

JULIO 1991 B

84450243

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ESTABLECIMIENTO DE UN PROCEDIMIENTO CUANTITATIVO DE
MEDICIÓN DE HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA EN
CROMOSOMAS 1, 9 Y 16

EVALUACIÓN DE SU EFECTIVIDAD EN EL ANÁLISIS
DEL ORIGEN PARENTAL DE CROMOSOMAS MARCADORES

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

JOSE MANUEL RODRIGUEZ DOMINGUEZ

GUADALAJARA, JALISCO, MEXICO
JULIO 1993



Este trabajo fue realizado en el Area de Citogenética del
Laboratorio de Genética Humana, Facultad de Medicina,
Universidad de Guadalajara

M. en C. Alfredo Corona Rivera.
Director de Tesis

Piensa y Trabaja

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme llegar al final de mi carrera profesional.

A mis padres: Olimpia y Manuel por su apoyo y ayuda a cada momento de mi vida.

A Alfredo C.R. por su excelente dirección en ésta Tesis y por brindarme su apoyo y amistad.

A Teresa G.C. por su gran ayuda en la realización de éste trabajo.

A David A.H. por ser el principal colaborador en la realización de ésta tesis.

Al Dr. Enrique C.R. por su valiosa ayuda durante la realización de éste estudio.

A Favio C.C. por su ayuda en la edición del documento final.

A José de Jesús H.C. por ser el más fiel ejemplo de la amistad incondicional.

A mi muy querida Universidad de Guadalajara.

Y a todos los que me animaron y estuvieron conmigo durante la tragedia del 22 de Abril de 1992.

DEDICATORIAS

A Alexia G.B. cuya muerte me indujo a explorar el campo de la investigación biomédica.

A mis padres: Olimpia y Manuel; y a mis hermanos: Alma y Luis, por su constante apoyo.

A la Fam. Hernández Coronado: Tere, Paty, Alvaro, Pepe y Doña Celia Clementina a quienes considero parte de mi familia.

A mis excompañeros de carrera, a mis amigos y a todos los que se preocupan por mi bienestar, incluso aquellos que sin saberlo fueron y serán personas importantes en mi vida; en especial a: Juan Huegel, Mario y Dora Phillippi, Alfredo C.R., Lucina B. de C., David A.H., Rafael P.R., José de Jesús H.C., Roberto M.G., Martha P.E., Mirella S.L., Gabriela R.P., Olivia T.B. y Verónica A.V.

Y a todos aquellos que no se dejan vencer ante los obstáculos que les presenta la vida, sino que luchan hasta ver realizados sus más preciados anhelos.

INDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Antecedentes.....	3
Planteamiento del problema.....	6
Objetivos.....	7
Hipótesis.....	8
Material y métodos.....	9
Resultados.....	11
Discusión.....	14
Conclusiones.....	16
Bibliografía.....	17

Establecimiento de un procedimiento cuantitativo de medición de heterocromatina constitutiva en cromosomas 1, 9 y 16. Evaluación de su efectividad en el análisis del origen parental de cromosomas marcadores.

RESUMEN

Los estudios sobre polimorfismos de heterocromatina constitutiva (HC) se han orientado a diversos aspectos tales como asociación con patologías o para establecer el origen del cromosoma extra en trisomía 21, siendo poco usuales en el establecimiento de origen parental de cromosomas 1, 9 y 16. Además, la mayoría de éstos estudios han sido cualitativos. En el presente trabajo se pretendió establecer un procedimiento cuantitativo de medición de HC en cromosomas 1, 9 y 16. Se evaluó estableciendo origen parental de dichos cromosomas y se comparó con los métodos cualitativos habituales así como trabajos similares.

Como resultado se encontró un porcentaje de informatividad mayor en el método propuesto que en los métodos cualitativos y similar al reportado para cromosomas acrocéntricos. Respecto a los factores técnicos, se determinó que el bandeo CBG es más resolutivo que el bandeo GTG; además, el uso de índices en las mediciones permite obtener una menor posibilidad de error sobre proyecciones de diapositivas, las cuales además de ser prácticas y económicas, facilitan la medición.

Son discutidas las comparaciones con los diferentes métodos cuantitativos.

INTRODUCCION

La información genética en los eucariontes se encuentra contenida en los cromosomas, los cuales presentan dos tipos de cromatina: eucromatina y heterocromatina. La heterocromatina a su vez puede ser: facultativa y constitutiva.

El estudio de polimorfismos en la heterocromatina constitutiva se ha orientado a aspectos tales como: asociación con patologías o como marcadores para establecer origen del cromosoma extra en trisomía 21, entre otros.

Los métodos de medición de la heterocromatina constitutiva han sido en su mayoría cualitativos, los métodos cuantitativos establecidos son pocos, y casi no se han orientado a establecer origen paterno o materno, por lo que, el presente trabajo pretende establecer un método cuantitativo de medición de heterocromatina constitutiva y determinar su eficiencia para establecer origen paterno o materno de cromosomas 1, 9 y 16 al contrastarlo con los métodos cualitativos habituales.

ANTECEDENTES

La cromatina, término citológico referido a la sustancia que compone el núcleo interfásico de eucariontes, se aplica también, en estado compactado al cromosoma mitótico o meiótico. Su principal componente es el ADN (15-20%), asociado a ARN (10-15%) y proteínas (10-15%) En conjunto forman un complejo estructural y funcional en el núcleo interfásico para la replicación, transcripción, regulación y reparación de ADN, síntesis de ribosomas y distribución equitativa de sí misma en la división celular. La unidad estructural fundamental repetitiva, la constituye el nucleosoma formado cada 200 pares de bases aproximadamente, de las cuales 146 de ellas rodean con casi dos vueltas un octámero proteico (core) de histonas $2H_2A$, $2H_2B$, $2H_3$ y $2H_4$ (1, 2, 3).

Durante el ciclo celular la cromatina presenta ciclos de compactación previos a la división celular en donde la longitud total del ADN se reduce 7 veces al transformar una molécula de 20 Å de diámetro a una secuencia de nucleosomas de 10 nm de diámetro, denominado nivel I de compactación (1,2,3). Durante la fase de G2 se continúa la compactación con un enrollamiento helicoidal de los nucleosomas formando una fibra de 30 nm (nivel II), una supercompactación de dicha fibra (nivel III), hasta el estado final de cromosoma (nivel IV) con un diámetro de 0.6 µm por cromátida y habiéndose reducido la longitud de la hebra de ADN, alrededor de 25 veces en total (3).

Pero no toda la cromatina se comporta igual durante el ciclo celular, existen además diferencias en composición y función que distinguen dos tipos: la eucromatina y la heterocromatina.

La eucromatina es aquella que presenta una tinción poco intensa, es decir, heteropicnosis negativa y por lo tanto está descompactada en interfase, además de contener genes funcionales; mientras que la heterocromatina es aquella que se tiñe intensamente en interfase reflejando heteropicnosis positiva y aloclicia debido a su estado compactado en interfase, además no posee genes funcionales o activados (1,2).

La heterocromatina, a su vez, puede ser:

a) Facultativa. - Sólo se condensa en ciertos tipos celulares o en momentos especiales del desarrollo, lo que en humano corresponde al cromosoma X inactivo en la mujer.

b) Constitutiva. - Aparece condensada en todos los tipos celulares de forma constante, se hereda y consiste de regiones particulares que no se expresan. Contiene principalmente secuencias muy cortas de ADN altamente repetitivas (ADN satélite) (1). En los cromosomas, de plantas y animales, los segmentos heterocromáticos tienden a localizarse en los centrómeros, en la región pericentromérica, en los telómeros, en la vecindad de los organizadores nucleolares y en satélites de acrocéntricos (2).

En el humano, los cromosomas 1, 9 y 16 son los autosomas que presentan la mayor cantidad de HC en las regiones proximales de brazos largos (q) (4), al igual que el cromosoma Y sólo que en la porción distal de q (5). En cuanto a los cromosomas acrocéntricos de los grupos D (13,14 y 15) y G (21 y 22), poseen HC en satélites. Además está presente en los centrómeros y telómeros de todos los cromosomas (2).

El estudio de la HC en humano se ha orientado a tres aspectos:

1.-Asociación con patologías:

a) Síndrome ICF: término propuesto para un conjunto de anomalías citogenéticas y faciales que engloban: inestabilidad de la heterocromatina centromérica de los cromosomas 1, 9 y 16 que consiste en múltiples anomalías tales como fragilidad de las regiones centroméricas, así como varios grados de alargamiento que van hasta la fractura de la heterocromatina centromérica del cromosoma 16, además de que el brazo largo de dicho cromosoma es suprimido en algunas células y duplicado en otras, formando una configuración multirradial, asociaciones entre regiones centroméricas de cromosomas homólogos y no homólogos, y células con cromosomas despiralizados asociado a

inmunodeficiencia, consecuente infección viral y anomalías faciales, en individuos genéticamente predispuestos (6,7).

b) cáncer: los polimorfismos de heterocromatina en bandas C consistentes en variantes en el tamaño de los segmentos heterocromáticos, la frecuencia de inversiones parciales y el grado de simetría/asimetría entre homólogos, se han asociado con carcinomas de ovario, cérvix y colorectales, así como tumores testiculares, cáncer de mama, tumores del sistema nervioso y leucemia mieloide crónica, entre otros (4,8,10). En contraste, algunos investigadores no encontraron relación entre polimorfismos de HC y cáncer (9).

c) Pérdida fetal: se ha estudiado la interacción entre bandas C de cromosomas 1 y 9 asociadas a una mayor frecuencia de pérdida fetal y a errores en meiosis, sugiriéndose que si se presentan efectos interactivos entre los segmentos heterocromáticos de ambos cromosomas (11).

2.-Asociación con alteraciones citogenéticas:

a) No disyunción (ND) y trisomías: La ND meiótica es el mecanismo etiológico más común de las anomalías citogenéticas humanas (12), de ellas, la trisomía 21 en el Síndrome de Down (SD), es la más común (13). Los polimorfismos de las regiones organizadoras nucleares (NOR) del cromosoma 21 han sido asociadas con la ocurrencia de ND por algunos investigadores (13,14), no así por otros (12,15,16). También se ha asociado la presencia de 9qh+ e inversión pericéntrica de 9qh+ con ND mitótica in vitro, al observar un incremento en el número de células hiperdiploides en cultivos de linfocitos (17).

b) Mosaicos y variantes: mediante un estudio realizado en polimorfismos de HC de cromosomas 1, 9, 16 e Y, se encontró que un 2.35% de los individuos estudiados presentaron mosaico para bandas C; asimismo, el 1.96% de variantes estuvieron presentes en tres niños, pero no en sus padres, debido probablemente a entrecruzamiento desigual (1,18).

3.-Como marcadores: en trisomía 21 para establecer origen del cromosoma extra. Mediante éstos estudios se ha comprobado que el cromosoma extra, en la mayoría de los casos, es de origen materno con ND en Meiosis I (MI) (19-24) cuyo porcentaje llega hasta el 83.6% (16), mientras que con ND en Meiosis II (MII) se reporta un porcentaje de 3% a 10.9% (16,19,25).

REF.	No. INDIVIDUOS SD ESTUDIADOS	ORIGEN 21+ DETERMINADO	ORIGEN 21+ NO DETERMINADO	TIPO DE ANALISIS	PROCENTAJE DE INFORMATIVIDAD
18	42	31	11	Citogenético	73.8%
19	10	6	4	Citogenético	60%
20	2	2	0	Citogenético y Molecular	100%
21	5	3	2	Citogenético	60%
		4	1	Molecular	80%
22	37	30	7	Citogenético	81.5%
		23	14	Molecular	62.5%
25	200	193	7	Molecular	96.5%

Cuadro I.- Porcentajes de informatividad reportados para establecer el origen del cromosoma 21 extra.

Sin embargo el establecimiento del origen y ocurrencia de la ND no siempre es posible dado que no todas las familias presentan polimorfismos citogenéticos distintivos, (familias no informativas), el porcentaje de informatividad en diferentes estudios con polimorfismos citogenéticos se muestran en el cuadro I. El uso de polimorfismos moleculares (25,26) o de una combinación de éstos con polimorfismos citogenéticos (21,22,23) aumentan el porcentaje de informatividad hasta un 96.5% (26). Dichos estudios han utilizado solamente métodos citogenéticos de medición cualita-

tivos, tales como: la comparación del tamaño de los segmentos heterocromáticos con la longitud del brazo corto del cromosoma 16 (27) y la clasificación en 5 niveles de intensidad de fluorescencia de tallos y satélites y de tamaño de heterocromatina (28). De los métodos cuantitativos propuestos existen la medición del área, la longitud absoluta y la longitud relativa, y los trabajos que utilizaron algunos de éstos métodos consistieron en lo siguiente: uno de ellos con fines metodológicos básicos, consiste en la medición directa o medición del área utilizando pedazos de papel que corresponden al área del segmento heterocromático y utilizando una balanza de precisión para pesarlos (29). El otro se utilizó aplicado para la medición de heterocromatina de los cromosomas 1 y 9 y su posible asociación con pérdida reproductiva, utilizó índices de dichos cromosomas (11). Un tercer estudio establece origen parental pero con mediciones directas difíciles de extrapolar (36).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los métodos citogenéticos de medición de la HC han sido habitualmente cualitativos (27,28). Existen pocos procedimientos cuantitativos (11,29), sólo uno de ellos utilizado para analizar correlación con patologías genéticas (11), no siendo usuales para establecer origen paterno o materno. La determinación del origen permite definir además cromosomas marcadores para diagnóstico de paternidad o ligamiento así como la relación ya sugerida, de su ocurrencia con patologías genéticas entre otros. La necesidad de considerar alternativas cuantitativas de medición de HC nos conduce a proponer en el presente trabajo un método de medición consistente en la proyección de microfotografías (diapositivas) a una distancia estandarizada y el uso de índices. Para probar su eficacia se pretende, establecer origen paterno o materno de polimorfismos de cromosomas 1, 9, y 16 en familias de la población general y en particular en familias con un hijo SD, así como con los métodos de bandeado CBG y GTG y procedimientos cualitativos habituales.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- I.- Establecer un procedimiento cuantitativo de medición de HC de cromosomas 1, 9 y 16.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.1 Realizar valoraciones cualitativas y cuantitativas sobre proyecciones en preparaciones de bandas CBG y GTG de familias de la población general y familias con un hijo SD.
- 1.2 Establecer el origen paterno o materno de los cromosomas 1, 9 y 16 en las familias de estudio (informatividad).
- 1.3 Contrastar la informatividad de las valoraciones cuantitativas en ambos grupos de familias con las valoraciones cualitativas.
- 1.4 Confrontar la informatividad de las valoraciones cuantitativas entre los métodos de bandeado CBG y GTG.

HIPOTESIS

El procedimiento de medición cuantitativa propuesto utilizado para establecer el origen materno o paterno de cromosomas 1, 9 y 16 resulta más eficiente que los procedimientos cualitativos habituales.

MATERIAL Y METODOS:

FAMILIAS DE ESTUDIO

Dado que el objetivo es metodológico, se consideraron familias normales y SD para aumentar el tamaño de la muestra pero no con fines inferenciales. Se realizó un muestreo de 18 familias de las cuales 10 presentaron un hijo SD, de la Clínica de Asesoramiento Genético del Laboratorio de Genética Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Guadalajara, y 8 provinieron de la población general de familias voluntarias de estudiantes de la misma escuela; sólo se estudiaron en ambos grupos de familias al padre, la madre y un hijo.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

En las familias de estudio se aplicaron las siguientes técnicas:

- 1ª Cultivo de linfocitos de sangre periférica de 72 hrs., estimulados con fitohemaglutinina para obtención de cromosomas con el procedimiento de rutina (30).
- 2ª Bandas GTG con tripsina y giemsa por el método habitual (31).
- 3ª Bandas CBG con hidróxido de bario y giemsa por el método habitual (31).

ANALISIS PARA TODOS LOS METODOS DE VALORACION DE HC

Se seleccionaron alrededor de 10 mitosis por muestra, que fueron de buena calidad, no presentaron cromosomas entrecruzados en exceso y de fácil identificación bajo la supervisión de un técnico con experiencia. Los criterios de calidad se hicieron tomando en cuenta la resolución del bandeado, el grado de compactación y la dispersión de los cromosomas, de los cuales, la resolución del bandeado fué el factor determinante para la calidad de la mitosis. Los criterios de valoración para calidad de mitosis se presentan en el cuadro II.

Por medio de las bandas GTG se realizó el Dx citogenético.

Se seleccionaron de cada método de tinción las 3 mejores mitosis para microfotografía (objetivo 100X, película KODAK Ektacrome ASA 100), en un microscopio Zeiss FOMI 3 y posteriormente proyectadas sobre una pantalla blanca, lisa, con un proyector Kodak Carousel 5200 a una distancia de 2.5 mts. que corresponde aproximadamente 1000 aumentos adicionales.

VALORACION CUALITATIVA: Se analizaron cromosomas 1, 9, 16 e Y en bandas CBG y GTG en 6 proyecciones con criterios modificados del ISCN 1978 (28) en base a 5 categorías:

- 0 Ausente
- 1 Muy pequeño
- 2 Pequeño
- 3 Intermedio
- 4 Grande
- 5 Muy grande

Posteriormente por medio de CBG y a partir de las diapositivas se realizó el análisis cualitativo para la HC de los cromosomas 1, 9, 16 e Y por el método de Patil 1977 (27) que consiste en 5 niveles:

- | | |
|------------------------|---------------------------------------|
| Nivel 1: 0.5 x 16p | 0.5 veces o menos, la longitud de 16p |
| Nivel 2: 0.5 - 1 x 16p | 0.5 a 1 veces la longitud de 16p |
| Nivel 3: 1 - 1.5 x 16p | 1 a 1.5 veces la longitud de 16p |
| Nivel 4: 1.5 - 2 x 16p | 1.5 a 2 veces la longitud de 16p |

Nivel 5: 2 x 16p 2 veces o más la longitud de 16p.

Con respecto a la informatividad cualitativa, los términos se definieron de la siguiente manera:

I.- Informativo: Se diferencian los miembros del par en el hijo y es posible discriminar origen por segregación Mendeliana.

MI.- Medianamente Informativo:

- 1) Se diferencian los miembros del par en el hijo pero con conclusión discordante.
- 2) No se diferencian los miembros del par en el hijo pero es posible determinar origen parcialmente.

NI.- No Informativo: No se diferencian los miembros del par en el hijo y no se discrimina origen.

VALORACION CUANTITATIVA: Sobre las proyecciones se hicieron las mediciones con 2 observadores, utilizando un Vernier con resolución de 0.1 mm tomando como límites de medición el punto medio entre ambos vértices de la HC en un extremo y por el centrómero en el otro; además se midió el brazo q en éstos cromosomas desde el centrómero hasta el telómero.

En cada caso los resultados de las mediciones se convirtieron a valores de índice de heterocromatina (I_{HC}), para lo cual establecimos la siguiente fórmula:

$$I_{HC} = \frac{L_{HC} + L_q}{L_q}$$

I_{HC} Índice de Heterocromatina
 L_{HC} Longitud de Heterocromatina
 L_q Longitud Total del brazo q

El índice en cada individuo fué el promedio total de los índices obtenidos en cada mitosis por cromosoma, distinguiendo además entre los valores obtenidos con bandas GTG y CBG. Dichos índices se utilizaron para establecer segregación de los miembros de pares cromosómicos 1, 9, y 16 en las 18 familias para establecer el porcentaje de informatividad (número de familias en quienes se pudo establecer origen paterno o materno por cromosoma).

ANALISIS ESTADISTICO

Considerando reportes previos (29,32,36) y al analizar nuestros resultados resultó una distribución normal para valores de HC por lo que utilizamos prueba de Z con $n > 100$ para contrastar los índices de heterocromatina entre ambos observadores y ambos métodos de tinción (CBG y GTG).

GTG	CBG
1 - MUY MALA	1 - REGULAR
2 - MALA	2 - BUENA
3 - REGULAR	3 - EXCELENTE
4 - BUENA	
5 - EXCELENTE	

Cuadro II. - Criterios de valoración para calidad de mitosis con ambos métodos de bandeó.

RESULTADOS

Todos los cultivos y cosechas para la obtención de cromosomas se realizaron con estándares de rutina ya establecidos y las tinciones se realizaron con laminillas de 1-2 semanas de edad. Las diapositivas se revelaron en un mismo lugar y las mediciones se realizaron en ciego con calidad 3 para CBG y 4 o 5 para GTG. Las variables consideradas para análisis fueron:

Observadores:

Al contrastar los I_{HC} obtenidos por cada observador por cromosoma solo hubo diferencia significativa con el cromosoma Y ($Z=2.78$ $p<0.05$) por lo que, con excepción del Y, se sumaron ambos grupos de medición.

Métodos de tinción GTG y CBG:

Al contrastar los I_{HC} entre ambos métodos de tinción, se encontró diferencia significativa para cromosoma 1 tanto en familias de la población general ($Z=5.45$ $p<0.05$) como en familias con un hijo SD ($Z=-10.38$ $p<0.05$), para cromosoma 9 también en familias de la población general ($Z=5.88$ $p<0.05$) y en familias con un hijo SD ($Z=-10.38$ $p<0.05$), no encontrándose diferencia significativa para cromosoma 16 en ninguno de los dos grupos de familias, por lo que decidimos separar ambos métodos de tinción para el análisis. Para saber si la diferencia observada en la medición entre ambos métodos de tinción correspondía a que uno de los dos fuera más resolutivo, consideramos los valores de informatividad y de dispersión de los datos, encontrándose que la informatividad fue mayor cuando se utilizaron bandas CBG, a la vez que el valor del error estándar fue mayor en GTG que CBG. Considerando que los I_{HC} con CBG fueron mayores que con GTG, que el cromosoma 9 su HC se observa como una banda G clara y que resultó difícil de definir la HC del Y con GTG, se consideró para el análisis, solo al método CBG.

Informatividad:

En la valoración cuantitativa la informatividad se obtuvo por análisis discriminante asumiendo lo siguiente: una medición directa en cromosomas paternos nos permitiría saber el origen de los cromosomas en el hijo de manera directa teóricamente (factores teóricos), sin embargo existen variables independientes (factores reales) que nos estarían dificultando ésta interpretación directa, para lo cual establecimos el uso de +/- el error estándar ($\pm \delta$) en base a la dispersión mínima de cada valor de medición promedio asumiendo que el traslape de dicho intervalo del cromosoma de un hijo con cualquiera de los cuatro cromosomas paternos resultaran mediciones estadísticamente iguales y discriminando en base a lo anterior la correspondencia del miembro del otro par del hijo. Con respecto a la informatividad en el método cuantitativo propuesto, los términos se definieron de la siguiente manera:

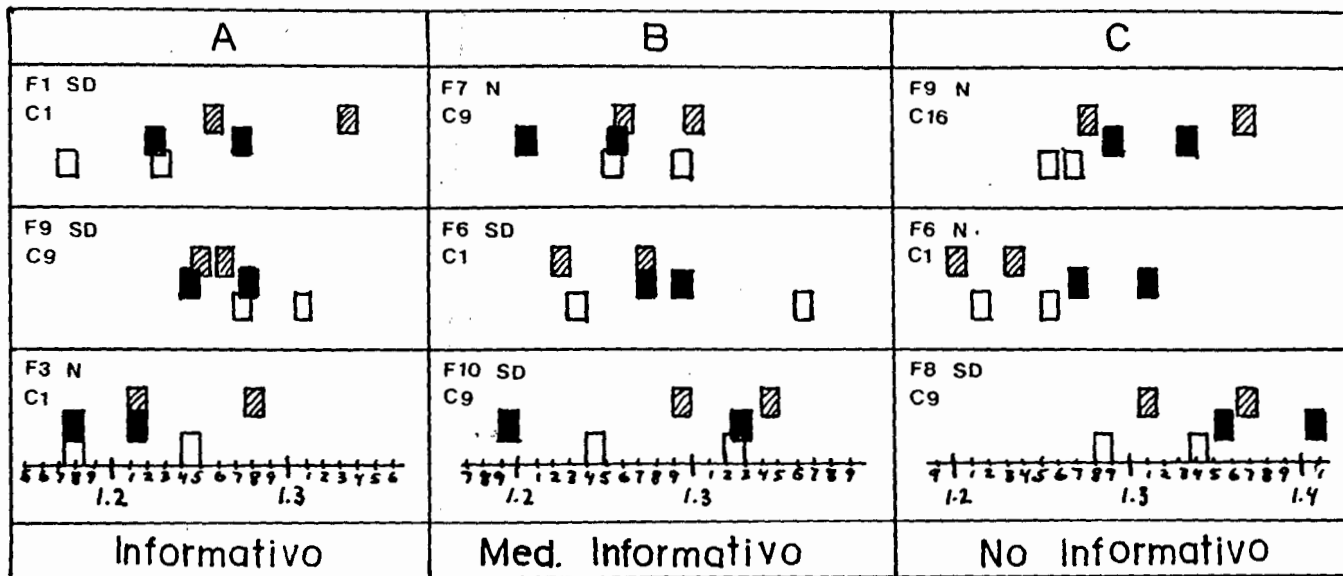
I.- Informativo: Un miembro del par en el hijo corresponde estadísticamente a una de las alternativas paterna o materna y el otro miembro presentó correspondencia estadística o un valor cercano a la alternativa de origen correspondiente (cuadro III columna A).

Mi.-Medianamente Informativo: Un miembro del par en el hijo corresponde estadísticamente a una de las alternativas paterna o materna pero el valor del otro miembro resulta discordante o no discrimina entre las dos alternativas de origen (cuadro III columna B).

Ni.-No Informativo: Ningún miembro del par del hijo corresponde a las dos alternativas de origen (cuadro III columna C).




Respecto a la informatividad cualitativa, en el cuadro IV se muestran algunos ejemplos de categorías de informatividad.

De ésta manera, con el método de tinción CBG en el análisis de informatividad el método de



Cuadro III.- Casos representativos de la muestra estudiada para ejemplificar categorías de informatividad en las valoraciones cuantitativas.

SD SINDROME DOWN
 N NORMAL
 F NUMERO DE FAMILIA
 C NUMERO DE CROMOSOMA

 Cromosoma paterno
 Cromosoma del hijo
 Cromosoma materno

Patil resultó con un porcentaje de informatividad de 18.5% y el método de ISCN resultó con 25.9%, mientras que el método cuantitativo propuesto resultó con un porcentaje de informatividad de 59.2% (cuadro V).

	A	B	C		D
	F5SD C1	F6N C9	F4SD C1	F9N C1	F1N C1
PADRE	3 2	4 3	4 3	2 1	4 3
MADRE	4 3	3 3	4 3	1 1	3 3
HIJO	3 2	4 2	3 3	2 2	3 3
INFORMATIVIDAD	I	MI	MI	MI	NI

CUADRO IV.- Casos representativos de la muestra estudiada para ejemplificar categorías de informatividad en las valoraciones cualitativas.

SD SINDROME DOWN
 N NORMAL
 F NUMERO DE FAMILIA
 C NUMERO DE CROMOSOMA

CROMO-SOMA	INFORMA-TIVIDAD	VALORACION CUALITATIVA		VALORACION CUANTITATIVA
		ISCN	PATIL	PROPUESTA
1	I	5	6	11
	MI	1	3	3
	NI	12	9	4
9	I	6	3	11
	MI	1	3	3
	NI	11	12	4
16	I	3	1	10
	MI	3	1	4
	NI	12	16	4
TOTAL	I	14 (25.9%)	10 (18.5%)	32 (59.2%)
	MI	5 (9.25%)	7 (13.0%)	10 (18.5%)
	NI	35 (64.8%)	37 (68.5%)	12 (22.2%)

CUADRO V.- Porcentajes de informatividad para valoraciones cualitativas y cuantitativas en 18 familias con el método de tinción CBG.

DISCUSION

Respecto a los dos observadores, se presentaron discordancias en las mediciones del cromosoma Y con bandas GTG, concluyendo en la dificultad que representa su medición con dicho método de bandeó. En cuanto a la diferencia encontrada al comparar ambos métodos de tinción, se observó que se debe a que con el método GTG los límites de la región heterocromática no son evidentes sobre todo en cromosomas Y y 9 al compararlo con el método CBG, no así en el cromosoma 1 y 16 (32,33), lo cual apoyamos al no encontrar nosotros diferencia significativa para cromosoma 16 con ambos métodos de tinción.

Respecto a la calidad de la mitosis, se observó que cuando las tres mitosis analizadas por caso eran de buena calidad, no se observó discordancia ni en las tres mediciones ni entre los dos observadores, y tomando en cuenta que el porcentaje de informatividad fué mayor con bandas CBG, consideramos que si la mitosis es de buena calidad, basta para realizar cualquier análisis, con una sola medición hecha por un solo observador como ya fué propuesto por Ford (33) sólo que agregaríamos que se realizara con el método de tinción CBG.

En lo que respecta a las valoraciones cualitativas, con la tinción CBG se observó un porcentaje mayor con el método de ISCN que con el método de Patil; no obstante que Patil propone una clasificación en 5 niveles, se encontraron sólo valoraciones de 1, 2 y 3, por lo que consideramos que es de baja resolución pero útil para precisar polimorfismos de tamaño mayor evidente, mas no para polimorfismos pequeños. Mientras que con el método ISCN, al considerar que la categoría 3 es la cercana al tamaño común, resultó más informativo.

En cuanto a las valoraciones cuantitativas no informativas del método propuesto, se determinó que se pudieran deber a factores biológicos tales como mosaicismo somático (2.35%) o reareglos de novo (1.96%) (18); asumiendo que son 18 familias, corresponderían a no más de una familia, pero como no se detectaron inversiones pericéntricas, consideramos que el mosaicismo prácticamente no influyó. Suponemos entonces que la no informatividad se debió a factores metodológicos reales, o al hecho de que verdaderamente no es posible discriminar los polimorfismos familiares por ser muy similares.

Los métodos que utilizan análisis de polimorfismos citogenéticos en cromosomas acrocéntricos en el establecimiento del origen parental del cromosoma extra en el Síndrome de Down presentan un promedio de 68.7% de informatividad (cuadro I), pudiéndose presentar hasta un 8% de error del origen parental asignado (34), por lo que consideramos que si bien nuestro método no es con acrocéntricos, resultó con una informatividad aceptable. Sin embargo, cuando se utiliza una combinación de éstos polimorfismos citogenéticos con polimorfismos moleculares el porcentaje de informatividad aumenta hasta un 96.5% (cuadro I), lo cual tiene la desventaja de requerir de infraestructura costosa. Los estudios citogenéticos de informatividad se han realizado para cromosoma 21 utilizando sólo análisis cualitativo dado que los cromosomas acrocéntricos presentan una alta variabilidad (35) lo cual no sucede para HC de cromosomas 1, 9, 16 e Y en donde cobra mayor importancia un abordaje cuantitativo. Se han establecido pocos métodos de medición de HC para cromosomas 1, 9, 16 e Y de los cuales sólo uno establece origen parental aunque lo hacen con mediciones directas difíciles de extrapolar y obtienen una informatividad de sólo el 50% (36), mientras que de otros dos, uno compara dos métodos de medición de HC (29) y el otro mide HC de cromosomas 1 y 9 relacionando los polimorfismos con una posible asociación con pérdida reproductiva, no determinándose por tanto, origen parental (11). Este último es el único que utiliza índices de HC aunque consideramos que el contar con el centrómero como referencia única para las dos mediciones requeridas por cromosoma, disminuye la posibilidad de errores en la medición, además de que el uso de diapositivas resulta más práctico, económico y facilita la medición, además, si se contara con un micrómetro de ocular se podrían realizar las mediciones directamente.

Y por último, si bien es cierto que de los métodos cuantitativos de medición de HC, el método de medición del área es más exacto que el de medición de longitud absoluta y el de longitud relativa, no es un método que se utilice en los procedimientos de rutina ya que resulta más complicado y requiere de mayor tiempo (29,32), utilizándose por lo tanto más comúnmente los métodos de medición de la longitud, de los cuales, el método de medición de longitud absoluta al ser menos resolutivo podría ser suficiente para estudios poblacionales (35) mientras que el de longitud relativa se recomendaría para estudios de origen parental.

CONCLUSIONES

PRIMERA

El método de medición cuantitativo propuesto resultó más eficiente que los procedimientos cualitativos de rutina ya que presentó un mayor porcentaje de informatividad en el establecimiento del origen parental de cromosomas 1, 9 y 16, a su vez resultó similar su informatividad a los estudios de origen del cromosoma 21 con diagnóstico citogenético.

SEGUNDA

El bandeó CBG es más resolutorio que el bandeó GTG en la medición de HC.

TERCERA

El uso de índices en la medición de HC además de disminuir el error por compactación cromosómica, permite realizar la medición sobre diapositivas proyectadas a distancias variables.

CUARTA

El uso de diapositivas resulta más práctico, económico y facilita la medición.

QUINTA

Dadas las condiciones técnicas de buena calidad de mitosis y uso de bandas CBG, es suficiente con una sola medición realizada por un solo observador.

BIBLIOGRAFIA

- 1.-Lewin, Benjamin. 1991. Genes IV. Ed. Oxford Cell Press. United States of America. (10-15%) 409, 530-539.
- 2.-De Robertis, E.D.P. y De Robertis, E.M.F. 1987. Biología Celular y Molecular. Ed. "El Ateneo", S.A. Barcelona, España. (10-15%) 333-337.
- 3.-Swanson, Carl P., Merz, Timothy and Young, William J. Cytogenetics: The chromosome in division, inheritance and evolution. 2nd Edition. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, NJ 07632.
- 4.-Kristofferson, U., Bernheim, A., Berger, R., et al. 1989. Constitutional C-band polymorphism in lymphocytes from patients with chronic myeloid leukemia. *Hereditas* 110:145-148
- 5.-Cantú, E.S., Marsh, R.D., et al. 1988. Selective protectoin of specific DNA sequences in the heterochromatin of C-Banded human Y chromosomes. *Am J Hum Genet* 43:948-953.
- 6.-Maraschio, P., Zuffardi, O., et al. 1988. Immunodeficiency, centromeric heterochromatin instability of chromosomes 1,9 and 16, and facial anomalies: the ICF syndrome. *J Med Genet* 25:173-180.
- 7.-Haas, O.A. 1990. Centromeric heterochromatin instability of chromosomes 1,9 and 19 in variable immunodeficiency syndrome - a virus-induced phenomenon? *Hum Genet* 85:244-246.
- 8.-Köpf, I., Islam, M.Q., et al. 1989. Familial occurrence of cancer and heteromorphism of the heterochromatic segment of chromosome 1. *Hereditas* 110:79-83.
- 9.-Kristoffersson, U., Berger, R., Bernheim, A., et al. 1989. No abnormal C-bands polymorphism in lung cancer patients. *Hereditas* 110:201-202.
- 10.-Köpf, I., Strid, K. -G., Islam, M.Q., et al. 1990. Heterochromatin variants in 109 ovarian cancer patients and 192 healthy subjects. *Hereditas* 113:7-16.
- 11.-Ford, J.H., Callen, D.F., et al. 1983. Interactions between C-bands of chromosomes 1 and 9 in recurrent reproductive loss. *Hum Genet* 63:58-62.
- 12.-Schwartz, S., Roulston, D. and Cohen M.M. 1989. Invited editorial: dNORs and meiotic nondisjunction. *Am J Hum Genet* 44:627-630.
- 13.-Robinson, J.A. and Newton, M. 1977. A fluorescence polymorphism associated with Down's Syndrome? *J Med Genet* 14:40-45.
- 14.-Jackson-Cook, C.K., Flannery, D.E., Corey, L.A., et al. 1985. Nucleolar organizer region variants as a risk factor for Down syndrome. *Am J Hum Genet* 37:1049-1061.
- 15.-Spinner, N.B., Eunpu, D.L., et al. 1989. The role of cytologic NOR variants in the etiology of trisomy 21. *Am J Hum Genet* 44:631-638.

- 16.-Jacobs, P.A. and Mayer, M. 1981. The origin of human trisomy: a study of heteromorphisms and satellite associations. *Ann Hum Genet* 45:357-365.
- 17.-Ford, J.H. and Lester, P. 1978. Chromosomal variants and nondisjunction. *Cytogenet Cell Genet* 21:300-303.
- 18.-Simi, S. and Tursi, F. 1982. Polymorphism of human chromosomes 1,9,16,Y: variations, segregation and mosaicism. *Hum Genet* 62:217-220.
- 19.-Magenis, R.E., Overton, K.M., Chamberlin, J., et al. 1977. Parental origin of the extra chromosome in Down's syndrome. *Hum Genet* 37:7-16.
- 20.-Uchida, I.A. and Freeman, V.C.P. 1985. Trisomy 21 Down syndrome. *Hum Genet* 70:246-248.
- 21.-Hamers, A.J.H., Vaes-Peeters, G.P.M., Jongbloed, R.J.E., et al. 1987. On the origin of recurrent trisomy 21: determination using chromosomal and DNA polymorphisms. *Clin Genet* 32:409-413.
- 22.-Stewart, G.D., Hassold, T.J., Berg, A., et al. 1988. Trisomy 21 (Down syndrome): studying nondisjunction and meiotic recombination by using cytogenetic and molecular polymorphisms that span chromosome 21. *Am J Hum Genet* 42:227-236.
- 23.-Bricarelli, F.D., Pierluigi, M., Perroni, L., et al. 1988. High efficiency in the attribution of parental origin of nondisjunction in trisomy 21 by both cytogenetic and molecular polymorphisms. *Hum Genet* 79:124-127.
- 24.-Bricarelli, F.D., Pierluigi, M., Landucci, M., et al. 1989. Parental age and the origin of trisomy 21. *Hum Genet* 82:20-26.
- 25.-Antonarakis, S.E., Kittur, S.D., Metaxotou, C., et al. 1985. Linkage map on chromosome 21q and the association of a DNA haplotype with a propensity to nondisjunction and trisomy 21. *Ann NY Acad Sci.* 450:95-107.
- 26.-Antonarakis, S.E., D.Sc., M.D. and the Down Syndrome Collaborative Group. 1991. Parental origin of the extra chromosome in trisomy 21 as indicated by analysis of DNA polymorphisms. *The New England J of Med* 324(13):872-876.
- 27.-Patil, S.R. and Lubs, H.A. 1977. Classification of qh regions in human chromosomes 1,9 and 16 by C-banding. *Hum. Genet* 38:35-38.
- 28.-ISCN Report of the standing committee on human cytogenetic nomenclature. (ISCN) 1978.
- 29.-Mutchinick, O., Sánchez, F., et al. 1987. Heterochromatin C sizes distribution of chromosomes 1,9,16 and Y in a sample of the Mexican population: comparison of two quantitative methods of measurement. *Rev Invest Clin (Mex)*. 39:123-130.
- 30.-Moorhead, P.S., Nowell, P.C., Mellman, W.J., et al. 1960. Chromosome preparation of leukocytes from human peripheral blood. *Exp Cell Res* 20:613-616.
- 31.-Dutrillaux, B., Couturier, J. 1972. Techniques d'analyses chromosomiques. Monographie annuelle de la Soc. Fr. Biol. Clin. p.5.
- 32.-Erdtman, B. 1982. Aspects of evaluation, significance, and evolution of human C-band heteromorphism. *Hum Genet* 61:281-294.
- 33.-Ford, J.H., Callen, D.F., et al. 1982. Within pair differences of human chromosome 9 C-bands

associated with reproductive loss. *Hum Genet* 61:360-363.

34.-Carothers, A.D. 1987. Down Syndrome and maternal age: the effect of erroneous assignment of parental origin. *Am J Hum Genet* 40:147-150.

35.-Trask B, van den Engh G, Mayall B, Gray JW. 1989. Chromosome heteromorphism quantified by high resolution bivariate flow karyotyping. *Am J Hum Genet* 45:739-752.

36.-Podugolnikova, O.A. and Korostelev, A.P. 1980. The quantitative analysis of polymorphism on human chromosomes 1,9,16 and Y. IV. Heterogeneity of a normal population. *Hum Genet* 54:163-169.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Expediente

Número

Sección

C. JOSÉ MANUEL RODRÍGUEZ DOMÍNGUEZ

P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted, que con esta fecha ha sido aprobado el tema de tesis "ESTABLECIMIENTO DE UN PROCEDIMIENTO CUANTITATIVO DE MEDICIÓN DE HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA EN CROMOSOMAS 1, 9 Y 16. EVALUACIÓN DE SU EFECTIVIDAD EN EL ANÁLISIS DEL ORIGEN PARENTAL DE CROMOSOMAS MARCADORES"- para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo el informamos que ha sido aceptado como director de dicha tesis el M. en C. Alfredo Corona Rivera.

A T E N T A M E N T E

"PIENSA Y TRABAJA"

Guadalajara, Jal., 20 de julio de 1993

EL DIRECTOR

DR. EULOGIO PIMIENTA BARRIOS



FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS

EL SECRETARIO

MA. GEORGINA GUZMAN GODINEZ

EPB/MGGG/cglr.

Al contestar este oficio citese fecha y número

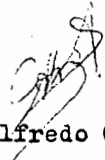
Guadalajara, Jal. 23 de Julio de 1993.

Dr. Eulogio Pimienta Barrios
C. Director de la Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Guadalajara
Presente

Me permito dirigirme a usted con el objeto de informarle que el trabajo de tesis titulado: "Establecimiento de un procedimiento cuantitativo de medición de heterocromatina constitutiva en cromosomas 1, 9 y 16. Evaluación de su efectividad en el análisis del origen parental de cromosomas marcadores"., realizada por el Sr. José Manuel Rodríguez Domínguez pasante de la carrera de Biología, ha sido totalmente revisada, sin que exista el inconveniente de mi parte, como asesor de la misma, para que se lleve a cabo su impresión final.

Sin más por el momento me repito de usted su atento y seguro servidor.

ATENTAMENTE



M. en C. Alfredo Corona Rivera
Director de Tesis