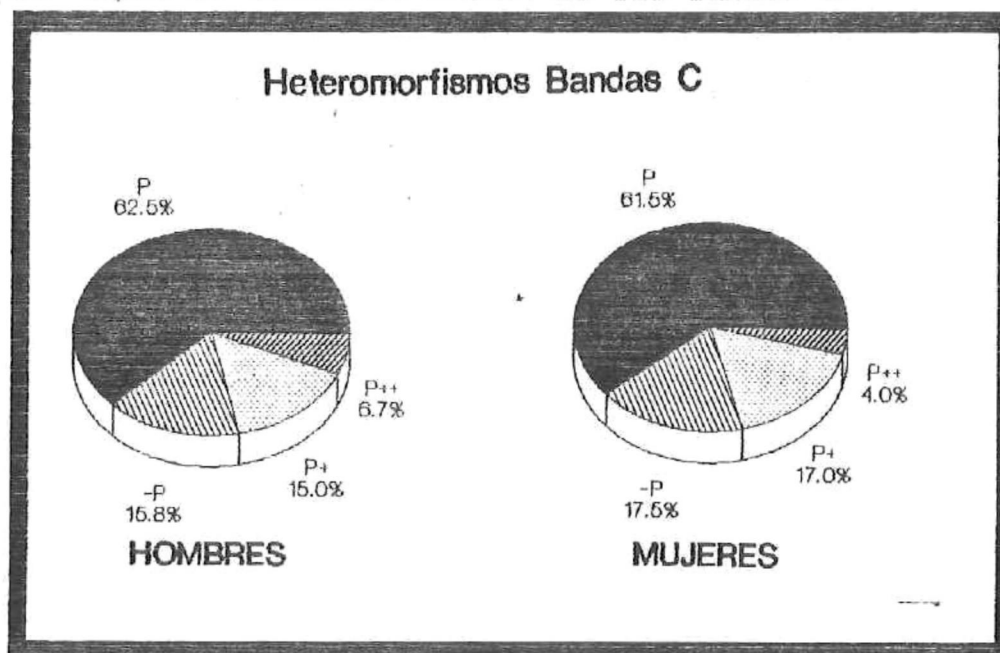


Figura 17.- Distribución de los cuatro tipos de variantes de la heterocromatina constitutiva en ambos sexos.

El cromosoma tipo 5 fue analizado para tres de los cuatro casos detectados, mostrando todas bandas NOR de un tamaño mayor que en los casos descritos anteriormente. En el caso de un cromosomas 14, con doble tallo y doble satélite se observa una NORs de forma alargada (Fig. 11, NOR+), diferenciándose de otros cromosomas del mismo tipo cuya NORs se presenta más bien de forma ovalada.

En el caso de este cromosoma 14, los análisis de un gran número de células fueron realizados, presentándose tal variante en un 70% de las ocasiones.

Cabe hacer la aclaración de que todo análisis citogenético está sujeto a cierto grado de error. Para este trabajo se han tomado precauciones como el análisis de un promedio de 20 células por cada individuo y para cada una de las técnicas aplicadas, cuando existió duda sobre la existencia de un heteromorfismo, las preparaciones fueron revisadas por un observador adicional, el número de células analizadas fue incrementado hasta disipar la duda, se analizaron preferentemente células en metafase media, con buena dispersión y cuidando seleccionar sólo preparaciones de buena calidad. Se considera que estas prácticas disminuyen considerablemente el grado de error que pudiera existir en el análisis microscópico, aumentando por otro lado la confiabilidad de los resultados presentados.

DISCUSIONES

En este trabajo la población analizada estuvo formada por 56 estudiantes universitarios que asisten a la Facultad de Ciencias. Esta muestra forma parte de una población saludable, es de fácil acceso y presentó la posibilidad de tomar una muestra adicional cuando fue necesario, por lo tanto se consideró la población más conveniente, al ser la más accesible para realizar este estudio.

El tamaño de muestra es adecuado si se toma en cuenta que en este trabajo, el análisis de los heteromorfismos se basó en cuatro tipos de técnicas: Tinción convencional con giemsa pH 7, bandas G, bandas C y bandas NOR, y además si se considera que en los reportes el número de individuos estudiados varía enormemente, por ejemplo, existen trabajos de variantes de un sólo individuo, (Lau y cols., 1979), o casos clínicos que reportan heteromorfismos en miembros de una sola familia, (Reitalu y cols., 1964; Gigliani y cols. 1972). Existen también un gran número de reportes de las variantes de un solo cromosoma, de los cuales se pueden mencionar a Babu y cols. (1986) y a Wachtler y Musil (1989), quienes analizan los brazos cortos del cromosoma 15, aplicando diversas técnicas de bandas cromosómicas. Si bien abundan los reportes con número de

muestras semejantes al de este trabajo y entre los que se han citado a Craig-Holmes y Shaw. (1971); Ghosh y Singh. (1976), Phillips (1977) y Olson y cols. (1986), también los hay aquellos en que el número de muestras supera los mil. Por ejemplo, Lubs y Ruddle (1971) analizaron 4482 niños mediante técnicas de tinción convencional; por otra parte una población similar de 1000 niños recién nacidos fueron estudiados mediante bandas C, por Salamanca y Cárdenas (1982), en tanto que Hsu y cols. (1987) estudiaron una población de 6250 sujetos, analizando los cromosomas 1, 9, 16 y Y, para lo cual utilizaron sólo técnica de bandas Q.

Estos datos muestran que los diversos criterios utilizados para establecer el número de muestras, depende de la disponibilidad de las mismas, de los objetivos del trabajo y de las técnicas que se han de utilizar.

Por otra parte, el análisis de 56 individuos dió por resultado la determinación de cinco tipos de variantes, las cuales fueron consideradas de acuerdo a marcadas diferencias morfológicas de los brazos cortos y siguiendo las recomendaciones de Márquez (1985) y Olson y cols. (1986).

Los resultados obtenidos en este trabajo por medio del análisis convencional coinciden con los reportados por Márquez (1984 y 1985) quien estudió poblaciones normales o cuyos padecimientos no estaban relacionados con cromosomas.

Se funi y cols. (1980), reportaron variantes similares en una

población de niños japoneses y al igual que en este trabajo, las frecuencias de los cromosomas con tallos largos, dobles tallos y dobles satélites son muy bajas.

En la actualidad es escasa la literatura sobre análisis cromosómicos con tinciones homogéneas (Giemsa pH 7), ya que han sido desplazados por las técnicas de bandas, sin embargo, existen ciertos heteromorfismos que difícilmente pueden ser detectados por bandas, tales como el tamaño de los tallos, para los cuales este trabajo reporta dos variantes (tipo 3 y 4). Aunque en la actualidad se utilizan bandas NOR para estudiar estas regiones, es bien conocido que tales bandas están más relacionadas con la actividad transcripcional del ADN_r localizado en esta parte del cromosoma; las cuales no muestran proporcionalidad al número de genes o tamaño del tallo (Schwarzacher, y cols., 1978; Capoa y cols., 1988; Ferraro y Prantera., 1988).

El análisis de las bandas NOR puede mostrar algunos aspectos interesantes con respecto a la naturaleza de estas regiones. Por ejemplo, Spinner y cols. (1989), analizando las NOR de poblaciones con deficiencias físicas y mentales y poblaciones saludables, reportan 4 tipos de variaciones que incluyen, una banda NOR tamaño normal, formada por un punto sencillo, una NOR de gran tamaño, dos NOR unidas por una franja del mismo material y dos NORs francamente separadas. Estas variaciones, aunque pueden parecer un reflejo de los heteromorfismos observados por técnicas convencionales, son

también reflejo de la actividad transcripcional de las NOR, las cuales no se mantienen constantes, ya que dicha actividad depende de factores tales como el tipo de célula, la etapa del ciclo en que se encuentre y la función que realizan (Bourgeois y Hubert., 1988).

Otras comparaciones son difíciles de establecer, por que en la mayoría de los trabajos realizados se reportan bandas Q, cuyos criterios de evaluación, establecidos por ISCN, están basados en la intensidad de la fluorescencia. Sin embargo, en general se coincide, en que la presencia de variantes tales como tallos y satélites dobles y tallos muy largos se presentan con frecuencias muy bajas en las diversas poblaciones, (Buckton y cols., 1976; Sofuni y cols., 1980; Olson y cols., 1986)

Las variantes tipo 1 (con una región pericentromérica en el brazo "p", pero sin tallos ni satélites) y la variante 2 (con tallos y satélites sencillos) representan los heteromorfismos más comunes y entre las dos constituyen casi el 85% de los cromosomas. Este tipo de heteromorfismos que pueden ser fácilmente detectados por diversas técnicas de bandas (G, R y Q) han sido reportados por todos los investigadores como los más comunes para la especie humana.

Las variantes tipo 3 y 4, se presentan con bajas frecuencias y existen pocos reportes sobre las mismas. Los trabajos realizados en la actualidad no parecen considerar adecuadamente a tales heteromorfismos y sólo en contadas

ocasiones son referidos. Por ejemplo, Sofuni y cols. (1980) describen un caso entre nueve individuos estudiados. Olson y cols. (1986) reportaron los heteromorfismos de los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos de 39 individuos, señalando el tamaño de los tallos, como ausentes (0), muy cortos (1), cortos (2), medianos (3), largos (4) y muy largos (5). Aunque es difícil establecer comparaciones precisas, el primero de sus casos, (1), puede corresponder al cromosoma tipo 1 descrito en este trabajo, del segundo y tercero podría ser el tipo 2 y los casos (4) y (5) representarían el tipo 3. Independientemente de tales posibilidades, las frecuencias de las variantes extremas (tallos largos), se presentan en muy bajas proporciones en ambos trabajos y con esas frecuencias bajas coinciden los datos que aquí se presentan.

Otras comparaciones no son posibles debido a que la mayoría de los autores que han descrito los heteromorfismos de los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos, se refieren principalmente a los brazos cortos propiamente dichos (p11) y satélites (p13) y omiten señalar el grosor, el tamaño y el número de tallos.

En este trabajo se ha considerado que tales variaciones deben ser tomadas en cuenta, ya que los análisis de un numeroso grupo de células ha mostrado su persistencia en diferentes células y cultivos de una misma persona.

Sobre la variante tipo 5 (doble tallo y doble satélite), existe un gran número de reportes clínicos y de su distribución en diversas poblaciones. Reitalu y cols. (1964), son de los primeros en reportar este tipo de heteromorfismos en un niño y dos de sus parientes, señalando de paso el carácter mendeliano en la heredabilidad de estos rasgos. Otros casos similares y asociados a fenotipos normales son señalados por Gigliani y cols. (1972), Lau y cols. (1979), Balicek y cols. (1982), Márquez, (1982b) entre otros. En el caso de este estudio fueron detectados 4 cromosomas con doble tallo y doble satélite, uno para cada uno de los siguientes cromosomas: 13, 14, 15 y 21, representando sólo el 0.72% del total de las variantes.

En cuatro de los 56 sujetos estudiados se encontró la variante tipo 5, lo que representa que un 7% de la muestra es portadora de este heteromorfismo, la tabla 4, presenta el número de personas que portaron esta variante, así como los otros cuatro tipos de heteromorfismos, expresados en porcentaje. Resultados parecidos han sido reportados por Jackson-Cook y cols. (1985), quienes encontraron 15 de estas variantes entre 150 individuos (10%); Chambers y Priest, (1986) reportaron 17 personas con doble tallo y doble satélite entre 200 muestras (8.5%); Spinner y cols. (1989), detectaron 14 casos en 108 individuos estudiados, representando el 13% y Márquez (1982) reporta dos casos de dobles tallos y satélites entre 40 individuos constituyendo

TIPO DE CROMOSOMA	No de personas portadoras	%
T I P O 1	56	100
T I P O 2	56	100
T I P O 3	32	58
T I P O 4	11	19
T I P O 5	4	7

TABLA 4. Se muestra los cinco tipos de variantes, el número y porcentaje de personas portadores de las variantes.

el 5% de los casos. Otros autores no han reportado o detectado dichas variantes. Hassold y cols. (1987), no encontraron ninguno de estos casos entre 78 personas analizadas.

Con respecto a esta misma variante existen un gran número de reportes clínicos intentando relacionarla con el origen de algunos estados patológicos. Por ejemplo, Jackson-Cook y cols. (1985), encontraron esta variante en 13 de 41 pacientes con síndrome de Down, mientras que en una muestra de 50 controles sólo se presentó una. Sin embargo, Hassold y cols. (1987) no encontraron esta variante entre 55 personas normales y en 23 personas con abortos espontáneos por trisomía de algún acrocéntrico. Por su parte Spinner y cols. (1989), no encontraron diferencias significativas en la distribución de tales variantes entre personas con síndrome de Down y personas normales.

La relativa alta frecuencia con que se ha descrito esta variante en diversas poblaciones, además de estar frecuentemente asociada a personas normales hacen difícil establecer relaciones directas entre dichas variantes y estados patológicos tales como las trisomías, (Hassolds y cols. (1987).

Los datos disponibles del alto grado de heteromorfismos cromosómicos de los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos, sugieren que algunas variaciones extremas

pueden ser toleradas sin consecuencias patológicas y mantenerse en las poblaciones sin desventajas.

BANDAS G

Con respecto al análisis de las bandas G, se observó que casi todas las variantes están presentes en los cinco pares de acrocéntricos. La distribución y frecuencia de las variantes 3, 4 y 5 son las mismas para todos los cromosomas acrocéntricos, mientras que las variantes tipo 1 y 2 lo son similares para los cromosomas 13, 15 y 22. Los cromosomas 14 y 21 muestran un incremento del 20% para el tipo 2, con respecto a los otros cromosomas, tabla 2, (fig. 18), presentando por otro lado una disminución en las frecuencias de la variante tipo 1. Esto representa que un mayor número de variantes pueden ser encontradas entre los cromosomas 13, 15 y 22.

Parte de los datos coinciden con los descritos por diversos autores, (Pearson y cols., 1973; Buckton y cols., 1976; Yamada y Hasegawa, 1978; Wachtler y Musil, 1989; Oka y cols., 1980; Al-Nassar y cols., 1981; Ibraimov 1983; Ibraimov y Mirrakhimov 1982a,b,c y 1983; Ibraimov y cols. 1982a,b y 1986a,b; Olson y cols., 1986), quienes señalan a los cromosomas 13 y 15, como los que más heteromorfismos presentan.

Otra característica relevante observada en el análisis es la alta frecuencia de la variante tipo 3 en los cromosomas

FRECUENCIA DE VARIANTES

Bandas G

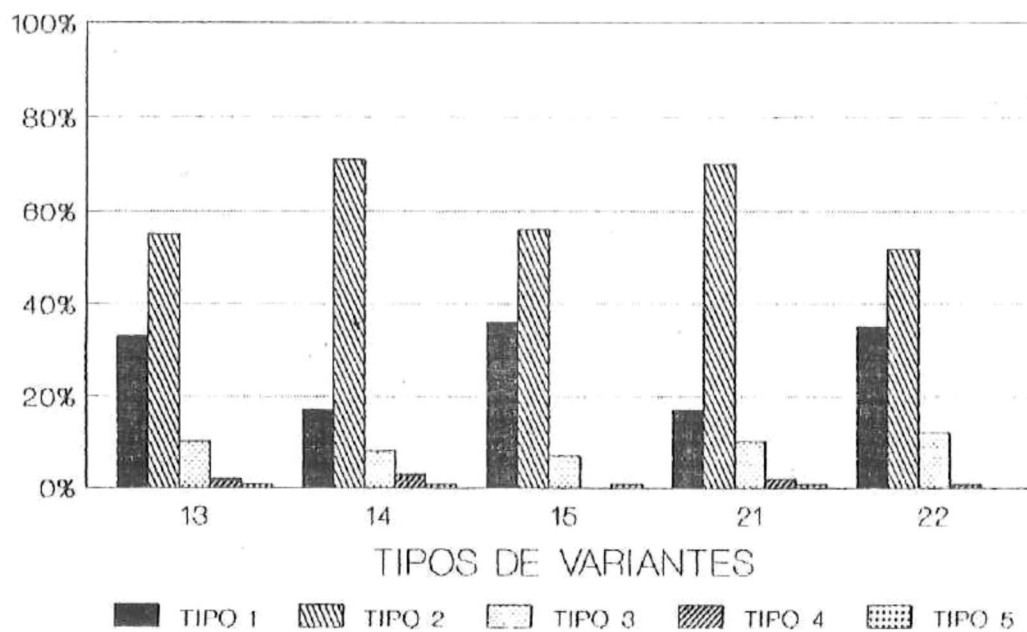


Figura 18.- Frecuencias de aparición de cada variante y su distribución entre los cinco pares de cromosomas acrocéntricos.

21 y 22, coincidiendo también con una alta frecuencia de cromosomas con satélites gigantes para estos cromosomas.

Cabe señalar que todos estos autores indican que ninguna diferencia significativa entre ambos sexos ha sido establecida, independientemente de las técnicas y poblaciones que se han trabajado, y en los resultados que aquí se presentan, se coincide con ellos.

BANDAS C

En este trabajo se estudiaron las variaciones de la heterocromatina constitutiva (bandas C), observando su distribución sobre los brazos cortos, para lo cual se establecieron cuatro tipos de heteromorfismos de las bandas C, considerando la distribución de la heterocromatina constitutiva: el primer tipo, 1) F, formado por una banda mediana, considerado el más común, 2) -F banda muy pequeña, 3) F+ banda C grande y 4) P++ banda C muy grande. (Fig. 14) Criterios similares en la evaluación de las bandas C, han sido aplicados por diversos autores, Craigh-Holmes y cols. (1973); Ghosh y Singh, (1976); Sofuni y cols. (1979); Ibraimov y Mirrakhimov (1982b); Salamanca y Cárdenas, (1982).

Los resultados obtenidos del análisis de bandas C, son muy similares a los descritos por estos autores y otros más entre los que se pueden citar a (Geardest y Pearson, 1974;

Lubs y cols. 1977), en donde la variante tipo P es la que se presenta con mayor frecuencia, seguida de P+, -P y P++.

En este tipo de heteromorfismos, no se detectaron diferencias entre los sexos en los datos que aquí se presentan, lo cual es similar a lo que otros autores han reportado.

Los heteromorfismos de la heterocromatina constitutiva son igual de evidentes que los observados por medio de las técnicas convencionales (Giemsa pH 7). Estos tienden, al parecer, a permanecer más estables en las diversas poblaciones, ya que las variaciones detectadas en las poblaciones analizadas han sido más bien despreciables, como lo muestran los estudios de Bernstein y cols. (1986), quienes compararon las variantes entre diversos nativos del amazonas, caucásicos y japoneses. Ibraimov y Mirrakhimov (1982b), al comparar la distribución y frecuencia de los heteromorfismos de las bandas C entre poblaciones de diversas provincias siberianas concluyeron que las diferencias entre las dos poblaciones eran mínimas. Por su parte Lubs y cols. (1977), sólo detectaron algunas variaciones entre blancos y negros. Sin embargo, se considera que el uso de estos heteromorfismos como marcadores poblacionales tiene un potencial enorme y sólo bastan algunas adecuaciones para poder ser ampliamente utilizadas (Bernstein y col., 1986).

Aunque actualmente existe una tendencia para aceptar los

heteromorfismos de las bandas C como una característica integral de los eucariontes (Verma y Dosik, 1980), muchos autores han señalado la posibilidad de que estas variantes influyan en la aparición de algunas malformaciones congénitas (Salamanca y Cárdenas, 1982). No obstante, y al igual que para otros heteromorfismos, ninguna relación clara se ha podido establecer entre determinadas variantes y alguna anomalía (Erdtmann, 1982).

BANDAS NOR

Los análisis de las bandas NORs, han sido ampliamente utilizados para caracterizar los heteromorfismos de las regiones de los tallos (Schwarzacher y cols., 1978; Zakharov y cols., 1982; Jackson-Cook y cols., 1985; Hassold y cols., 1987; Spinner y cols., 1989). Los trabajos de la mayoría de estos autores muestran básicamente 4 tipos de variaciones que incluyen pequeño, mediano, grande y doble NORs, y de las cuales en este trabajo se han detectado las tres primeras. A pesar de que los heteromorfismos de las bandas NORs han sido estudiados como una herramienta para apoyar a las variaciones detectadas por otras técnicas de bandas, existen algunos estudios poblacionales que pretenden caracterizar a las poblaciones en base a estos heteromorfismos. Mikelsaar e Ilus, 1979 y Zakharov y cols. en 1982, intentaron estudiar las variantes de tres poblaciones rusas, sin embargo, sus trabajos no pueden ser debidamente considerados debido a la

complejidad con que se expresan las NORs. En el presente trabajo las bandas NOR, han servido para comparar el tamaño de los tallos con el tamaño de dichas bandas, los análisis muestran alguna concordancia ya que en aquellos casos de variantes con tallos gruesos, largos o dobles tallos y dobles satélites, las bandas NOR, han sido de gran tamaño, sin embargo, esto no se presentó como una regla ya que en algunos casos las bandas NOR no mostraron proporcionalidad respecto al análisis convencional.

COMENTARIOS FINALES

Con respecto al significado biológico que pudieran tener los heteromorfismos cromosómicos, diversas hipótesis han sido planteadas, sin embargo, ninguna de estas ha logrado presentar evidencias suficientemente fuertes como para ser aceptadas.

Partiendo del hecho de que la mayoría de los heteromorfismos involucran ADN redundante, diversos autores han marcado la posibilidad de que los cambios en la cantidad de este material evidenciados por los mismos heteromorfismos, no tenga ninguna repercusión clínica o biológica (Craigh-Holmes y Shaw, 1971; Craigh-Holmes y cols., 1973; Pearson y cols., 1973). Otros, como Ibraimov y cols. (1982a,b 1983, 1986a,b), considerando al ADN redundante, sugieren por otro lado, la posibilidad de que los heteromorfismos tengan un valor adaptativo a diferentes condiciones ambientales, tales

como el frío y la anoxia.

Por otra parte, algunos autores han hecho mención de las repercusiones que puede tener el exceso de algunos tipos de ADN, por ejemplo el de la heterocromatina constitutiva, y el de los genes ribosomales, durante la compleja organización del núcleo y el nucléolo en interfase, dando por resultado sobrecargas que pueden conducir a cambios estructurales que interfieran con el desarrollo normal de los eventos de la mitosis y meiosis (Vagner-Capodano y col., 1987). También se ha señalado que algunos cambios en la cantidad y distribución de este mismo material genético pueda alterar la expresión de algunos genes (Lubs y Ruddle, 1971).

No obstante, ninguna de las hipótesis mencionadas ha podido ser demostrada y el significado clínico y biológico de los heteromorfismos cromosómicos sigue siendo un enigma.

A pesar de que algunos planteamientos, persisten después de 30 años de investigación, el estudio de los heteromorfismos a brindado importantes herramientas que han contribuido al desarrollo de algunos campos como el de la antropología biológica, en la que se considera el posible valor taxonómico que pudieran tener los heteromorfismos para el estudio de la migración de las poblaciones humanas. En medicina se han utilizado para conocer y diferenciar células pertenecientes a diversos sujetos, o bien para determinar el origen parental de algunas anomalías cromosómicas. En biología experimental, se les ha empleado con el objeto

de estudiar su comportamiento durante experimentos de hibridación. Además pueden representar importantes marcadores que quizás sean de utilidad en el desarrollo de los trabajos sobre mapeo cromosómico.

CONCLUSIONES

1.- En esta población fueron detectados, mediante la técnica de tinción Giemsa pH 7, 5 tipos de heteromorfismos de los 6 reportados para una población similar.

2.- El cromosoma tipo 2 (tallos y satélites sencillos), presenta la frecuencia más alta de aparición con un total de 57%, seguida del tipo 1 (cromosomas sin tallos y satélites) con un 29%. El menos frecuente fue el tipo 5 (tallos y satélites dobles), con sólo una frecuencia de 0.72%.

3.- El promedio de heteromorfismos por persona fue de tres pudiendo encontrarse desde 2 hasta 5 variantes por persona.

4.- Los cromosomas 13, 15 y 21, presentan un mayor número de variantes, no así los cromosomas 14 y 21.

5.- Las frecuencias de aparición de las variantes tipos 3, 4 y 5, son similares para todos los cromosomas, en tanto no lo son los tipos 1 y 2.

6.- El análisis de las bandas C dió por resultado la presencia de 4 tipos de heteromorfismos de la heterocromatina constitutiva: Tipo P (tamaño normal), -P (sin bandas), P+ (banda C grande) y P++ (banda C muy grande).

7.- Las bandas C, tipos P+ y P++, alcanzan a cubrir parte de los tallos.

8.- Los heteromorfismos F (tamaño normal), fueron los más comunes con un 62%. Los menos comunes resultaron ser los P++ (bandas C muy grande), con un 5%.

9.- La técnica de bandas NOR permite sostener que la longitud de los tallos no está relacionada directamente con el tamaño de la banda.

10.- No existen diferencias entre sexos en cuanto a los tipos de variación y sus frecuencias de aparición.

RECOMENDACIONES

1.- Continuar estudiando los heteromorfismos cromosómicos de poblaciones similares para aumentar el número de personas analizadas y considerando el análisis convencional, tomando en cuenta que este permite la evaluación de las diversas regiones de los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos.

2.- Estudiar los heteromorfismos de las bandas Q, R y utilizar nuevas técnicas citogenéticas tales como las de enzimas de restricción para evaluar variantes cromosómicas, puesto que podrían incrementar los tipos de heteromorfismos.

3.- En la medida de las posibilidades hacer estudios de diversos grupos étnicos de la región en busca de marcadores poblacionales que nos ayuden a comprender la naturaleza de los heteromorfismos cromosómicos.

4.- Explorar los heteromorfismos de las bandas C de los cromosomas 3 y 4, de los brazos cortos del cromosoma Y, y de la constricción secundaria de los cromosomas 1, 9 y 16, en busca de marcadores poblacionales que puedan complementar a los estudios de los heteromorfismos cromosómicos de los cromosomas acrocéntricos.

BIBLIOGRAFIA

- Al-Nassar, E. K., Palmer, G., Conneally, P. M. and Yu, P. 1981. The genetic structure of the Kuwaiti population II: The distribution of Q-band chromosomal heteromorphisms. *Hum. Genet.* 57:423-427.
- Arakaki, D. T. and Sparkes, R. S. 1963. Microtechnique for culturing leukocytes from whole blood. *Cytogenetics.* 2:57-60
- Ardito, G., Lamberti, L. and Brogger, A. 1978. Satellite associations of human acrocentric chromosomes identified by trypsin treatment at metaphase. *Ann. Hum. Genet., Lond.* 41:455-456.
- Armendares, S., Buentello, L., Cuevas-Sosa, A. and Cantu-Garza, J. M. 1969. Familial extra centric bisatellites chromosome. *Cytogenetics.* 8:177-186.
- Arrighi, F. E., and Hsu, T. C. 1971. Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics.* 10:81-86.
- Babu, A, and Verma, R. S. 1985. Structural and functional aspects of Nucleolar Organizer Regions (NORs) of humans chromosomes. *Int. Rev of Cytol.* vol. 94:151-176.
- Babu, A., Macera, M. J. and Verma, R. S. 1986. Intensity heteromorphisms of human chromosome 15p by DA/DAPI technique. *Hum. Genet.* 73:298-300.
- Babu, A. and Verma, R. S. 1988. Chromosome estructure: euchromatin and heterochromatin. *Int. Rev. of Cytol.*

vol. 108:1-60.

- Balicek, P., Zizka, J. and Skalska, H. 1982. RHG-band polymorphism of short arms of human acrocentric chromosomes and relationships of variant to satellite association. *Hum. Genet.* 62: 237-239.
- Bernstein, R., Wade, A., Rosendorff, J., Wessels, A. and Jenkins, T. 1986. Inverted Y chromosome polymorphism in the gujerati muslim indian population of south Africa. *Hum. Genet.* 74:223-229.
- Bloom, S. E. and Goodpasture, C. 1976. An improved technique for selective silver staining of nucleolar regions in human chromosome. *Hum. Genet.* 34:199-206.
- Bourgeois, C. A. and Hubert, J. 1988. Spatial relationships between the nucleolus and the nuclear envelope: Structural aspects and functional significance. *Int. Rev. of Cytol.* vol. III:1-52.
- Buckton, K. E., O riordan, M. L., Jacobs, P. A., Robinson, J. A., Hill, R. and Evans, H. J. 1976. C and Q-band polymorphisms in the chromosomes of three human population. *Ann. Hum. Genet.* 40:99-111.
- Buhler, E. M. and Malik, N. J. 1988. DA/DAPI heteromorphism in acrocentric chromosomes other than 15. *Cytogenet. Cell. Genet.* 47:104-105.
- Capoa, J., de Felli, M. P. Baldini, A., Rochi, M. Archidiacono, N., Aleixandre, C., Miller, O. J. and Miller, D. A. 1988. Relationship between the number and

- function of human ribosomal genes. *Hum. Genet.* 79:301-304.
- Caspersson, T., Hutten, M., Lindsten, J., Therkelsen, A. J. and Zech, L. 1971. Identification of different Robertsonian translocation in man by quinacrine mustard fluorescence analysis. *Hereditas.* 67:213-219.
- Caspersson, T., Zech, L., Modest, E. J., Foley, G. E., Wagh, and Simonsson, E. 1969. Chemical differentiation with fluorescent alkylating agent in *Vicia faba* metaphase chromosomes. *Exp. Cell Res.* 58:128-140.
- Chambers, D. M. and Priest, J. H. 1986. A population study of nucleolus organizer regions (NOR) in man: Metropolitan Atlanta, Georgia. *Am. J. Hum. Genet.* 39:A108.
- Choo, K. H., Vissel, B., Brown, R., Filby, R. G. and Garle, E. 1988. Homologous alpha satellite sequences on human acrocentric chromosomes with selectivity for chromosomes 13, 14 and 21: Implications for recombination between non-homologues and robertsonian translocations. *Nucleic Acid Research.* 16, (4):1273-1284.
- Cohen, M. M., Shaw, W. M. and MacCluer, W. 1964. Polymorphism of the chromosome Y. *Cytogenetics.* 5:34-52.
- Cooke, P. 1971. Non-Random participation of chromosomes 13, 14 and 15 in acrocentric associations. *Humangenetik.* 13:301-314.
- Craigh-Holmes, A. P. and Shaw, M. W. 1971. Polymorphism of human constitutive Heterocromatin. *Science.* 174:702-704.

- Craigh-Holmes, A. P., Moore, F. B. and Shaw, M. W. 1973. Polymorphisms of human C-band heterochromatin. I. Frequency of variant. *Am. J. Hum. Genet.* 25:181-192.
- Craigh-Holmes, A. P., Moore, F. B. and Shaw, M. W. 1975. Polymorphisms of human C-band heterochromatin II. Family studies with suggestive evidence for somatic crossing over. *Am. J. Hum. Genet.* 27:178-189.
- Dumont, M. C., Bello, M. J., Guichacua, M. R. and Luciani, J. M. 1989. Differential associative behavior of mitotic and meiotic acrocentric chromosomes. *Hum. Genet.* 82:35-39.
- Erdtmann, B. 1982. Aspect of evaluation, significance and evolution of human C-band heteromorphism. *Hum. Genet.* 62:281-294.
- Erdtmann, B., Salzano, F. M. and Mattevi, M. S. 1981. Size variability of the Y chromosome distal C-band in Brazilian indians and Caucasoids. *Ann. Hum. Biol.* 8:415-424.
- Ferraro, M. and Prantera, G. 1988. Human NOR, show correlation between transcriptional activity, DNase sensitivity and hypomethylation. *Cytogenet. Cell Genet.* 47:58-61.
- Funderburk, S. J., Sparkes, R. S., Guthrie, D. and Westlake, J. R. 1976. The significance of minor chromosome variant. V International Congress of Human Genetics. *Excerpta Medica.* 10-15, Oct. México, D. F. p. 125.

- Galperin-Lemaitre, H., Hens, H. L. y Sele, B. 1980. Comparison of acrocentric associations in male and female cell. Relationships to the active nucleolar organizer. Hum. Genet. 54:349-353.
- Geardest, J. P. M. and Pearson, P. L. 1974. Fluorescent chromosome polymorphism frequencies and segregations in Dutch populations. Clinical Genetics, 6:247-257.
- Gigliani, F., De Capoa, A and Rochi, A. 1972. A marker chromosome number 14 with double satellite observed in two generations: An unbalanced chromosome constitutions associated with normal phenotype. Humangenetik. 15:191-195.
- Ghosh, P. K. and Singh, P. 1976. Morphologic variability of human chromosomes: Polymorphism of constitutive heterochromatin. Hum. Genet. 32:149-154.
- Hansson, A. and Mikkelsen, 1978. The origin of the extra chromosome 21 in Down Syndrome. Studies of fluorescent variant and satellite association in 26 informative families. Cytogenet. Cell Genet. 20:194-203.
- Hassold, T., Jacobs, A. P. and Pettay, D. 1987. Analysis of nuclear regions in parents of trisomic spontaneous abortion. Hum. Genet. 76:381-384.
- Hsu, L. Y. F., Benn, A. P., Tannenbaum, L. H., Perlis, T. E. and Carlson, A. D. 1987. Chromosomal polymorphisms of 1, 9, 16, and Y in 4 major ethnic groups: A Large prenatal study. Clinical Med. Genetics --:95-101.

- Ibraimov, A. 1983. Human chromosomal polymorphism. VII. The distribution of chromosomal Q-polymorphic band in different human population. Hum Genet. 63:384-391.
- Ibraimov, A. and Mirrakhimov, M. M. 1982a. Human chromosomal polymorphism. III. Chromosomal Q polymorphism in mongoloids of northerns Asia. Hum. Genet. 62:252-257.
- Ibraimov, A. and Mirrakhimov, M. M. 1982b. Human chromosomal polymorphism. IV. Chromosomal Q polymorphism in russians living in Kirghizia. Hum. Genet. 62:258-260.
- Ibraimov, A. and Mirrakhimov, M. M. 1982c. Human chromosomal polymorphism. V. Chromosomal Q polymorphism in African populations. Hum. Genet. 62:261-265.
- Ibraimov, A. and Mirrakhimov, M. M. 1983a. Human chromosomal polymorphism. VI. Chromosomal Q polymorphism in Turkmen of the Kara-Kum desert of central Asia. Hum. Genet. 63:380-383.
- Ibraimov, A. I., Mirrakhimov, M. M., Nazarenko, S. A., Axenrod, E. L. and Akbanova, G. A. 1982a. Human chromosomal polymorphism. I. Chromosomal Q polymorphism in mongoloids populations of central Asia. Hum. Genet. 60:1-7.
- Ibraimov, A. I., Mirrakhimov, M. M., Nazarenko, S. A., Axenrod, E. L. and Akbanova, G. A. 1982b. Human chromosomal polymorphism. II. Chromosomal C polymorphism in mongoloids populations of central Asia. Hum. Genet 60:8-9.

- Ibraimov, A. and Mirrakhimov, M. M. and Axenrod, E. I. 1986a. Human chromosomal polymorphism. VIII. Chromosomal Q polymorphism in the Yakut of Eastern Siberia. Hum. Genet. 73:147-150.
- Ibraimov, A. Mirrakhimov, M. M., Axenrod, E. I. and Kurmanova, G. U. 1986b. Human chromosomal polymorphism. IX. Further data on the possible selective value of chromosomal Q-heterochromatin material. Hum. Genet. 73:151-156.
- ISNC. 1985. An International System for Human Cytogenetics Nomenclature. 1985. Birth Defect: Original Article Series. 21(1):
- Jackson-Cook, C. K., Flannery, D. B., Corey, L. A., Nance, W. E. and Brown, J. A. 1985. Nucleolar Organizer Regions variants as risk factor for Down Syndrome. Am. J. Hum. Genet. 37:1049-1061.
- Jacobs, A. P., Mayer, M. and Norton, N. E. 1976. Acrocentric chromosome associations in man. Am. J. Hum. Genet. 28:567-576.
- Jones, K. W., Prosser, J., Corneo, G., Ginelli, E. and Bobrow, M. 1973. Satellite DNA, constitutive heterochromatin, and evolution, Symposia Medica Haechst. 6 Modern aspect of cytogenetics. Constitutive Heterochromatin in Man. p. 44-60.
- Lau, Y.F., Wertelecki, W., Pfeiffer, R. A. and Arrighi, F. F. 1979. Cytological analyses of 14p+ variants by means

- of N-banding and combination of silver staining and chromosome bandings. *Hum. Genet.* 46:75-82.
- Lin, M. S., Zhang, A. L., Wilson, M. G. and Fujimoto, P. 1988. DA/DAPI-fluorescent heteromorphism of human Y chromosome. *Hum. Genet.* 79:36-38.
- Lubs, H. A. and Ruddle, F. H. 1971. Chromosome polymorphism in American negro and white population. *Nature.* 233:134-136.
- Lubs, H. A., Kimberling, W. J. Hechts, F., Patil, S. R., Brown, J., Gerald, P. and Summitt, R. L. 1977. Racial differences in the frequency of D and C chromosomal heteromorphism. *Nature.* 268:631-633.
- Márquez, B. C. 1982a. Inducción de bandas G en cromosomas humanos con sol. Giemsa pH elevado. VII Congreso Nacional de Genética Humana. 1982a. Sep. 29-2 Oct. U. A. Z., Zac., Zac.
- Márquez, B. C. 1982b. Evidencia de un polimorfismo en cromosomas acrocéntricos humanos. Segundo Coloquio de Antropología Física Juan Comas. Nov. 8-12, Instituto de Investigaciones Antropológicas, UNAM México, D. F.
- Márquez, B. C. 1984. Cromosomas acrocéntricos Humanos: Polimorfismos y frecuencias de aparición. III Coloquio de Antropología Física Juan Comas. Oct. 22-26. Instituto de Antropología. UNAM México, D. F.
- Márquez, B. C. 1985. Un método de evaluación de las variantes de los cromosomas acrocéntricos. X Congreso Nacional de

- genética Humana, Nov. 1-16. Oaxaca, Oax. p. 80.
- Martin-Lucas, M. A., Perez-Castillo, A. and Abrisqueta, J. A. 1986. Infertility associated with two accessory bisatellited chromosomes. *Hum. Genet.* 73:133-136.
- Matsui, S. I. and Sasaki, M. 1973. Differential staining of nucleolus organizer in mammalian chromosomes. *Nature* 246:148-150.
- McKenzie, W. H. and Lubs, H. H. 1975. Human Q and C chromosomal variations: Distribution and incidence. *Cytogenet. Cell Genet.* 14:97-115.
- Mikelssar, A. V. and Ilus, T. 1979. Populational polymorphisms in silver staining of nucleolus organizer regions (NORs) in human acrocentric chromosomes. *Hum. Genet.* 51:281-285.
- Mikkelsen, M., Poulsen, H., Brinsted, J and Lange, A. 1980. Non-disjunction in trisomy 21: Study of chromosomal heteromorphism in 110 families. *Ann. Hum. Genet.* 44:16-28.
- Miller, D. A., Tantravahi, R., Dev. V. G., and Miller, D. J. 1977. Frequency of satellite association of human chromosome. Is correlation with amount of Ag. staining of nucleolus organizer regions. *Am. J. Hum. Genet.* 29:490-502.
- Miller, D. A., Miller, D. J. Tantravahi, R. and Dev, V. G. 1978. Nucleolus organizer activity and the origin of robertsonian translocations. *Cytogenet. Cell Genet.*

20:40-50.

- Oka, S., Nakagome, Y., Masunaga, E. and Igarashi, Y. 1980. A new approach in the evaluation of chromosome variant in man. III. Pairs with established Q or C variable sites. *Hum. Genet.* 55:327-331.
- Olsen, S. B., Magenis, R. E. and Lovrien, E.W. 1986. Human chromosome variation: The discriminatory power of Q-band heteromorphism (variant) analysis in distinguishing between individuals, with specific application to cases of questionable paternity. *Am. J. Hum. Genet.* 38:235-252.
- Pearson, F. L., Geardest, J. P. M. and Van der Linden, A. G. J. M. 1973. Human Chromosomal Polymorphism. *Symposia Medica Haechst.* 6, Modern aspect of cytogenetics. Constitutive heterochromatin in man. pp. 200-213.
- Phillips, B. R. 1977. Inheritance of Q and C band polymorphisms. *Canadian J. Hum. Genet. Cytogenet.* 19:405-413.
- Reitalu, J., Bergman, S. and Vadi, H. 1964. Mental and maldevelopment of a girl with abnormal satellited chromosome of group 13-15. *Hereditas.* 51:257-267.
- Salamanca, A. F. y Cárdenas, B. E. 1982. Aspectos genéticos de la población mexicana. Estudios en la población general y en algunas poblaciones especiales. En: Villanueva, M. y Serrano, G. (compiladores). *Estudios de Antropología Biológica. (I Coloquio de Antropología*

- Física Juan Comas). Edit. UNAM, México, D. F.
- Salamanca G. F. y Armendares. S. C. 1974. C-band in human metaphase chromosome treated by barium hydroxide. *Ann. Hum. Genet.* 17:135-141.
- Sand, V. E. 1969. Short arm enlargement in acrocentric chromosome. *Am. Hum. Genet.* 21:293-304.
- Schwarzacher, A. V., Mikelsar, M. and Schnedl, W. 1978. The nature of the Ag-staining of nucleolus organizer regions. *Cytogenet. Cell. Genet.* 20:24-39.
- Sofuni, T., Naruto, J. Awa, A. A. 1979. Quantitative analysis of C band on area measurement. *Jpn. J. Hum. Genet.* 38:35-38.
- Sofuni, T., Tanabe, K. and Awa, A. A. 1980. Chromosome heteromorphism in the japaneses. II. Nucleolus organizer region of variant chromosomes in D and G groups. *Hum. Genet.* 55:265-270.
- Spinner, N. B., Eunpu, D. L., Schmickel, R. D., Zackai, E. H., McEldrew, D., Bunin, G. R. McDermid, H. and Emanuel, B. S. 1989. The role of cytologic NOR variants in the etiology of trisomy 21. *Am. J. Hum. Genet.* 44:631-638.
- Stetten, G., Sroka, B., Schmidt, M., Axelman, J and Migeon, R. B. 1986. Translocation of nucleolus organizer regions to the human X chromosome. *Am. J. Hum. Genet.* 39:245-252.
- Therkelsen, A. J. 1964. Enlarged short arm of a small acrocentric chromosome in grandfather, mother and

- childs, the latter with Down's Syndrome. *Cytogenetics*, 3:441-451.
- Vagner-Capodano, A. M., Hartung, M. and Sthal, A. 1987. Nucleolus, nucleolar chromosomes and nucleolus-associated chromatin from diplotene to dictyotene in the human oocyte. *Hum. Genet.* 75:140-146.
- Verma, R. S. and Dosik, H. 1980. Human chromosomal heteromorphisms: Nature and clinical significance. *Int. Rev. of Cytol.* Vol. 62:361-383.
- Verma, R. S. and Dosik, H. 1981. Human chromosomal heteromorphism in American black V. Racial differences in the size variation of the short arm of acrocentric chromosomes. *Experientia* 37:241-243.
- Verma, R. S. and Dosik, H. 1988. Structural organization of the heterochromatin in the human genome. *Int. Rev. of Cytol.* Supplement 17:685-703.
- Verma, R. S. and Babu, A. 1989. Human Chromosomal. Manual of Basic Techniques. Pergamon Press. 240 pp.
- Wachtler, F. and Musil, R. 1989. On structure and polymorphism of the human chromosome 15. *Hum. Genet.* 56:115-118.
- Wall, W. J. and Butler, L. J. 1989. Classification of Y chromosome polymorphisms by DNA content and C-banding. *Chromosome*. 97:296-300.
- Wang, H. C. and Fedoroff, S. 1972. Banding in human chromosomes treated with trypsin. *Nature New Biol.* 235:

52-54.

- Warburton, D., Atwood, K. C. and Handerson, A. S. 1977. Variation in the number for rRNA among human chromosome acrocentric: correlation with frequency of satellite associations. *Cytogenet and Cell. Genet.* 17:221-230.
- Yamada, K. and Hasegawa, T. 1978. Types and frequencies of Q variant chromosomes in a Japanese population. *Hum. Genet.* 44:89-98.
- Zakharov, A. F., Davudov, A. Z., Benjush and Egolina, N. A. 1982. Polymorphisms of Ag-stained nucleolar organizer regions in man. *Hum. Genet.* 60:334-339.