

---

**Implicaciones de los lugares frágiles y las secuencias  
teloméricas intersticiales en la evolución cromosómica  
de los Primates**

---

**Memoria presentada por Aurora Ruiz-Herrera Moreno para optar al  
grado de Doctor en Biología por la Universitat Autònoma de  
Barcelona.**

**Aurora Ruiz-Herrera Moreno  
Junio de 2003**

Las Doctoras Montserrat Garcia Caldés y Montserrat Ponsà Fontanals, catedráticas del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i d'Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFICAN:

Que Aurora Ruiz-Herrera Moreno ha realizado bajo nuestra dirección, en la Unitat de Biologia Cel·lular de la Universitat Autònoma de Barcelona, el trabajo de Tesis Doctoral titulado:

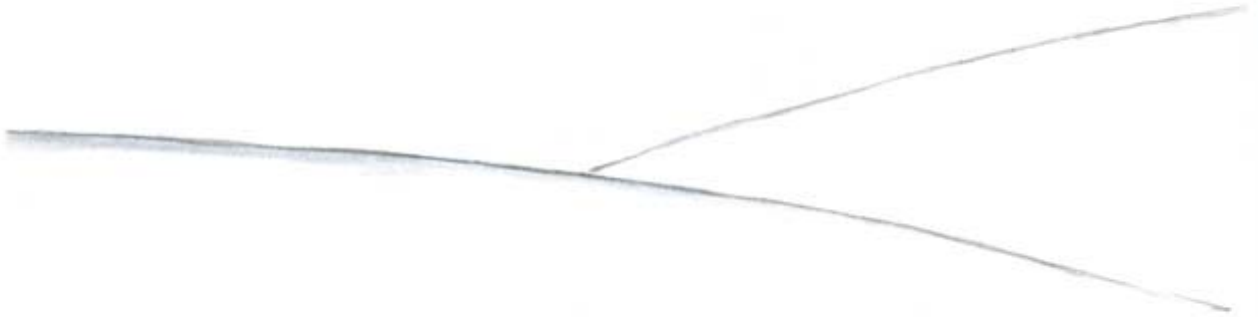
**Implicaciones de los lugares frágiles y las secuencias teloméricas intersticiales en la evolución cromosómica de los Primates**

Y para que así conste, firmamos el presente certificado.

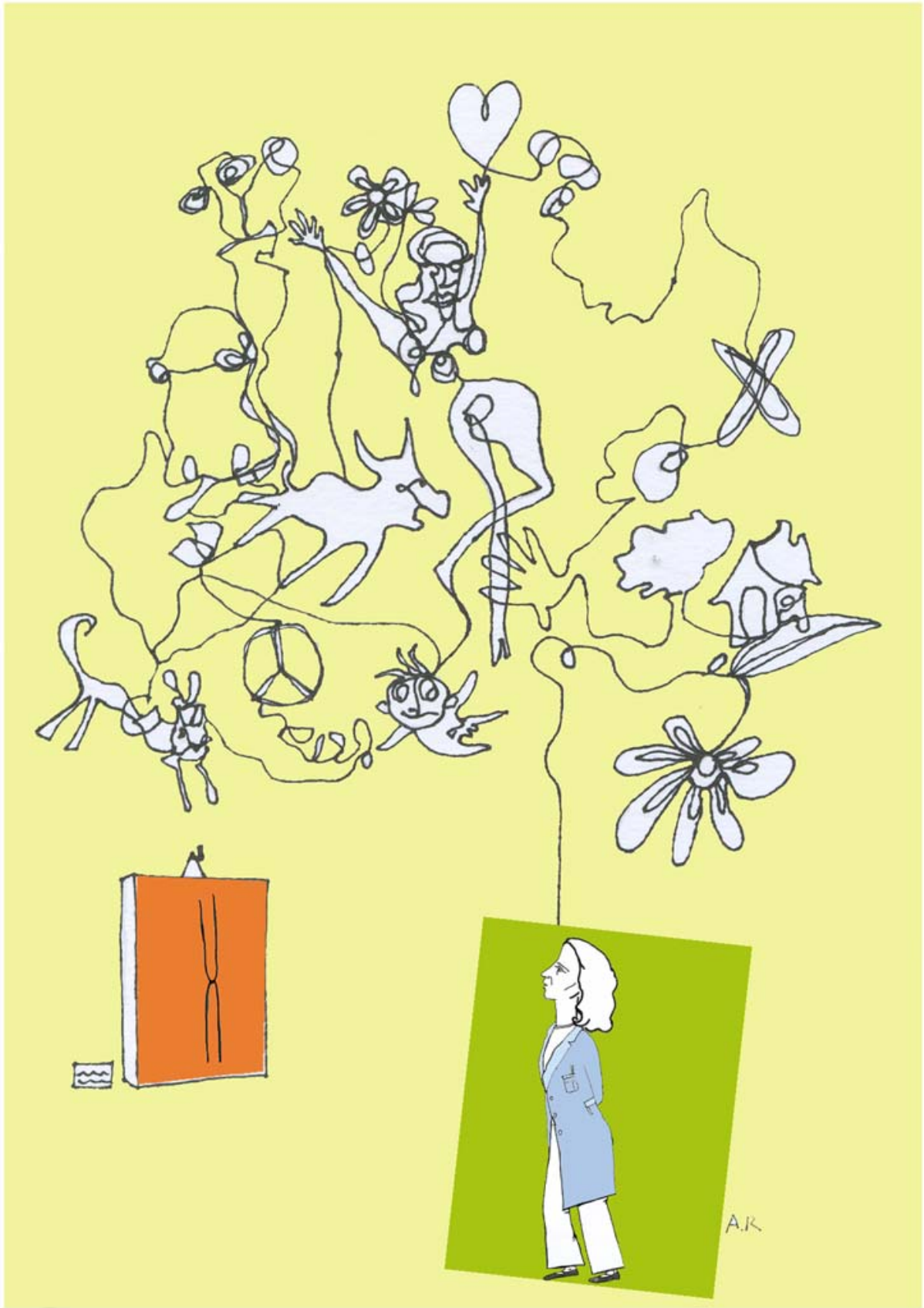
Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Junio de 2003.

Dra. Montserrat Garcia Caldés

Dra. Montserrat Ponsà Fontanals



*“L'essenziale è invisibile agli occhi”  
Il Piccolo Principe  
Antoine de Saint-Exupéry*



*A mis padres,  
porque todo lo que soy se lo debo a ellos...*

*А Ibo.*

<b>CAPÍTULO 1: Introducción</b>	<b>1</b>
1 Estudios sobre la evolución cromosómica de los Primates	1
1.1 Aplicación de las técnicas de citogenética clásica	1
1.2 Aplicación de las técnicas de hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	4
1.2.1 Tipos de sondas utilizadas en los estudios de genómica comparada	4
1.2.1.1 Sondas de pintado cromosómico	5
1.2.1.1.1 Citometría de flujo activada por fluorescencia (FACHS: <i>Fluorescence Activated Chromosome Sorting</i> )	5
1.2.1.1.2 Microdissección cromosómica	6
1.2.1.2 Sondas sub-cromosómicas o específicas de banda	7
1.2.1.3 Segmentos de ADN clonados	7
1.2.2 Aplicación de las técnicas de hibridación <i>in situ</i> a la genómica comparada (Zoo-FISH)	8
1.2.2.1 Zoo-FISH unidireccional vs. Zoo-FISH recíproco	8
1.2.2.2 Hibridación <i>in situ</i> multicolor	11
1.3 Características cariológicas de los Primates	11
1.3.1 Infraorden Catarrhini	11
1.3.2 Infraorden Platyrrhini	13
1.4 Cariotipo ancestral de los Primates	14
1.4.1 Cariotipo ancestral de los Catarrhini	15
1.4.2 Cariotipo ancestral de los Platyrrhini	17
2 Lugares frágiles	18
2.1 Antecedentes históricos de los estudios citogenéticos	18
2.2 Definición y clasificación	19
2.3 Mecanismos de inducción	20
2.4 Mecanismos de expresión	21

2.4.1	Estructura molecular de los lugares frágiles raros	22
2.4.2	Estructura molecular de los lugares frágiles comunes	22
2.5	Significado biológico	23
2.5.1	Lugares frágiles y cáncer	23
2.5.2	Lugares frágiles y evolución cromosómica	25
3	Secuencias teloméricas	26
3.1	Definición y estructura de los telómeros	26
3.2	Funciones de los telómeros	26
3.3	Secuencias teloméricas intersticiales	27
3.3.1	Hipótesis sobre el origen de las secuencias teloméricas intersticiales	28
3.3.1.1	Reparación de roturas de doble hélice por la enzima telomerasa	29
3.3.1.2	Mecanismos de amplificación génica o recombinación desigual	29
3.3.1.3	Reorganizaciones intracromosómicas	30
3.3.1.4	Cicatrices evolutivas	30
3.3.2	Secuencias teloméricas intersticiales e inestabilidad cromosómica	30
<b>CAPÍTULO 2: Objetivos</b>		33
<b>CAPÍTULO 3: Material y Métodos</b>		35
1	Material biológico	35
2	Métodos	35
2.1	Obtención de cromosomas metafásicos	35
2.1.1	Cultivo de linfocitos de sangre periférica	36
2.1.2	Líneas celulares	38
2.1.2.1	Línea celular fibroblástica de <i>Macaca fascicularis</i>	39
2.1.2.2	Línea celular linfoblastoide de <i>Macaca arctoides</i>	40
2.1.3	Obtención de preparaciones cromosómicas	40
2.2	Técnicas de tinción e identificación cromosómica	41
2.2.1	Tinción uniforme	41
2.2.2	Bandeo G	42
2.2.3	Bandeo C	43
2.2.4	Bandeo secuencial Uniforme-G-C	43
2.3	Inducción y análisis de lugares frágiles	44
2.3.1	Inducción de los lugares frágiles	44
2.3.2	Análisis de los lugares frágiles	45
2.3.2.1	Selección de las metafases	45
2.3.2.2	Criterio de valoración de las anomalías cromosómicas	46
2.3.2.3	Análisis estadístico	46
2.4	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	46
2.4.1	Pintado cromosómico comparativo (Zoo-FISH)	48
2.4.2	Sonda telomérica	52
2.4.3	Sondas específicas de bandas: BACs y YACs	55
<b>CAPÍTULO 4: Resultados</b>		57
Trabajo 1		
	<i>Chromosomal homologies between humans and <u>Cebus apella</u> chromosomes revealed by Zoo-FISH. Mammalian Genome (2000) 11:399-401</i>	59
Trabajo 2		



	<i>Fragile sites in humans and <u>Macaca fascicularis</u> chromosomes are breakpoints in chromosome evolution. Chromosome Research (2002) 10:33-44</i>	65
Trabajo 3	<i>Distribution of intrachromosomal telomeric sequences (ITS) on <u>Macaca fascicularis</u> chromosomes and their implication for chromosome evolution. Human Genetics (2002) 110:578-586</i>	79
Trabajo 4	<i>Implication of fragile sites and intrachromosomal telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences in Primate evolution. Genome Research (enviado)</i>	91
Trabajo 5	<i>Molecular cytogenetic conservation of aphidicolin-induced fragile sites in Papionini species and man. (en preparación)</i>	123
<b>CAPÍTULO 5: Discusión</b>		139
1	Homologías y reorganizaciones cromosómicas	139
1.1	Reorganizaciones cromosómicas	141
1.1.1	Tribu Papionini	141
1.1.2	Género <i>Cebus</i>	142
1.2	Bandas cromosómicas implicadas en reorganizaciones cromosómicas evolutivas	143
2	Implicaciones evolutivas de los lugares frágiles y las secuencias teloméricas intersticiales	147
2.1	Conservación en la localización de los lugares frágiles en los cariotipos de los Primates y sus implicaciones evolutivas	147
2.1.1	Lugares frágiles conservados en los Primates	148
2.1.2	Lugares frágiles y puntos de rotura evolutivos	150
2.2	Distribución de las secuencias teloméricas intersticiales en los cariotipos de los Primates y sus implicaciones evolutivas	151
2.3	Relación entre los lugares frágiles, las secuencias teloméricas intersticiales y los puntos de rotura evolutivos	152
2.3.1	Cromosoma humano 1 (HSA1)	153
2.3.2	Cromosoma humano 2 (HSA2)	155
2.3.3	Cromosoma humano 4 (HSA4)	156
2.3.4	Cromosoma humano 5 (HSA5)	157
2.3.5	Cromosoma humano 7 (HSA7)	159
2.3.6	Cromosoma humano 8 (HSA8)	160
2.3.7	Cromosoma humano 11 (HSA11)	161
2.3.8	Cromosoma humano 13 (HSA13)	162
2.3.9	Cromosoma humano 17 (HSA17)	163
2.3.10	Cromosoma humano 18 (HSA18)	164
2.3.11	Cromosoma humano 20 (HSA20)	165
2.3.12	Consideraciones generales	166
<b>CAPÍTULO 6: Conclusiones</b>		167
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>		171

<b>ANEXOS</b>		191
1	<i>Macaca fascicularis</i>	193
2	<i>Mandrillus sphinx</i>	194
3	<i>Macaca arctoides</i>	195
4	<i>Cebus nigrivittatus</i>	196
5	<i>Cebus apella</i>	197



### **1 Estudios sobre la evolución cromosómica de los Primates.**

La estrategia utilizada para poder establecer las homologías entre los cromosomas de diferentes especies, determinar las reorganizaciones cromosómicas evolutivas que explicarían dichas homologías y establecer los puntos de rotura implicados en ellas, es la caracterización citogenética de las especies. A través del análisis citogenético comparativo es posible estudiar el proceso evolutivo de los cambios genómicos que se han producido dentro de un determinado grupo taxonómico, como es el caso de los Primates. Al mismo tiempo, permite establecer la naturaleza de estos cambios (tipos de reorganizaciones y bandas cromosómicas implicadas), así como determinar la sucesión de eventos y su posible dirección.

#### ***1.1 Aplicación de las técnicas de citogenética clásica.***

El estudio de los cromosomas de los Primates y su evolución siempre ha ido estrechamente ligado al desarrollo de las técnicas de citogenética que permitieron descubrir y estudiar los cromosomas humanos. La resolución definitiva del número de cromosomas humanos, en la segunda mitad de los años 50, estimuló los estudios citogenéticos experimentales y descriptivos en

---

\* Par cromosómico nº1 de *Cebus nigrivittatus*

diferentes especies de mamíferos y, especialmente, en los Primates. Aunque la evolución de este grupo de mamíferos tan cercano al hombre ha sido objeto de gran interés biológico desde siglos atrás, los estudios cromosómicos comparativos no fueron posibles hasta el completo desarrollo de las técnicas que permiten determinar las interrelaciones entre sus cromosomas.

Hasta el descubrimiento del efecto de las soluciones hipotónicas sobre las preparaciones cromosómicas a principios de los años 50, la técnica más empleada en los estudios citogenéticos era la técnica de *squash* (aplastamiento de células en división) y el único tejido disponible para el estudio de células en metafase eran las biopsias testiculares (Hsu, 1979). Durante esta primera etapa de la historia de la citogenética, las técnicas de cultivo de células sanguíneas o medulares no estaban suficientemente desarrolladas para obtener resultados concluyentes. Aunque las técnicas disponibles eran limitadas, durante este período comenzó la discutida carrera por describir el número de cromosomas humanos y se inició la descripción de cromosomas de diferentes especies de vertebrados. Aparecieron los primeros estudios citogenéticos descriptivos en Primates, limitándose al recuento del número de cromosomas. Painter (1922) estableció el cariotipo de un espécimen de *Cebus sp.* ( $2n=54$ ) y Yeager y col., (1940) describieron por primera vez el número diploide de *Pan troglodytes* ( $2n=48$ ) a través de preparaciones de cromosomas meióticos.

Con la mejora de los métodos para la obtención de cromosomas metafásicos (perfeccionamiento de las metodologías de cultivos celulares y de la técnica de *squash*, el tratamiento con colchicina y el pre-tratamiento hipotónico), se estableció definitivamente el número de cromosomas humanos en 46 (Tjio y Levan, 1956; Ford y Hamerton, 1956). Esta mejora metodológica permitió el estudio y la caracterización de los cariotipos de otras especies de mamíferos, y de los Primates en particular, apareciendo los primeros trabajos comparativos entre diferentes especies de Primates basados en estudios morfométricos con técnicas de tinción uniforme (Darlington y Haque, 1955; Chu y Giles, 1957; Bender y Mettler, 1958; Chu y Bender, 1961; Chiarelli, 1962; Chiarelli y Barberis, 1966). Estos primeros estudios comparativos ya comenzaron a resaltar la gran variabilidad en el número diploide entre los Primates estudiados, al mismo tiempo que sugirieron algunos de los mecanismos involucrados en el proceso de evolución cromosómica, como son las fusiones céntricas e inversiones pericéntricas.

A principios de los años 70 se inició el desarrollo de las técnicas de bandeo cromosómico que permitieron la identificación y diferenciación longitudinal de los cromosomas (bandas G, Q, R), así como la localización de la heterocromatina constitutiva y de las regiones organizadoras nucleolares (bandas C y bandas NOR respectivamente). La primera aplicación de las técnicas de bandeo en

sentido estricto fue la realizada por Caspersson y col., (1970) utilizando la mostaza de quinacrina como técnica de identificación cromosómica.

Con los primeros trabajos de comparación de patrón de bandas R y bandas G de los cariotipos de Primates de la familia Hominidae (*Pongo pygmaeus*, *Pan paniscus*, *Pan troglodytes*, *Gorilla gorilla* y *Homo sapiens*), comenzaron los estudios de filogenia de los cromosomas humanos (Grouchy y col., 1972; Turleau y Grouchy, 1972; Egozcue y col., 1973a, 1973b). Estos trabajos constituían los primeros intentos de reconstrucción del cariotipo del ancestro común de los Primates homínidos a la vez que mostraban las clasificaciones antropomórficas de los cariotipos del chimpancé, gorila y orangután. Como resultado, se definieron las homologías y reorganizaciones cromosómicas necesarias para homologar dichas especies, la mayoría de las cuales siguen vigentes actualmente. Estas primeras observaciones fueron continuadas con numerosas publicaciones que aplicaban las diferentes técnicas de bandeado cromosómico disponibles en la época (Chiarelli y Lin, 1972; Warburton y col., 1973; Bobrow y Madan, 1973).

Una vez iniciados los estudios en los homínidos, poco a poco se fue ampliando el número de especies de Primates estudiadas, desde especies filogenéticamente cercanas al hombre (*Macaca*, *Papio*, *Cercopithecus*, *Miopithecus*, *Erythrocebus*, *Presbytis*) (Vries y col., 1975; Estop y col., 1978; Dutrillaux y col., 1978a, 1979; Caballín y col., 1980; Dugoujon y col., 1981; Ponsà y col., 1981a; 1981b; 1983), hasta aquellas más lejanas en la escala evolutiva (*Cebus*, *Ateles*, *Aotus*, *Lagothrix*, *Saimiri*) (Dutrillaux y col., 1978b; Garcia y col., 1978; 1979; 1980; Dutrillaux y Courturier, 1981).

Los estudios de los patrones de bandas G de diferentes especies de Primates revelaron que era posible establecer relaciones de homología entre los diferentes cariotipos, así como estudiar los mecanismos de evolución cromosómica que habían contribuido a la existencia de la gran variabilidad de cariotipos observada en el grupo de los Primates. Es más, se observó que los patrones de bandas eran una característica constante en cada especie y por lo tanto, un instrumento útil para comparar los cariotipos de diferentes especies. Con la información que proporcionaron las técnicas de bandeado durante los años 70 y 80 fue posible realizar caracterizaciones citogenéticas más precisas y estudios comparativos entre diferentes especies de mamíferos. Esto llevó a dos importantes conclusiones: (1) cada especie se caracterizaba por una constitución cromosómica determinada (número diploide, morfología cromosómica y patrón de bandas) y (2) la constitución normal de los cromosomas era necesaria para la correcta funcionalidad de la meiosis y la obtención de gametos genéticamente equilibrados.

## **1.2 Aplicación de las técnicas de hibridación “*in situ*” fluorescente (FISH).**

Las aplicaciones de las técnicas moleculares al campo de la citogenética comparativa han incrementado sorprendentemente la utilidad de los datos cromosómicos en los estudios evolutivos ya que las homologías pueden establecerse a nivel de secuencia de ADN. Al final de la década de los 60 aparecieron las primeras aplicaciones de las técnicas de hibridación *in situ* (ISH), desarrolladas originariamente y de forma independiente por dos grupos de investigadores, Pardue y Gall (1969) y por John y col., (1969). Pero no sería hasta los años 80 y 90 cuando se incorporarían de forma habitual al estudio de los cromosomas humanos en particular y de mamíferos en general, demostrando que la organización cromosómica de los mamíferos está altamente conservada.

La aplicación de la hibridación *in situ* no-radiactiva o fluorescente (FISH) ha permitido complementar las aportaciones de las técnicas citogenética clásica y ha ayudado a rectificar en algunos casos y confirmar en otros, los datos obtenidos en los estudios comparativos anteriores. Con esta técnica es posible visualizar la localización nuclear y cromosómica de secuencias específicas de ADN a través del microscopio. Con ello, se han ampliado los estudios a lo que se denomina actualmente genómica comparada, estudio de la evolución y organización del genoma de los mamíferos (Chowdhary y Raudsepp, 2001).

### **1.2.1 Tipos de sondas utilizadas en los estudios de genómica comparada.**

El seguimiento de las reorganizaciones cromosómicas en los estudios evolutivos se está realizando actualmente a través del uso combinado de las técnicas clásicas de bandeado cromosómico y la aplicación de las técnicas de hibridación *in situ* fluorescente. Mediante el uso de sondas de cromosomas enteros (pintado cromosómico) se pueden establecer las homologías cromosómicas y deducir las reorganizaciones intercromosómicas que han tenido lugar durante la evolución cariotípica. Sin embargo, este tipo de sondas posee dos limitaciones: (1) no permiten identificar ni las reorganizaciones intracromosómicas ni los puntos de rotura implicados en ellas y (2) el límite de resolución de la técnica es de 8-10 MB (Chowdhary y Raudsepp, 2001). La aplicación de sondas sub-cromosómicas pretende solventar estas limitaciones, ya que estas sondas pueden llegar a tener el límite de resolución de una banda cromosómica. Por lo tanto, la utilización combinada de las diferentes técnicas de hibridación *in situ* (sondas de pintado cromosómico y sub-cromosómicas), conjuntamente con las técnicas de citogenética clásica, permite la identificación de tanto reorganizaciones inter- como intracromosómicas, así como la localización de los puntos de rotura implicados en ellas.

### 1.2.1.1 Sondas de pintado cromosómico.

Las sondas utilizadas en la técnica de pintado cromosómico pueden ser específicas para cromosomas enteros (*WCP: whole chromosome painting*) o para una región cromosómica concreta (*PCP: partial chromosome painting*). Este tipo de sondas están compuestas por un cóctel de numerosos fragmentos provenientes de un cromosoma determinado, de tal manera que todo el material genético de dicho cromosoma queda representado. Por lo tanto, la señal observada bajo el microscopio de epifluorescencia se trata en realidad de un agregado de diferentes lugares de hibridación que cubren uniformemente el cromosoma diana, dando una visión de “pintado”. Las primeras generaciones de sondas de pintado cromosómico provenían de cromosomas humanos aislados por citómetro de flujo a partir de células híbridas somáticas humano/ratón y la posterior clonación de los fragmentos de ADN en bacteriófagos (Lichter y col., 1988). Actualmente se utilizan dos tipos de metodologías para la generación de sondas de pintado cromosómico tanto de cromosomas humanos, como de otras especies animales.

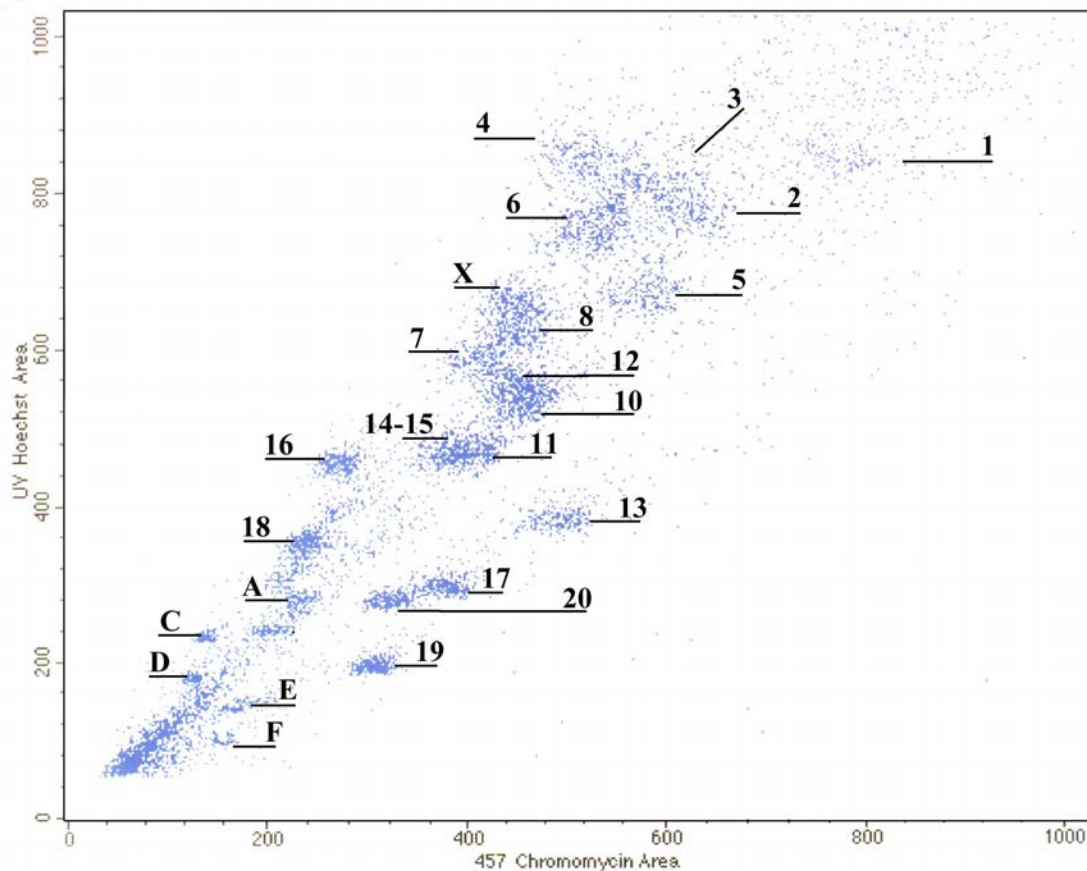
#### 1.2.1.1.1 Citometría de flujo activada por fluorescencia (*FACHS: Fluorescence Activated Chromosome Sorting*).

De todas las posibles aplicaciones del citómetro de flujo, una de ellas consiste en el fraccionamiento físico de cromosomas individuales y la creación de sondas de pintado cromosómico. A partir de una suspensión de cromosomas metafásicos marcados con dos fluorocromos específicos se consiguen aislar hasta 10.000 cromosomas de forma individual en función de su tamaño y contenido en ADN. Los fluorocromos utilizados son el Hoechst 33258, el cual se une específicamente a las uniones AT, y la cromomicina A<sub>3</sub>, la cual tiene especificidad por las uniones CG (Verma y Babu, 1995). Al pasar la suspensión cromosómica por dos láser (láser ultravioleta y láser de 458 nm), los cromosomas son aislados individualmente en función de su contenido en ADN y su composición de bases nitrogenadas. Las intensidades de las señales fluorescentes se registran para cada cromosoma y los datos acumulados se representan como dos histogramas, formando lo que se denomina un cariotipo de flujo (*flow karyotype*) (Figura 1.1). La posterior amplificación de dicho material mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR: *Polymerase Chain Reaction*) utilizando cebadores degenerados (*DOP-PCR: Degenerate Oligonucleotide Primed-PCR*) (Telenius y col., 1992) permite obtener sondas de pintado cromosómico: un cóctel de numerosos fragmentos de ADN provenientes de un único cromosoma.

## 1.2.1.1.2 Microdissección cromosómica.

La microdissección cromosómica es una aproximación directa para aislar el ADN de cualquier región cromosómica citogenéticamente reconocible, de tal forma que el ADN aislado puede ser utilizado para numerosas aplicaciones, como son: (1) verificar la presencia de marcadores cromosómicos mediante la técnica de hibridación *in situ* y establecer su origen cromosómico, y (2) generar genotecas de ADN recombinante específicas para regiones cromosómicas concretas. Estos productos región-específicos son de extrema utilidad para estudios de citogenética molecular y para proyectos de clonación posicional (Lüdecke y col., 1989; Senger y col., 1990).

La ventaja que presenta la técnica de microdissección cromosómica es la posibilidad de generar sondas específicas de regiones cromosómicas, como brazos cromosómicos, o incluso bandas cromosómicas, de forma eficiente.



**Figura 1.1:** Flow karyotype de *Macaca arctoides* (cedido por G. Stone, Laboratory of Genomic Diversity, National Cancer Institute, Frederick, MD; USA).



### 1.2.1.2 Sondas sub-cromosómicas o específicas de banda.

Las sondas provenientes de bibliotecas de pintados sub-cromosómicos (*SCPL:Sub Chromosomal Painting Library*) son aquellas que reconocen una región cromosómica específica (un brazo cromosómico, una banda cromosómica o un conjunto de bandas cromosómicas). Se tratan de sondas derivadas de híbridos celulares somáticos humano/ratón (Lichter y col., 1990), humano/hámster (Antonacci y col., 1995) o generadas mediante microdissección cromosómica (Senger y col., 1990). La aplicación de este tipo de sondas es de gran utilidad en el análisis citogenético detallado de reorganizaciones cromosómicas en análisis clínicos de citogenética tumoral y en estudios de evolución cromosómica (Antonacci y col., 1995).

### 1.2.1.3 Segmentos de ADN clonados.

Mediante las técnicas de ADN recombinante es posible clonar segmentos genómicos humanos en diferentes tipos de vectores. En función del vector, el tamaño del fragmento de ADN a clonar (también denominado “inserto”) es variable; así podemos tener segmentos de ADN clonados en diferentes tipos de vectores (Tabla 1.1).

**Tabla 1.1:** Tipos de vectores de clonaje y el tamaño del inserto que pueden contener.

Tipo de vector	Tamaño del inserto
Bacteriófagos	
<i>Lambda gt11</i>	7-20 Kb
<i>M13mp18</i>	1-6000 pb
Cósmido	10-50 Kb
Cromosoma artificial de bacteria (BAC)	100-500 Kb
Cromosoma artificial de levadura (YAC)	300-1000 Kb
Cromosoma artificial P1 (PAC)	80-150 Kb

Estos insertos de ADN clonados utilizados como sondas tienen un enorme potencial para estudios comparativos, tal como proporcionar información sobre reorganizaciones intra-cromosómicas y homologías al nivel de bandas cromosómicas. Así se consigue disminuir el límite de resolución de análisis de regiones cromosómicas al orden de 10 Kb.

## 1.2.2 Aplicación de las técnicas de hibridación *in situ* a la genómica comparada (Zoo-FISH).

Desde el inicio de los 90, la aplicación de genotecas de ADN recombinante específicas para cromosomas humanos sobre preparaciones cromosómicas de diferentes especies de Primates ha permitido establecer las homologías cromosómicas entre las especies a nivel de secuencia de ADN.

Wienberg y col (1990) fueron pioneros en la aplicación de una nueva estrategia de hibridación *in situ* fluorescente (CISS: *Chromosomal "In Situ" Supression hybridization*) con sondas humanas de pintado cromosómico que tenía como finalidad estudiar la evolución cromosómica en Primates. Con dicha técnica se pudo resolver el problema de la especificidad cromosómica, ya que las secuencias altamente repetitivas que podían interferir en la hibridación entre las secuencias únicas de especies alejadas filogenéticamente eran bloqueadas previamente con ADN genómico o con fracciones de ADN humano enriquecidas con secuencias repetitivas (por ejemplo, Cot-1 ADN). De esta forma se demostró el potencial de esta técnica en el análisis de los cambios cromosómicos estructurales que se han producido a lo largo de la evolución de los Primates, proporcionando una nueva vía de investigación a través del análisis de las homologías al nivel de secuencia de ADN. Posteriormente, Lengauer y col., (1991) demostraron la visualización de una región cromosómica concreta hibridando una sonda de ADN específica para la banda humana 8q23-8q24.1 sobre cromosomas de *Macaca fuscata* y *Hylobates lar*. Pero no fue hasta un año después cuando comenzó la “explosión” propiamente dicha de los estudios de genómica comparada, cuando fue posible hibridar todos los cromosomas humanos sobre los cromosomas de chimpancé, gorila, orangután, tres especies de gibones (Jauch y col., 1992) y *Macaca fuscata* (Wienberg y col., 1992). Con ello se confirmaron las homologías cromosómicas ya sugeridas por las comparaciones de los patrones de bandas, a la vez que se resolvieron algunas reorganizaciones inter- e intra-cromosómicas no descritas anteriormente.

### 1.2.2.1 Zoo-FISH unidireccional vs. Zoo-FISH recíproco.

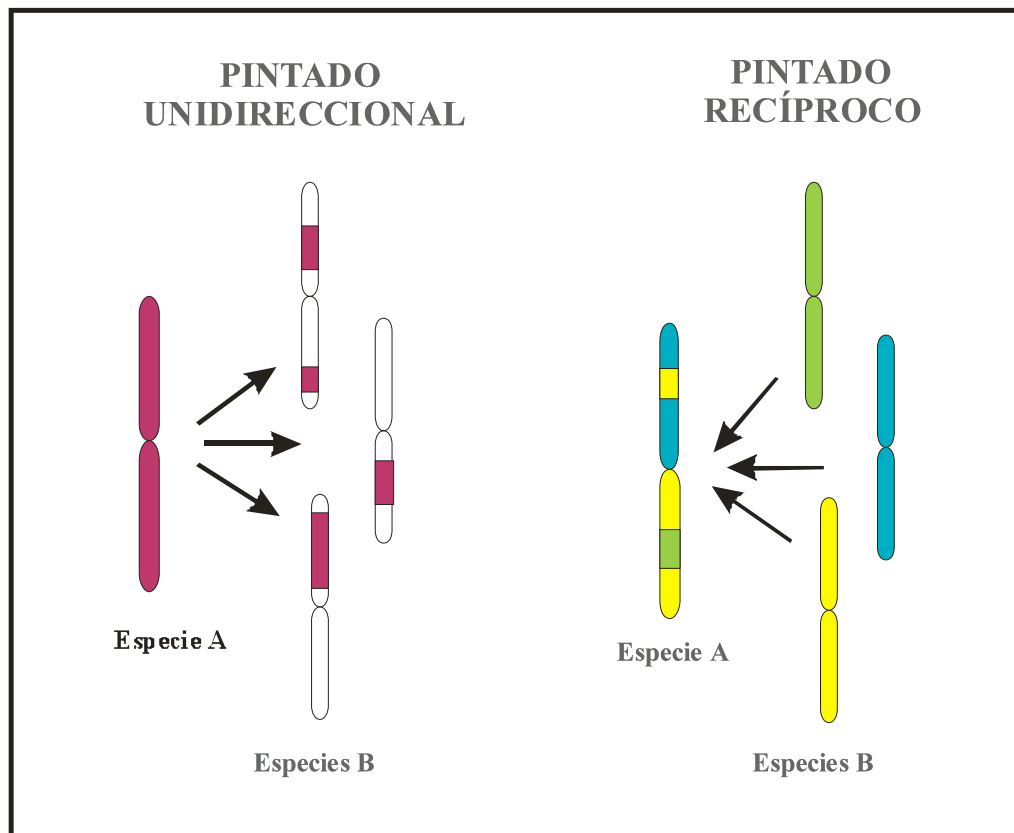
El término de Zoo-FISH o pintado cromosómico comparativo, tan extensamente utilizado actualmente, fue introducido por Scherthan y col., (1994). En el citado estudio, se hibridaron sondas de pintado cromosómico procedentes de los cromosomas humanos 1, 16 y X sobre cromosomas de ratón (*Mus musculus*), ungulados (*Muntiacus muntjak vaginalis* y *M. reevesi*) y ballena (*Balaenoptera physalus*). De esta forma, la técnica de Zoo-FISH se entiende como la hibridación *in*

*situ* fluorescente de sondas de pintado cromosómico de una especie determinada (generalmente sondas cromosómicas humanas) sobre preparaciones cromosómicas de especies diferentes.

En los estudios de genómica comparada, la técnica de Zoo-FISH se aplica en dos tipos de estrategias (Figura 1.2):

- Pintado cromosómico comparativo unidireccional.
- Pintado cromosómico comparativo recíproco.

En el pintado cromosómico unidireccional, las *WCPs* pertenecientes a una especie determinada (A) se hibridan sobre cromosomas de otra especie (B), con lo que la información obtenida se refiere a una sola dirección: (A → B). En cambio, en el pintado cromosómico recíproco, además de la estrategia unidireccional, *WCPs* de la especie B se hibridan sobre los cromosomas de la especie A, por lo que la información obtenida se refiere a las dos direcciones: (A ↔ B).



**Figura 1.2:** Representación esquemática del pintado cromosómico unidireccional y recíproco (adaptado de Wienberg y Stanyon, 1998).

La aplicación del pintado cromosómico comparativo recíproco permite la asignación de regiones sub-cromosómicas homólogas entre dos especies de forma más precisa. Esto es de una

gran utilidad cuando los cromosomas homólogos entre diferentes especies han sufrido un gran número de reorganizaciones. Con esta técnica es posible obtener mayor información sobre los puntos de rotura implicados en las reorganizaciones cromosómicas que se han producido durante la evolución de los cariotipos.

Como resultado de la aplicación de las técnicas de pintado cromosómico comparativo con sondas humanas, hasta el momento se han comparado 39 especies de Primates, pertenecientes a 7 familias diferentes, con el cariotipo humano (Tabla 1.2).

**Tabla 1.2:** Especies de Primates analizados con sondas humanas de pintado cromosómico.

Familia	Especie	Referencia
Hominidae	<i>Pan troglodytes</i>	Jauch y col., 1992
	<i>Gorilla gorilla</i>	Jauch y col., 1992
	<i>Pongo pygmaeus</i>	Jauch y col., 1992
Hylobatidae	<i>Hylobates lar</i>	Jauch y col., 1992
	<i>Hylobates syndactylus</i>	Koehler y col., 1995a; Müller y col., 1998
	<i>Hylobates concolor</i>	Koehler y col., 1995b; Müller y col., 1998
	<i>Hylobates hoolock</i>	Yu y col., 1997
	<i>Hylobates leucogenys</i>	Nie y col., 2001
Cercopithecidae	<i>Macaca fuscata</i>	Wienberg y col., 1992
	<i>Macaca nemestrina</i>	Müller y col., 2001
	<i>Papio hamadryas</i>	Best y col., 1998
	<i>Cercopithecus aethiops</i>	Finelli y col., 1999
	<i>Colobus guereza</i>	Bigoni y col., 1997a
	<i>Presbytis cristata</i>	Bigoni y col., 1997b
	<i>Presbytis francoisi</i>	Nie y col., 1998
Callitrichidae	<i>Presbytis phayrei</i>	Nie y col., 1998
	<i>Callithrix jacchus</i>	Sherlock y col., 1996
	<i>Callithrix argentata</i>	Neusser y col., 2001
	<i>Callimico goeldii</i>	Neusser y col., 2001
	<i>Cebuella pygmaea</i>	Neusser y col., 2001
Cebidae	<i>Saguinus oedipus</i>	Stanyon y col., 2002
	<i>Cebus capucinus</i>	Richard y col., 1996
	<i>Cebus nigrivittatus</i>	García y col., 2002
	<i>Saimiri sciureus</i>	Stanyon y col., 2000
	<i>Ateles geoffroyi</i>	Morescalchi y col., 1997
	<i>Ateles belzebuth hybridus</i>	García y col., 2002
	<i>Alouatta seniculus sara</i>	Consigliere y col., 1996
	<i>Alouatta seniculus macconnelli</i>	de Oliveira y col., 2002
	<i>Alouatta seniculus arctoidea</i>	Consigliere y col., 1996
	<i>Alouatta fusca clamitans</i>	de Oliveira y col., 2002
	<i>Alouatta fusca fusca</i>	de Oliveira y col., 2002
	<i>Alouatta caraya</i>	de Oliveira y col., 2002
Lemuridae	<i>Callicebus moloch</i>	Stanyon y col., 2000
	<i>Lagothrix lagothricha</i>	Stanyon y col., 2001
	<i>Eulemur fulvus</i>	Müller y col., 1997a
	<i>Eulemur macaco</i>	Müller y col., 1997a
Galagidae	<i>Lemur catta</i>	Cardone y col., 2002
	<i>Galago moholi</i>	Stanyon y col., 2002
	<i>Otolemur crassicaudatus</i>	Stanyon y col., 2002

### 1.2.2.2 Hibridación *in situ* multicolor.

Con la finalidad de superar las limitaciones técnicas que ofrece el pintado cromosómico a la hora de estudiar las reorganizaciones intra-cromosómicas, actualmente se están desarrollando aproximaciones alternativas donde se utilizan, en el mismo experimento, sondas de pintado cromosómico sub-regionales o sondas clonadas (YACs, BACs) marcadas con diferentes fluorocromos. De este modo es posible identificar cada cromosoma. Una de estas técnicas es lo que se denomina “código de barras cromosómico” (*chromosome bar-coding*), (Lengauer y col., 1992; Müller y col., 1997b; Müller y Wienberg, 2001) ya que lo que se consigue es un patrón de bandas multicolor, específico para cada cromosoma, como si se tratase de un “código de barras”. Este método permite la identificación rápida de los cromosomas, así como de las reorganizaciones cromosómicas intra- e inter-cromosómicas, por lo que es de gran utilidad en estudios de diagnóstico clínico citogenético y estudios de genómica comparada. Con la ayuda de esta metodología se ha redefinido el cariotipo ancestral de los Homínidos (Müller y Wienberg, 2001) y se están aplicando algunas de estas nuevas variantes al estudio de los cromosomas de los Primates, como el Rx-FISH (*cross-species color-banded karyotype*) con el cual se han conseguido delimitar hasta 100 segmentos cromosómicos diferentes del cariotipo del gibón (*Hylobates lar*) en el cariotipo humano (Müller y col., 1998; Müller y col., 2002).

## 1.3 Características cariológicas de los Primates.

Los Primates se diferencian del resto de los mamíferos por la naturaleza no especializada de su morfología y la plasticidad de su comportamiento, características que les ha permitido extenderse y explotar una gran cantidad de nichos ecológicos diferentes. El Orden Primates comprende tres Subórdenes: Prosimios, Tarsiiformes y Simiiformes (Anthrohoidea). Éste último, los simios, en función de sus características esqueléticas, como son la fórmula dental, la anatomía craneal y la morfología del *septum* nasal, se divide a su vez en dos Infraordenes (Tabla 1.7), Platyrrhini (Primates del Nuevo Mundo) y Catarrhini (Primates del Viejo Mundo) (Napier y Napier, 1985).

### 1.3.1 Infraorden Catarrhini.

El Infraorden Catarrhini incluye 19 géneros agrupados en tres familias (F. Cercopithecidae, F. Hylobatidae y F. Hominidae) distribuidos por el continente africano, India e Indonesia.

**Tabla 1.7:** Clasificación de los Primates.

<b>ORDEN PRIMATES</b>	
<b>SUBORDEN Simiiformes (Anthropoidea)</b>	
INFRAORDEN Platyrrhini	
SUPERFAMILIA Ceboidea	
FAMILIA Cebidae	
SUBFAMILIA Cebinae	Género <b>Cebus</b>
SUBFAMILIA Atelinae	Género <i>Ateles</i> <i>Lagothrix</i> <i>Brachyteles</i>
SUBFAMILIA Aotinae	Género <i>Aotus</i>
SUBFAMILIA Saimirinae	Género <i>Saimiri</i>
SUBFAMILIA Callicebinae	Género <i>Callicebus</i>
SUBFAMILIA Alouattinae	Género <i>Alouatta</i>
SUBFAMILIA Pitheciinae	Género <i>Pithecia</i> <i>Chiropotes</i> <i>Cacajo</i>
FAMILIA Callithrichidae	
SUBFAMILIA Callithrichinae	Género <i>Callithrix</i> <i>Saguinus</i> <i>Leontopithecus</i> <i>Cebuella</i>
SUBFAMILIA Callimiconinae	Género <i>Callimico</i>
INFRAORDEN Catarrhini	
SUPERFAMILIA Cercopithecoidea	
FAMILIA Cercopithecidae	
SUBFAMILIA Cercopithecinae	
Tribu Cercopithecini	
	Género <i>Cercopithecus</i> <i>Erythrocebus</i> <i>Miopithecus</i>
Tribu Papionini	
	Género <b>Papio</b> <b>Mandrillus</b> <b>Macaca</b> <i>Cercocebus</i>
SUBFAMILIA Colobinae	
	Género <i>Colobus</i> <i>Presbytis</i> <i>Nasalis</i> <i>Rhinopithecus</i> <i>Simias</i> <i>Pygathrix</i>
SUPERFAMILIA Hominoidea	
FAMILIA Hylobatidae	
	Género <i>Hylobates</i> <i>Symphalangus</i>
FAMILIA Hominidae	
SUBFAMILIA Ponginae	
	Género <i>Pongo</i> <i>Gorilla</i> <i>Pan</i>
SUBFAMILIA Homininae	
	Género <b>Homo</b>

La Tribu Papionini está formada por cuatro géneros: *Papio* (5 especies), *Macaca* (15 especies), *Mandrillus* (2 especies) y *Cercocebus* (6 especies). Todos ellos se caracterizan por poseer cariotipos muy conservados, es decir, prácticamente idénticos por lo que respecta al número diploide que los caracteriza ( $2n=42$ ) y a su patrón de bandas G. Se han descrito muy pocas reorganizaciones cromosómicas necesarias para homologar sus cariotipos, y la mayor parte de estas diferencias son debidas a variaciones que afectan a regiones heterocromáticas (Rubio-Goday y col., 1976; Dutrillaux y col., 1979; Stanyon y col., 1983; Ponsà y col., 1986; Clemente y col., 1990a). El hecho de que especies fenotípicamente diferentes conserven cariotipos tan similares se debe a que la evolución y la diversificación dentro de este grupo no se ha producido mediante reorganizaciones cromosómicas, tal como ocurre en otros grupos de primates, sino a través de mutaciones génicas. Por lo tanto, este grupo de Primates representa un ejemplo de especiación sin reorganizaciones cromosómicas.

### 1.3.2 Infraorden Platyrrhini.

Las especies de Primates que forman este grupo presentan una gran variabilidad de cariotipos y se considera que es un grupo taxonómico en pleno proceso de especiación cromosómica.

El Infraorden Platyrrhini incluye a 16 géneros agrupados en dos grandes familias (F. Cebidae y F. Callithrichidae) ampliamente distribuidos por América Central y América del Sur. Este grupo de Primates se caracteriza por poseer una alta variabilidad cariotípica, no sólo interespecífica, sino también intraespecífica. Presentan diferencias tanto en el número diploide (desde  $2n=20$  encontrado en *Callicebus torquatus* hasta  $2n=62$ , característico del género *Lagothrix*), como en la distribución y cantidad de heterocromatina constitutiva.

El género *Cebus* incluye 4 especies (Napier y Napier, 1985) que difieren en morfología cromosómica y en el número diploide (*Cebus apella*, *Cebus albifrons* y *Cebus capucinus*, con  $2n=54$  y *Cebus nigrivittatus* con  $2n=52$ ). Para homologar el cariotipo de las 4 especies de *Cebus* son necesarias 3 inversiones y una fusión (García y col., 2002). Los primeros estudios citogenéticos realizados en el género *Cebus* sirvieron para determinar el número diploide en la especie *Cebus apella* mediante técnicas de tinción uniforme (Bender y Mettler, 1958; Chu y Bender, 1961; Bender y Chu, 1963; Chiarelli y Barberis, 1966). La introducción de las técnicas de bandeado cromosómico permitieron la caracterización citogenética más precisa del género, detectándose reorganizaciones estructurales intraespecíficas y variaciones en la cantidad de heterocromatina constitutiva (Torres de Caballero y col., 1976; Dutrillaux y col., 1978b; Garcia y col., 1978, 1983; Freitas y Seuánez, 1982;

Seunáez y col., 1986; Matayoshi y col., 1986, 1987; Clemente y col., 1987; Mudry, 1990; Fanning y col., 1993; Ponsà y col., 1995). Una particularidad del género *Cebus* es la presencia, en general, de grandes segmentos de heterocromatina en varios pares cromosómicos, cuya función es todavía desconocida, y llegan a representar hasta un 10% de su genoma. Una vez caracterizados los cariotipos de las diferentes especies del género *Cebus*, comenzaron los estudios citogenéticos comparativos entre éstas y otras especies de Primates. A partir de las homologías cromosómicas descritas basadas en la comparación de bandas G y en los resultados obtenidos del pintado cromosómico comparativo, se considera que el género *Cebus* ha mantenido un cariotipo más cercano al ancestro (Dutrillaux y Courtier, 1981; Clemente y col., 1990b; Neusser y col., 2001) que el resto de las especies de Platyrrhini, y es la especie que ha sufrido el menor número de reorganizaciones a partir del cariotipo ancestral de los Primates.

#### **1.4 Cariotipo ancestral de los Primates.**

Para poder entender el origen de los cromosomas humanos e interpretar sus morfologías actuales, es necesario reconstruir la evolución de cada uno de ellos a través de la elaboración de árboles filogenéticos. Una de las aplicaciones de los principios de análisis cromosómico comparativo en el establecimiento de filogenias, es la reconstrucción del cariotipo ancestral de los Primates. En la elaboración de cualquier cariotipo ancestral se aplica el principio de parsimonia, el cual postula que si existen dos respuestas a un problema, la más simple de las dos es la más probable. La aplicación del principio de parsimonia a los estudios de evolución cromosómica nos indica que la reconstrucción filogenética que requiere menos cambios (pasos evolutivos) es más parsimoniosa que otra que requiera más pasos. Partiendo de esta premisa, si dos especies comparten la misma forma cromosómica o grupos sinténicos (segmentos cromosómicos homólogos conservados), lo más probable es que dicha morfología proceda de un ancestro. De esta forma se considera que la forma cromosómica más extendida entre las especies analizadas es, con mayor probabilidad, la forma ancestral (Rumpler y Dutrillaux, 1990). Este es el caso, entre otros, de la asociación de los cromosomas homólogos al 3 y 21 humano, la cual se considera que es un grupo sinténico o sintenia ancestral, presente en varias especies de Primates y otros mamíferos placentarios.

Con tal de distinguir las características citogenéticas (morfologías cromosómicas) ancestrales detectadas en dos o más taxones (simplesiomórficas) de aquellas derivadas (apomórficas), se necesitan especies que no pertenezcan al grupo taxonómico que se está estudiando (*outgroup*) con las que poder compararlas. Partiendo de la premisa que considera a los cambios cromosómicos

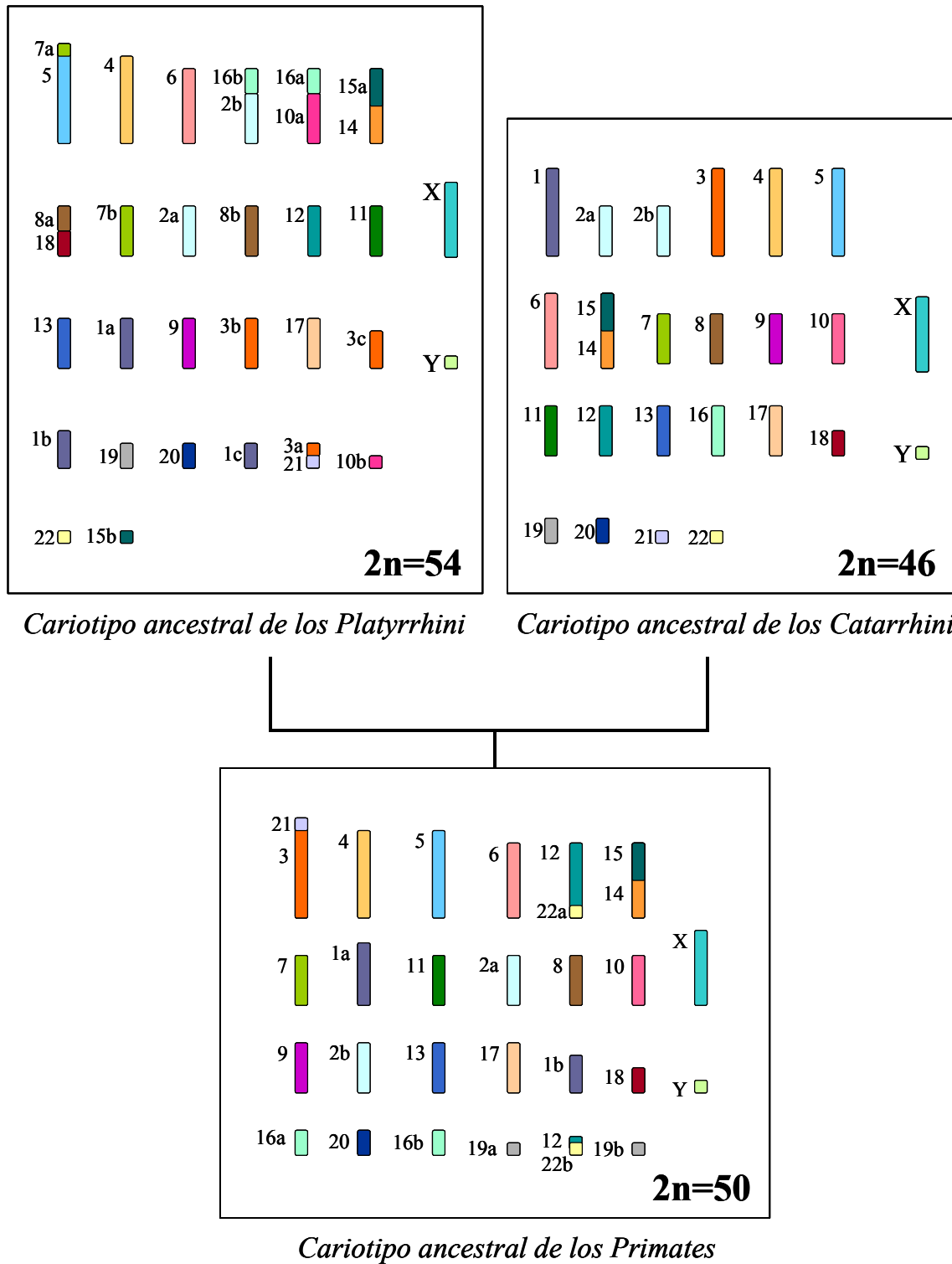


como eventos poco frecuentes (1-2 cambios cada 10 millones de años), la presencia de una misma reorganización o grupo sinténico en diferentes líneas filogenéticas se interpreta como un carácter evolutivo procedente de un origen común (formas derivadas comunes o sinapomórficos). La utilización de especies no-Primates como *outgroup* ha permitido identificar la dirección de los cambios cromosómicos que han tenido lugar durante el proceso de especiación de los Primates, así como la elaboración del cariotipo ancestral.

El uso de las técnicas de hibridación *in situ* con sondas de todos los cromosomas humanos en diferentes especies de Primates (Tabla 1.2) ha proporcionado suficiente información para poder delinear el cariotipo ancestral de este grupo taxonómico en general y el de los Catarrhini y Platyrrhini en particular. Actualmente, se considera que el cariotipo ancestral de los Primates posee un número diploide de  $2n=50$  (Müller y col., 1999) y se compone de los siguientes cromosomas o segmentos cromosómicos homólogos a los cromosomas humanos: 1a,1b, 2a, 2b, 3/21, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12/22a,12/22b, 13, 14/15, 16a, 16b, 17, 18, 19a, 19b, 20, X y Y (Figura 1.3).

#### **1.4.1 Cariotipo ancestral de los Catarrhini.**

Muchas sintenias se han mantenido intactas en el cariotipo ancestral de los Catarrhini (Primates del Viejo Mundo) desde el cariotipo ancestral de los Primates y sólo se han producido unas pocas reorganizaciones durante la evolución cariotípica de este grupo taxonómico. Éstas son: tres fusiones de dos cromosomas ancestrales para producir los cromosomas homólogos a los cromosomas humanos 1, 16 y 19, una translocación recíproca entre 12/22a y 12/22b para formar los cromosomas homólogos a los cromosomas humanos 12 y 22, y una fisión del grupo sinténico 3/21. De esta forma, el cariotipo ancestral de los Catarrhini posee probablemente un número diploide de  $2n=46$  y se compone de los siguientes cromosomas o segmentos cromosómicos homólogos a los cromosomas humanos: 1, 2a, 2b, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14/15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, X y Y (Wienberg y Stanyon, 1998) (Figura 1.3). Las especies pertenecientes a la Tribu Papionini (con número diploide  $2n=42$ ) sólo se diferencian del cariotipo ancestral de los Catarrhini a través de dos translocaciones, que formarían las asociaciones cromosómicas derivadas 7/21 y 20/22.



**Figura 1.3:** Representación del cariotipo ancestral de los Primates ( $2n=50$ ) (adaptado de Müller y col., 1999), de los Catarrhini ( $2n=46$ ) (adaptado de Wienberg y Stanyon, 1998) y de los Platyrrhini ( $2n=54$ ) (adaptado de Neusser y col., 2001). A la izquierda de cada cromosoma está indicada la correspondencia con los cromosomas humanos. La terminología *a*, *b* y *c* se utiliza para diferenciar segmentos cromosómicos homólogos al mismo cromosoma humano que estarían presentes como cromosomas individuales en los cariotipos ancestrales.

### **1.4.2 Cariotipo ancestral de los Platyrrhini.**

Los últimos estudios donde se han aplicado las técnicas de pintado cromosómico comparativo en varias especies de Primates del Nuevo Mundo postulan que el cariotipo ancestral de los Platyrrhini poseería un número diploide de  $2n=54$  y estaría compuesto por los siguientes cromosomas o segmentos cromosómicos homólogos a los cromosomas humanos: 1a, 1b, 1c, 2a, 2b/16b, 3a/21, 3b, 3c, 4, 5/7a, 6, 7b, 8a/18, 8b, 9, 10a/16a, 11, 12, 13, 14/15a, 15b, 17, 19, 20, 21, X y Y (Neusser y col., 2001) (Figura 1.3).

## 2 Lugares frágiles.

### 2.1 Antecedentes históricos de los estudios citogenéticos.

Las primeras observaciones citogenéticas de los lugares frágiles datan de la segunda mitad de los años 60. Desde que Dekaban describiera por primera vez la presencia de una rotura cromosómica localizada siempre en la misma región del brazo largo del cromosoma 9 humano (Dekaban, 1965), numerosos trabajos han ido describiendo la presencia de más de 100 lugares frágiles distribuidos en todos los cromosomas humanos, excepto en el 21 (Sutherland y Richards, 1999).

La demostración de que los lugares frágiles son una característica cromosómica heredable (Lejeune y col., 1968) y de que la presencia de estas roturas cromosómicas en el cromosoma X podía estar relacionada con algún tipo de retraso mental (Lubs, 1969), despertó el interés de estas regiones cromosómicas. La primera alusión a “lugares frágiles heredables” apareció en 1970 (Magenis y col., 1970) en el estudio de una familia que expresaba un lugar frágil en el cromosoma 16.

En un intento por reproducir estas características cromosómicas en el laboratorio, Sutherland (1977) observó que la expresión de los lugares frágiles heredables en cultivos *in vitro* de linfocitos de sangre periférica dependía de las condiciones del medio de cultivo utilizado. Así se demostró que en medios de cultivo deficientes en ácido fólico y timidina se conseguía la expresión citogenética de los lugares frágiles. Como resultado se postuló que existían diferentes tipos de lugares frágiles en función de su respuesta frente a diferentes valores de pH, concentraciones de ácido fólico y de metotrexato en el medio de cultivo.

A partir de estos primeros impulsos en el estudio de los lugares frágiles, los investigadores comenzaron a preguntarse sobre la importancia del estudio de estas características de los cromosomas. Hecht y Kaiser-McCaw (1979) ya plantearon algunas de las posibles aplicaciones del estudio de los lugares frágiles: (1) podrían proporcionar información sobre la estructura cromosómica, comportamiento de los cromosomas y sobre la función de ciertas bandas cromosómicas, y sobre *loci* asociados a ciertas enfermedades, (2) contribuirían a estudios de análisis de ligamiento y (3) podrían ser útiles para establecer correlaciones entre mapas genéticos.

Actualmente se considera que los lugares frágiles son una característica universal e inherente al genoma de los mamíferos (Sutherland y Richards, 1999) y se han descrito en un gran número de especies de mamíferos diferentes (Tabla 1.3).

**Tabla 1.3:** Estudios de lugares frágiles en especies de mamíferos anteriores a este trabajo.

<b>Especie</b>	<b>Referencia</b>
<b>Artiodáctilos</b>	
<i>Sus scrofa</i>	Riggs y col., 1993; Yang y Long, 1993; Ronne, 1995a
<i>Bos taurus</i>	Rodríguez y col., 2002
<b>Perisodáctilos</b>	
<i>Equus caballus</i>	Ronne, 1992
<b>Roedores</b>	
<i>Mus musculus</i>	Sanz y col., 1986; Robinson y Elder, 1987; Djalali y col., 1987; 1990 Elder y Robinson, 1989
<i>Nesokia indica</i>	Tewari y col., 1987
<i>Peromyscus maniculatus</i>	McAllister y Greenbaum, 1997
<b>Carnívoros</b>	
<i>Canis familiaris</i>	Stone y col., 1991; Stone y Stephens, 1993
<i>Felis catus</i>	Stone y col., 1993; Ronne, 1995b; Kubo y col., 1998a; 1998b
<b>Primates</b>	
<i>Gorilla gorilla</i>	Schmid y col., 1985; Smeets y Van de Klundert, 1990
<i>Pan paniscus</i>	Schmid y col., 1985; Smeets y Van de Klundert, 1990
<i>Pongo pygmaeus</i>	Smeets y Van de Klundert, 1990
<i>Saimiri boliviensis</i>	Fundia y col., 2000
<i>Alouatta caraya</i>	Fundia y col., 2000

## 2.2 Definición y clasificación.

Con el fin de unificar criterios, en el año 1985 (Berger y col., 1985) se aprobó como definición de lugar frágil la formulada por Sutherland (1979):

“Un lugar frágil es un punto específico del cromosoma susceptible a presentar las siguientes características:

- 1) Se expresa como una región no teñida de grosor variable que puede implicar a una ó dos cromátides.
- 2) Ocupa siempre el mismo lugar en el cromosoma en las células examinadas de un mismo individuo ó familia.
- 3) Se hereda de forma Mendeliana.
- 4) La fragilidad en este punto se manifiesta como fragmentos acéntricos, cromosomas delecionados y figuras trirradiales.”

Los lugares frágiles se heredan de forma co-dominante, es posible observar en la misma célula uno de los cromosomas homólogos normales y el otro expresando un lugar frágil. Los

lugares frágiles no suelen expresarse en el 100% de las metafases analizadas, sino que el grado de expresión depende de las condiciones de cultivo utilizadas, del individuo y del tipo celular analizado. Ya que los lugares frágiles aparecen como discontinuidades en la estructura longitudinal de los cromosomas, en algún momento estas discontinuidades pueden romperse y crear fragmentos acéntricos que, seguido de una no-disyunción, puede generar una gran variedad de configuraciones cromosómicas inusuales.

Los lugares frágiles del cariotipo humano se clasifican en función de su frecuencia de expresión en dos grandes grupos: lugares frágiles comunes (c-LF) y raros (r-LF). Cada uno de ellos se dividen a su vez en sub-grupos en función de los agentes químicos que inducen su expresión (Sutherland y col., 1996) (Tabla 1.4).

- 1) Lugares frágiles comunes (o constitutivos): Este grupo de lugares frágiles está presente de forma homocigota en todos los individuos, aunque la frecuencia de expresión de un *locus* particular puede variar entre individuos y entre diferentes tipos celulares.
- 2) Lugares frágiles raros: Los lugares frágiles raros varían también en la frecuencia de expresión aunque normalmente su expresión es baja, desde 1:40 hasta 1:100 cromosomas analizados en la especie humana (Sutherland y Richards, 1999).

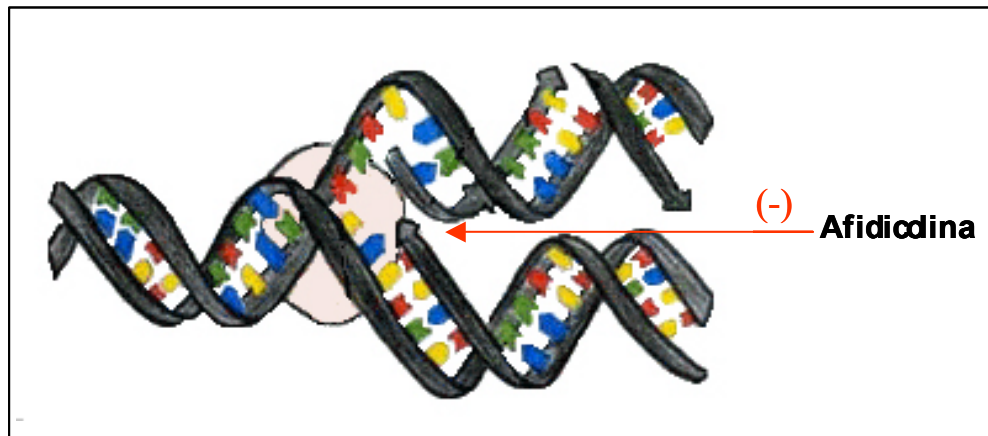
### **2.3 Mecanismos de inducción.**

Todos los tratamientos utilizados para la inducción de lugares frágiles afectan a la velocidad de replicación del ADN y al tiempo de duración de la fase G<sub>2</sub> del ciclo celular. La mayoría de los lugares frágiles raros suelen inducirse a través de una deficiencia de folato o bajos niveles de timidina en el medio de cultivo, mientras que los lugares frágiles comunes se expresan mayoritariamente bajo la acción de la afidicolina (inhibidor específico de la subunidad  $\alpha$  de la ADN polimerasa que bloquea la propagación de la horquilla de replicación e interfiere en la unión de los fragmentos de ADN intermediarios) (Figura 1.4).

El mecanismo de expresión citogenética de los lugares frágiles es todavía una incógnita, pero se postula que la replicación incompleta del ADN en determinadas regiones cromosómicas puede afectar a la correcta compactación de la cromatina antes de que la célula entre en la fase G<sub>2</sub> del ciclo celular y con ello, la manifestación de *gaps* (lesión cromosómica de tamaño menor que el grosor de una cromátide; Hsu y col., 1996) o incluso roturas cromosómicas (Sutherland y Richards, 1999).

**Tabla 1.4:** Clasificación de los lugares frágiles (adaptado de Sutherland y Richards, 1999; Sutherland y Baker, 2000). BrdU: 5-bromo-2'-deoxiuridina, BrdC: 5-bromo-2'-deoxicitidina, FUDR: 5-fluoro-2'-deoxiuridina.

Grupos	Agente inductor	Reconocidos	Clonados
<b>Raros:</b>			
1. Sensibles a folato	Medio deficiente en folato, altas concentraciones de timidina FUDR, Metotrexato	23	5
2. Inducibles por Distamicina A	a. Distamicina A y BrdU	2	1
	b. BrdU y BrdC	3	0
3. Inducibles por BrdU	BrdU o BrdC	2	1
<b>Comunes:</b>			
4. Inducibles por Afidicolina	Afidicolina	76	6
5. Inducibles por 5- Azacitidina	5-Azacitidina	4	0
6. Inducible por BrdU	BrdU	6	0
7. Inducibles por Adenovirus 12	Adenovirus 12	4	0



**Figura 1.4:** Representación de la acción inhibitoria de la afidicolina sobre la ADN polimerasa (adaptado de Fuster, 1987).

#### 2.4 Mecanismos de expresión.

El mecanismo de expresión citogenética de los lugares frágiles es todavía una incógnita, pero los primeros estudios ya apuntaban a que los lugares frágiles podían ser consecuencia directa de la secuencia de nucleótidos y de la estructura que adopta el ADN en estos *loci* (Sutherland, 1979). En el año 1977, Cahudhuri concluyó que los *gaps* cromatídicos son el resultado de una desespiralización de la doble hélice de ADN debido a un fallo en la compactación de la cromatina, apuntando que, probablemente, la secuencia de nucleótidos y la estructura que adopta el ADN en

estas regiones es uno de los posibles factores que afectan a la desespiralización de la doble hélice. De esta forma, y revisando los datos moleculares obtenidos hasta el momento (Sutherland y Richards, 1999), se puede afirmar que la expresión citogenética de un lugar frágil es la manifestación de su inestabilidad genómica que a su vez es generada por las características de la secuencia de ADN en estos *loci*. Lo que todavía, hoy por hoy, sigue sin aclararse son los mecanismos responsables de la expresión citogenética de la inestabilidad a nivel molecular observada en los lugares frágiles.

#### 2.4.1 Estructura molecular de los lugares frágiles raros.

Estudios moleculares (Nancarrow y col., 1994; Yu y col., 1997; Hewett y col., 1998) han revelado que la expresión e inestabilidad genómica de los lugares frágiles raros está asociada con la expansión de repeticiones de trinucleótidos CGG o de repeticiones en tándem de regiones ricas en AT (Tabla 1.5).

Hasta el momento todos los lugares frágiles raros clonados que son sensibles a bajas concentraciones de folato han demostrado compartir la misma característica molecular: secuencias CGG repetidas, polimórficas en el número de copias. Estas secuencias repetidas sufren lo que se denomina “mutaciones dinámicas”, las cuales consisten en expansiones del número de copias. Uno de los lugares frágiles raros mejor caracterizado es el FRAXA, asociado al Síndrome del X frágil, la forma familiar de retraso mental con mayor incidencia después de la trisomía del cromosoma 21.

**Tabla 1.5:** Propiedades de los lugares frágiles raros clonados (adaptada de Sutherland y col., 1998)

	Tipo de lugar frágil		
	Sensible a folato	FRA10B (Inducible por BrdU)	FRA16B (Inducible por Distamicina A)
Secuencia repetida	CGG	42 pb ricas en AT	33 pb ricas en AT
Tamaño de la secuencia amplificada	entre 0,6 y 5,5 Kb	de 5 a 100 Kb	entre 10 y 70 Kb

#### 2.4.2 Estructura molecular de los lugares frágiles comunes.

Por lo que respecta a los lugares frágiles comunes, hasta el momento se han caracterizado siete de ellos: FRA2G (Limongi y col., 2003), FRA3B (Wilke y col., 1996), FRA6F (Morelli y col., 2002), FRA7G (Huang y col., 1998a), FRA7H (Mishmar y col., 1998), FRA16D (Mangelsdorf y



col., 2000) y FRAXB (Arlt y col., 2002). A diferencia de lo que ocurre con los lugares frágiles raros, no se han detectado secuencias concretas repetitivas que puedan explicar el fenómeno de fragilidad en estos *loci*. Se ha demostrado que se tratan de grandes regiones (desde 150 Kb hasta 1 Mb) en las cuales pueden producirse roturas de la doble cadena de ADN. El estudio de la secuencia de ADN en alguno de estos puntos no revela ninguna característica obvia que justifique su fragilidad, pero el análisis de las características estructurales revela que estas regiones podrían formar estructuras de ADN que poseen una alta flexibilidad y baja estabilidad: formas no B-ADN, triples hélices (implicadas en la inducción de la expresión génica y la recombinación homóloga) (Mishmar y col., 1998). A su vez, son regiones de replicación tardía y ricas en AT (el 60%-70% de su secuencia) y pobres en genes. Estas configuraciones (altamente flexibles e inestables) que adopta el ADN podrían interferir en la correcta replicación y condensación/organización de la cromatina, llevando consigo a la fragilidad en estas regiones del cromosoma. Un modelo basado en el estudio del lugar frágil FRA3B (Le Beau y col., 1998) postula que los lugares frágiles comunes son secuencias que iniciarían la replicación de forma tardía, lo que conllevaría a un fallo en la replicación completa del ADN. Esto causaría una condensación incompleta de la cromatina, que puede expresarse a nivel citogenético como roturas cromosómicas y/o *gaps*.

## **2.5 Significado biológico.**

De todos los lugares frágiles humanos descritos en la literatura, sólo tres de ellos (lugares frágiles clasificados como raros) están directamente implicados en enfermedades humanas; FRAXA – Síndrome del X frágil; FRAXE – retraso mental ligado al cromosoma X no específico; FRA11B – Síndrome de Jacobsen. Por lo que respecta a los lugares frágiles comunes, al no estar directamente implicados en procesos patológicos humanos, se desconoce el significado biológico de la fragilidad cromosómica observada en estos *loci*.

### **2.5.1 Lugares frágiles y cáncer.**

Se ha demostrado la naturaleza recombinogénica de los lugares frágiles, así como su implicación en fenómenos de intercambio de cromátides hermanas (Glover y Stein, 1987) y se han relacionado con puntos de integración de genomas virales (Wilke y col., 1996; Huang y col., 1998a; Mishmar y col., 1998; Thorland y col., 2000). El modelo de “ciclos de rotura-fusión-puente” (*BFB-cycle: bridge-fusion-breakage cycle*) propuesto a principios de los años 50 (McClintock, 1951)

explica la implicación de los lugares frágiles en los procesos de amplificación génica que caracteriza a algunos oncogenes durante el proceso de progresión tumoral (Coquelle y col., 1997).

El comité de reorganizaciones cromosómicas en neoplasias y lugares frágiles del año 1985 (Berger y col., 1985) ya indicaba la existencia de una relación entre los lugares frágiles y roturas cromosómicas no aleatorias detectadas en algunos cánceres (Hecht y Sutherland, 1984; Le Beau y Rowley, 1984; Yunis y Soreng, 1984). Según ellos, esta relación no dejaba de ser circunstancial ya que, hasta ese momento, la relación entre ambos factores se refería a localizaciones a nivel citogenético y no había evidencias de que la expresión de un lugar frágil podía predisponer al desarrollo de un cáncer. Si los lugares frágiles estaban relacionados de forma específica con la biología del cáncer, estaba por demostrar.

Recientemente han ido apareciendo numerosos trabajos que relacionan la inestabilidad genómica que caracteriza a los lugares frágiles con la predisposición a sufrir determinados tipos de cáncer, esto es, la expresión de lugares frágiles puede incrementar la probabilidad de iniciación y progresión de procesos tumorales (Ribas y col., 1999). Con el desarrollo de nuevas técnicas de clonación posicional y mapado génico se han conseguido aislar regiones cromosómicas procedentes de diferentes lugares frágiles y demostrar que son las responsables de la inducción de diferentes tipos de roturas y deleciones cromosómicas detectadas en diferentes tipos de tumores.

El lugar frágil común más frecuente en la población humana es el FRA3B (3p14.2), en cuya región se localiza el gen supresor de tumores *FHIT* (Mishmar y col., 1998). Parece ser una región de inestabilidad y se han encontrado transcritos anómalos del gen *FHIT* en ciertos tipos de tumores y algunos tipos celulares anormales (Ohta y col., 1996; Huebner y col., 1998). Los estudios más recientes postulan que la fragilidad detectada en las secuencias localizadas en la región FRA3B estaría relacionada con un proceso de eventos repetidos de rotura y posterior reparación que resultaría en deleciones discontinuas de la región afectada del cromosoma 3 observadas en diferentes líneas celulares tumorales (Corbin y col., 2002).

Por lo que respecta a otros lugares frágiles comunes, el FRA7G (7q31.2) está localizado cerca de los genes de las caveolinas humanas (*CAV-1* y *CAV-2*), los cuales están considerados como candidatos a ser genes supresores de tumores (Engelman y col., 1998). Se ha observado que esta región también presenta frecuentes pérdidas de heterocigosis (LOH) en cáncer de próstata y mama (Huang y col., 1998b). Otro ejemplo es el lugar frágil FRA16D (16q23.2), localizado en una región asociada a dos tipos de inestabilidad cromosómica detectada en algunos tipos de cáncer: translocaciones cromosómicas encontradas en mielomas múltiples (Ried y col., 2000) y deleciones en homocigosis implicadas en diferentes tipos de adenocarcinomas (Paige y col., 2000).

Por lo tanto, parece ser que los lugares frágiles pueden intervenir en el proceso de oncogénesis a través de dos vías diferentes, no excluyentes entre sí (Sutherland y col., 1998):

- 1) Acción sitio-específica: El lugar frágil estaría localizado dentro o cerca de un oncogen y deleciones en dicha región provocarían la inactivación o alteración de dicho gen.
- 2) Inducción de reorganizaciones cromosómicas como resultado de roturas inducidas por agentes clastógenos: La posición del lugar frágil facilitaría procesos de amplificación génica intracromosómica.

### **2.5.2 Lugares frágiles y evolución cromosómica.**

Dentro del contexto evolutivo, cabe preguntarse si los lugares frágiles son cicatrices evolutivas; esto es, si son el resultado o la causa de las reorganizaciones cromosómicas que se han producido durante la evolución cromosómica de los mamíferos. Teniendo en cuenta que los lugares frágiles pueden ser considerados marcadores de una inestabilidad genética, los estudios sobre su expresión en otras especies de mamíferos diferentes a la humana, como es el caso de los Primates, proporcionarán información acerca del posible papel que estas regiones han desempeñado en el proceso de especiación cromosómica.

Existen muy pocos trabajos sobre la relación que existe entre la expresión citogenética de los lugares frágiles y los puntos de rotura evolutivos. Los primeros estudios sobre la expresión de lugares frágiles en Primates no-humanos (*Gorilla gorilla* y *Pan paniscus*) sugerían la existencia de un cierto grado de conservación de la localización de lugares frágiles humanos (Yunis y Soreng, 1984; Schmid y col., 1985). Esta conservación también se mantenía cuando se comparaban los lugares frágiles humanos con aquellos inducidos en el cariotipo de ratón (Djalali y col., 1987). Estudios posteriores de comparación de patrones de bandas G entre diferentes especies de Primates indicaban que un alto porcentaje de las bandas cromosómicas implicadas en la evolución cromosómica así como centrómeros latentes y los límites de regiones heterocromáticas, dentro de las familias Hominidae (Miró y col., 1987), Cebidae (Clemente y col., 1987) y Cercopithecidae (Clemente y col., 1990a), coincidían con la localización de lugares frágiles en el cariotipo humano. Estos trabajos sugieren que los lugares frágiles podrían haber dirigido, de alguna forma, la evolución cromosómica, de la misma forma que se habrían conservado en regiones cromosómicas homologas en diferentes especies de Primates durante la evolución cariotípica (Smeets y Van de Klundert, 1990).

### 3 Secuencias teloméricas

#### 3.1 Definición y estructura de los telómeros.

Los telómeros son complejos nucleoproteicos que constituyen los extremos físicos de los cromosomas de los eucariotas (Blackburn, 1991). Estudios moleculares realizados en varias especies de eucariotas revelaron que el ADN telomérico está formado por un número variable de una pequeña secuencia (5-8 pares de bases) repetida en tándem “n” veces al final de cada cromosoma. En *Thetraymena thermophila*, esta secuencia de ADN consiste en repeticiones en tándem de la secuencia  $(T_2G_4)_n$ , en *Oxytricha* es la secuencia  $(T_2AG_2)_n$  y en vertebrados el ADN telomérico consiste en repeticiones del hexasmero  $(T_2AG_3)_n$  (Moyzis y col., 1988; Meyne y col., 1989). La longitud de estas repeticiones puede ser variable, entre las 28 pb de algunos ciliados y las 50 Kb en ratón. Aun así, los extremos cromosómicos de los organismos eucariotas poseen una característica en común: la presencia de una cadena simple de ADN telomérico en el extremo 3', esencial para la formación de la estructura del telómero.

Los diferentes organismos eucariotas (ciliados, levaduras y mamíferos), han desarrollado distintas estrategias para proteger los extremos libres de los cromosomas mediante la unión de proteínas al filamento de ADN que contiene las secuencias teloméricas, proporcionando estructuras diversas en los extremos de los cromosomas. En mamíferos, la estructura de los telómeros se explica mediante el modelo de “Bucle T” (*T-loop: telomere loop*), propuesta por Griffith y col., (1999). Según este modelo, el ADN telomérico se plegaría sobre sí mismo formando un bucle (*T-loop*) constituyendo la estructura característica que diferenciaría al telómero de los extremos de ADN libres procedentes de roturas cromosómicas. La porción de ADN telomérico de la cadena simple protuberante rica en guaninas invadiría la región de ADN telomérico de cadena doble, desplazando una de las hebras de la doble hélice, formando un “Bucle D” (*D-loop: displacement loop*). Dímeros de la proteína TRF1 se unirían a regiones de doble cadena del *T-loop*, mientras que dímeros de la proteína TRF2 se unirían a regiones de doble cadena del *D-loop*.

#### 3.2 Funciones de los telómeros.

Las funciones que desempeñan los telómeros son básicas para el correcto funcionamiento y estabilidad de los cromosomas. Los telómeros permiten la correcta replicación del ADN en las extremidades de los cromosomas; intervienen en la arquitectura nuclear participando en el apareamiento de los cromosomas meióticos, en la segregación de los cromosomas mitóticos y

meióticos y en el posicionamiento correcto de los cromosomas en el interior del núcleo; intervienen en la senescencia celular, al mismo tiempo que protegen a las extremidades del cromosoma de la degradación exonucleotídica y de posibles eventos de fusión terminal (Zakian, 1989; Blackburn, 1991; de Lange, 1992; Kurenova y Mason, 1997).

### **3.3 Secuencias teloméricas intersticiales.**

Repeticiones de tipo telomérico (TTAGGG)<sub>n</sub> pueden ocupar regiones no terminales en los cromosomas de diferentes especies de eucariotas (Moyzis y col., 1988; Meyne y col., 1990). Desde que Meyne y colaboradores describieran en el año 1990, mediante experimentos de FISH con la sonda telomérica, la presencia de esta secuencia en posiciones no terminales de cromosomas de varias especies de vertebrados, preferentemente en regiones pericentroméricas y regiones de heterocromatina constitutiva, el número de especies estudiadas se ha ido ampliando. Se ha detectado, hasta el momento, la presencia de secuencias teloméricas intersticiales en más de 50 especies pertenecientes a diferentes grupos animales: Artrópodos, Peces, Anfibios, Reptiles, Aves, Marsupiales, Artiodáctilos, Perisodáctilos, Roedores, Quirópteros, Insectívoros, Carnívoros y Primates (Tabla 1.6).

En el primer experimento (Moyzis y col., 1988) donde se aisló por primera vez la secuencia del ADN telomérico, se observaron bloques de repeticiones teloméricas (TTAGGG)<sub>n</sub> en posiciones no-terminales, y se postuló que amplificaciones ocasionales y reorganizaciones de estos bloques teloméricos podrían estar relacionadas con los cambios cromosómicos asociados a la especiación.

Experimentos de hibridación *in situ* con una sonda marcada radioactivamente revelaron la existencia de un telómero intersticial en la posición 2q13 del cariotipo humano; este punto corresponde al lugar de fusión de dos cromosomas acrocéntricos ancestrales presentes en los grandes simios (Wells y col., 1990). Con la clonación de dicho punto, se demostró que la secuencia telomérica presente había quedado retenida tras una fusión telómero-telómero ancestral (Ijdo y col., 1991). Posteriormente se han ido clonando otras secuencias teloméricas intersticiales en el genoma humano: 4q35, 8p21 y 10q22.2 por Weber y col., (1990, 1991) y 2q31, 6pter, 7qter, 20qter y 21q22 por Azzalin y col., (2001).

**Tabla 1.6:** Especies eucariotas en las que se han descrito secuencias teloméricas intersticiales.

Espece	Referencia	Espece	Referencia
<b>Artrópodos</b>		<b>Artiodáctilos</b>	
<i>Myrmecia spp.</i>	Meyne y col., 1995	<i>Cervus timorensis</i>	Meyne y col., 1990
<b>Peces</b>		<i>Gazella espekei</i>	Meyne y col., 1990
<i>Salmo salar</i>	Abuín y col., 1996	<i>Muntiacus reevesi</i>	Scherthan, 1990
<i>Onchorhynchus mykiss</i>	Abuín y col., 1996	<i>M. muntjak vaginalis</i>	Lee y col., 1993
<i>Acipenser gueldenstaedti</i>	Fontana y col., 1998	<i>Sus scrofa</i>	Thomsen y col., 1996
<i>Torpedo ocellata</i>	Rocco y col., 2001	<i>Okapia johnstoni</i>	Vermeesch y col., 1996
<i>Oreochromis niloticus</i>	Chew y col., 2002	<i>Giraffa camelopardalis</i>	Vermeesch y col., 1996
<b>Anfibios</b>		<b>Perisodáctilos</b>	
<i>Xenopus laevis</i>	Meyne y col., 1990	<i>Diceros bicornis</i>	Meyne y col., 1990
<i>Hyla versicolor</i>	Meyne y col., 1990	<i>Equus caballus</i>	Lear, 2001
<i>H. chrysoscelis</i>	Wiley y col., 1992	<b>Roedores</b>	
<b>Reptiles</b>		<i>Aethomys namaquensis</i>	Meyne y col., 1990
<i>Cnemidophorus spp.</i>	Meyne y col., 1990	<i>Cricetulus griseus</i>	Bertoni y col., 1996
<i>Sceloporus olivaceus</i>	Meyne y col., 1990	<i>Akodon spp.</i>	Fagundes y Yonenaga-Yassuda, 1998
<i>Gonatodes taniae</i>	Schmid y col., 1994	<i>Bolomys lasiurus</i>	Silva y Yonenaga-Yassuda, 1998
<i>Leposoma spp.</i>	Pellegrino y col., 1999	<i>Myopus schisticolor</i>	Liu y Fredga, 1999
<b>Aves</b>		<i>Oryzomys subflavus</i>	Andrades-Miranda y col., 2002
<i>Gallus domesticus</i>	Nanda y Schmid, 1994	<i>Mus minutoides</i>	Castiglia y col., 2002
	Nanda y col., 2002	<b>Quirópteros</b>	
<i>Struthio camelus</i>	Nanda y col., 2002	<i>Artibeus jamaicensis</i>	Meyne y col., 1990
<i>Rhea americana</i>	Nanda y col., 2002	<i>Emops perotis</i>	Finato y col., 2000
<i>D. novaehollandiae</i>	Nanda y col., 2002	<i>E. glaucinus</i>	Meyne y col., 1990; Finato y col., 2000
<i>Phasianus colchinus</i>	Nanda y col., 2002	<b>Insectívoros</b>	
<i>Cairina moschata</i>	Nanda y col., 2002	<i>Condylura cristata</i>	Meyne y col., 1990
<i>Anser anser</i>	Nanda y col., 2002	<b>Carnívoros</b>	
<i>Bubo bubo</i>	Nanda y col., 2002	<i>Nyctereutes procyonoides</i>	Wurster-Hill y col., 1988
<i>Streptopelia roseogrisea</i>	Nanda y col., 2002	<b>Primates</b>	
<b>Marsupiales</b>		<i>Lemur macaco rufus</i>	Meyne y col., 1990
<i>Petrogale spp.</i>	Metcalfe y col., 1997	<i>Eulemur fulvus fulvus</i>	Garagna y col., 1997; Go y col., 2000
<i>Wallabia bicolor</i>	Metcalfe y col., 1998	<i>Eulemur coronatus</i>	Go y col., 2000
<i>Marmosops incanus</i>	Svartman y Vianna-Morgante, 1998	<i>Hapalemur griseus</i>	Go y col., 2000
<i>Monodelphis domestica</i>	Svartman y Vianna-Morgante, 1998	<i>Hapalemur sinus</i>	Go y col., 2000
<i>Monodelphis spp.</i>	Carvalho y Mattevi, 2000	<i>Gorilla gorilla</i>	Hirai, 2001
<i>Micoureus demerarae</i>	Pagnozzi y col., 2000	<i>Pan paniscus</i>	Hirai, 2001
	Carvalho y Mattevi, 2000	<i>Homo sapiens</i>	Azzalin y col., 1997
<i>Gracilianus microtarsus</i>	Carvalho y Mattevi, 2000		

### 3.3.1 Hipótesis sobre el origen de las secuencias teloméricas intersticiales.

Existen diversas hipótesis, no excluyentes entre si, que intentan explicar los mecanismos de formación de las secuencias teloméricas intersticiales así como las funciones que pueden desempeñar.

### 3.3.1.1 Reparación de roturas de doble hélice por la enzima telomerasa.

Una de las hipótesis que explicaría la existencia de algunas de las secuencias teloméricas intersticiales clonadas en el genoma humano es la inserción de este tipo de secuencias tras la reparación de roturas de doble hélice por parte de la telomerasa (Flint y col., 1994). Se postula (Azzalin y col., 2001) que, en algún momento en la línea germinal, la enzima telomerasa podría reconocer extremos 3' libres después de una rotura de doble hélice y añadir repeticiones del hexámero (TTAGGG). Posteriormente, la enzima ADN polimerasa acabaría la síntesis de la cadena complementaria, reparando el daño causado. A través de la clonación y la búsqueda de secuencias homólogas en las bases de datos (*Genome Database*), en el genoma humano existirían tres tipos de secuencias teloméricas intersticiales (Azzalin y col., 2001):

- 1) Secuencias teloméricas intersticiales cortas (*short ITs*). Consisten en repeticiones cortas y exactas del hexanucleótido (TTAGGG). Probablemente existan más de 50 secuencias de este tipo distribuidas por todo el genoma humano. Este tipo de secuencias serían el resultado de la acción reparadora de la telomerasa en puntos de genoma donde se han producido roturas de la doble cadena de ADN.
- 2) Secuencias teloméricas intersticiales subteloméricas (*subtelomeric ITs*). Repeticiones de mayor tamaño del hexanucleótido (TTAGGG) acompañadas de repeticiones degeneradas y localizadas en las regiones subteloméricas de todos los cromosomas.
- 3) Secuencias teloméricas intersticiales resultado de fusiones ancestrales (*fusión ITs*). Repeticiones teloméricas derivadas de fusiones telómero-telómero. Un ejemplo de este tipo sería la secuencia telomérica clonada en el locus 2q13 humano, el cual correspondería a una fusión de dos cromosomas ancestrales clonada por Ijdo y col. (1991).

### 3.3.1.2 Mecanismos de amplificación génica o recombinación desigual.

Se tiene constancia de que las repeticiones de tipo telomérico son un componente del ADN satélite en numerosas especies de vertebrados (Southern, 1970; Garrido-Ramos y col., 1998). Las repeticiones teloméricas intersticiales, al igual que otros tipos de microsatélites, sufrirían expansiones en el número de repeticiones por deslizamiento (*slippage*) de la enzima ADN polimerasa durante la replicación del ADN. Posteriormente, estas secuencias se modificarían por recombinación desigual (Wiley y col., 1992; Azzalin y col., 2001). Este mecanismo explicaría la existencia de las secuencias teloméricas intersticiales cortas (*short ITs*).

### **3.3.1.3 Reorganizaciones intracromosómicas.**

Las secuencias teloméricas encontradas en posiciones no terminales de los cromosomas en pacientes con el Síndrome de Prader-Willi (Park y col., 1992; Rossi y col., 1993; Vermeesch y col., 1997; Devriendt y col., 1997), parecen indicar que son telómeros que han perdido su función cuando, como resultado de reorganizaciones intracromosómicas, han pasado a regiones internas del cromosoma.

### **3.3.1.4 Cicatrices evolutivas.**

El origen evolutivo de las secuencias teloméricas intersticiales fue la primera teoría propuesta para explicar la existencia de dichas secuencias (Meyne y col., 1990) y se trata de la teoría más extensamente documentada en una gran variedad de especies animales. El estudio de la localización de estas secuencias repetidas en el cariotipo de diferentes especies de vertebrados abrió la posibilidad de estudiar los diferentes tipos de reorganizaciones cromosómicas que han dirigido, o están dirigiendo, la evolución del genoma eucariota (Nanda y col., 2002). Reorganizaciones cromosómicas y amplificaciones de esta secuencia en los genomas de los vertebrados permitirían una mayor flexibilidad para soportar los cambios cariológicos, proporcionando nuevos telómeros potenciales para la estabilización de nuevas formas cromosómicas.

Desde este punto de vista, las secuencias teloméricas intersticiales también pueden considerarse como “cicatrices” de reorganizaciones cromosómicas (inversiones y fusiones) que se han producido durante la evolución cariotípica de las especies (Ijdo y col., 1991; Lee y col., 1993; Vermeesch y col., 1996; Thomsen y col., 1996; Metcalfe y col., 1997; 1998; Fagundes y Yonenaga-Yassuda, 1998; Pellegrino y col., 1999; Go y col., 2000; Finato y col., 2000). Un claro ejemplo de este hecho lo representan las secuencias teloméricas intersticiales localizadas en el cromosoma 2 humano en la banda cromosómica 2q13, la cual es el resultado de una fusión telómero-telómero originada en la línea evolutiva del género *Homo* (Caballín, 1981; Wells y col., 1990; Ijdo y col., 1991).

### **3.3.2 Secuencias teloméricas intersticiales e inestabilidad cromosómica.**

Numerosas evidencias experimentales han relacionado las secuencias teloméricas intersticiales con reorganizaciones cromosómicas espontáneas (Bertoni y col., 1994) e inducidas (Álvarez y col., 1993; Fernández y col., 1995; Slijepcevic y col., 1996), por lo que pueden considerarse como regiones cromosómicas con una tendencia a sufrir roturas. Desde finales de los



años 80 numerosos estudios apoyan la hipótesis de que dichas secuencias teloméricas representan puntos preferentes de recombinación y eventos cromosómicos inestables (Hastie y Allshire, 1989; Pluta y Zakian, 1989; Katinka y Bourgain, 1992; Mondello y col., 2000; Kilburn y col., 2001).

Existen evidencias citogenéticas de una co-localización de las secuencias teloméricas intersticiales y los lugares frágiles en el cariotipo humano (Farr y col., 1991; Musio y col., 1996; Musio y Mariani, 1999). Diversos trabajos (Azzalin y col., 2001; Faravelli y col., 2002) postulan que las secuencias teloméricas intersticiales no son la causa directa de una inestabilidad genómica, sino más bien serían la consecuencia de dicha inestabilidad; el resultado de roturas y reorganizaciones cromosómicas que se han producido en un punto determinado del genoma.

# CAPÍTULO 2

---

## Objetivos



Dentro de un contexto evolutivo, el estudio citogenético de diferentes especies de Primates realizado durante los últimos años por el Grupo de Citogenética Animal del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la UAB, condujo a la caracterización de las homologías y las reorganizaciones cromosómicas que relacionan los cariotipos de dichas especies entre sí y con el cariotipo humano. Los resultados obtenidos hasta el momento parecen indicar la existencia de determinadas bandas cromosómicas implicadas de forma preferencial en la evolución cariotípica de los Primates, con lo que cabría esperar que dichas regiones cromosómicas podían poseer una mayor tendencia a sufrir roturas y/o a reorganizarse.

A partir de estos datos previos, nos planteamos la siguiente hipótesis de trabajo: Las bandas cromosómicas implicadas en reorganizaciones cromosómicas evolutivas podrían ser la expresión de regiones cromosómicas inestables, como son los lugares frágiles. Al mismo tiempo, las secuencias teloméricas localizadas en regiones internas de los cromosomas podrían ser el resultado de algunas de las reorganizaciones evolutivas determinadas.

---

\* Par cromosómico nº2 de *Cebus nigrivittatus*

Por lo tanto, el **objetivo** principal planteado en este trabajo experimental ha sido la comprobación de dicha hipótesis. Para ello, ha sido necesario,

- 1 Describir las homologías cromosómicas entre los cariotipos de diferentes especies de Primates, y determinar las reorganizaciones cromosómicas que explican dichas homologías, así como las bandas cromosómicas implicadas en las reorganizaciones. Las especies de Primates comparadas han sido:

**Catarrhini**

*Macaca fascicularis*  
*Macaca arctoides*  
*Mandrillus sphinx*  
*Homo sapiens*

**Plathyrrini:**

*Cebus apella*  
*Cebus nigrivittatus*

- 2 Analizar la expresión citogenética de los lugares frágiles en las especies de Primates caracterizadas y comparar su localización con los lugares frágiles descritos en la especie humana con tal de determinar si dichas regiones se han conservado durante el proceso evolutivo.
- 3 Estudiar la distribución de las secuencias teloméricas intersticiales en *Macaca fascicularis* y *Cebus apella*, y compararla con la localización de las secuencias teloméricas intersticiales descritas en la especie humana.
- 4 Relacionar la localización de lugares frágiles y la distribución de las secuencias teloméricas intersticiales con las bandas cromosómicas implicadas en reorganizaciones cromosómicas evolutivas.

---

## Material y Métodos



### 1 Material biológico.

En el presente estudio se han utilizado dos tipos de muestras biológicas: linfocitos procedentes de sangre periférica y líneas celulares establecidas de diferentes especies de Primates. En la tabla 3.1 se muestran los ejemplares de Primates y líneas celulares seleccionados para el estudio, el código por el cual se identifican, el número diploide que los diferencia, el número de individuos analizados, así como su procedencia. Todos los ejemplares seleccionados eran individuos mantenidos en cautividad, a excepción de *Macaca arctoides*, de cuya especie se estudió una línea celular linfoblastoide (ref. GM03443), y de una línea fibroblástica de *Macaca fascicularis* procedente del *Laboratory Genomic Diversity* (USA).

### 2 Métodos.

#### 2.1 Obtención de cromosomas metafásicos.

Para la obtención de cada muestra biológica los especímenes fueron anestesiados con clorhidrato de ketamina. La muestra de sangre periférica se obtuvo mediante punción de la vena femoral con jeringas de 10 ml previamente heparinizadas. De cada individuo se extrajo entre 1 ml y

---

\* Par cromosómico nº3 de *Cebus nigrivittatus*

4 ml de sangre, en función del tamaño y peso del animal. Las muestras procedentes de Parques Zoológicos y del CIDA fueron muestras de sangre obtenidas en controles veterinarios realizados periódicamente a los animales. Por lo que respecta a las muestras procedentes de centros extranjeros (Argentina, Colombia y Venezuela) las muestras de sangre fueron procesadas en los países de origen y se transportaron las células una vez fijadas en metanol:acético.

Todos los ejemplares analizados fueron caracterizados citogenéticamente y de cada especie se elaboró un idiograma comparable al cariotipo. En la sección *Anexos* se muestran los cariotipos de las especies de Primates estudiadas en el presente trabajo.

**Tabla 3.1:** Ejemplares objetos de estudio. (\*: Líneas celulares)

Especie	Código	2n	Nº Individuos	Procedencia
<b>Catarrhini</b>				
<i>Macaca fascicularis</i>	MFA	42	3♀, 1♂	CIDA, S.A. (Barcelona)
			1♂*	Laboratory Genomic Diversity, NCI-Frederick (USA)
<i>Macaca arctoides</i>	MAR	42	1♂*	Coriell Institute for Medical Research (USA)
<i>Mandrillus sphinx</i>	MSP	42	3♀, 1♂	Parc Zoològic de Barcelona
<b>Platyrrhini</b>				
<i>Cebus apella</i>	CAP	54	2♀, 1♂	CAPRIM, Corrientes (Argentina)
				DAMA, Universidad Nacional de Colombia (Colombia)
				Parque Zoológico Bararida, Barquisimeto (Venezuela)
<i>Cebus nigrivittatus</i>	CNI	52	2♀, 1♂	Parque Zoológico Bararida, Barquisimeto (Venezuela)
				Parque Zoológico El Pinar, Caracas (Venezuela)

### 2.1.1 Cultivo de linfocitos de sangre periférica.

Los linfocitos representan el 35% del total de células sanguíneas y se encuentran en estado quiescente *in vivo*, es decir, en la fase G<sub>0</sub> del ciclo celular. Bajo la acción de mitógenos en cultivos *in vitro*, estas células sufren un proceso de transformación y son capaces de retomar el ciclo celular y proliferar. Durante el cultivo *in vitro* de linfocitos de sangre periférica, el pico máximo de actividad mitótica se alcanza después de las 60-70 horas y es el momento óptimo para la extracción del cultivo y la obtención de cromosomas metafásicos.

#### REACTIVOS Y EQUIPO

- Medio de cultivo: RPMI 1640 (Gibco) complementado con:

- 25% de Suero Fetal Bovino (Gibco)
- 2% de Penicilina (100 u.i./ml )/Estreptomicina (0,1 mg/ml) (Gibco)
- 2 % de L-Glutamina (200 mM) (Gibco)
- 1 % de Heparina sódica (BYK Elmu)
- 1% de tampón HEPES
- Pokeweed (Sigma)
- Fitohemaglutinina (Sigma)
- Colcemid (10 µgr/ml) (Sigma)
- Solución hipotónica: KCl (0.075 M)
- Fijador: metanol (Merk)/acético (Merk) en proporción 3:1
- Tubos de centrífuga con fondo cónico de 10 ml estériles
- Pipetas Pasteur de vidrio
- Portaobjetos de vidrio
- Cabina de flujo laminar
- Estufa a 37° C
- Centrífuga de rotor basculante

## PROTOCOLO

Todas las siembras se realizaron bajo una campana de flujo laminar de tipo vertical tomando todas las precauciones necesarias para mantener las condiciones de esterilidad y evitar la contaminación de los cultivos.

### Siembra:

1. En cada uno de los tubos de centrífuga de 10 ml se colocó 4,5 ml de medio de cultivo completo, 0,25 ml de Pokeweed (estimulador de los linfocitos T y B), 0,25 ml de Fitohemaglutinina (estimulador de los linfocitos T) y 0,5 ml de sangre periférica.
2. Todos los tubos fueron incubados a 37° C durante 72 horas, agitándolos suavemente cada 24 horas con tal de evitar resuspender las células periódicamente y facilitar así la accesibilidad de nutrientes a todas las células.

### Extracción del cultivo:

1. En el caso de los cultivos de linfocitos de Primates Catarrhini (*Macaca* y *Mandrillus*), en los últimos 20 minutos de cultivo se añadió 80 µl de Colcemid. En el caso de los cultivos de Primates Platyrrhini (*Cebus*), el Colcemid se añadió en los últimos 30 minutos de cultivo. El Colcemid es un derivado sintético de la colchicina, inhibidora de

la despolimerización de los microtúbulos del citoesqueleto y provoca que las células en división se detengan en metafase.

2. Centrifugar los tubos a 600g durante 10 minutos.
3. Eliminar del sobrenadante con la pipeta Pasteur.
4. Resuspender el botón celular (*pellet*) en la solución hipotónica (KCl 0,075 M) previamente atemperada a 37° C. Mantener las células en la solución hipotónica durante 30 minutos a 37° C.
5. Centrifugar los tubos a 600g durante 10 minutos.
6. Eliminar el sobrenadante con la pipeta Pasteur.
7. Añadir 10 ml de fijador (metanol/acético) gota a gota al *pellet* con tal de evitar la aglutinación de las células. El acético actúa rompiendo las estructuras celulares membranosas, mientras que el metanol precipita y fija la cromatina.
8. Centrifugar los tubos a 600g durante 10 minutos.
9. Eliminar el sobredanante con la pipeta Pasteur.
10. Repetir los pasos 7, 8 y 9, al menos, dos veces más, con tal de conseguir una buena fijación y unas preparaciones cromosómicas con un mínimo de restos citoplasmáticos.

### 2.1.2 Líneas celulares.

Las líneas celulares utilizadas en el estudio de los lugares frágiles provienen de dos centros diferentes, tal como se muestra en la Tabla 3.1. A continuación se describirá el proceso de extracción celular para la obtención de cromosomas metafásicos.

#### MATERIAL Y EQUIPO

- Medio de cultivo: RPMI 1640 (Gibco) complementado con:
  - 20% de Suero fetal bovino (Gibco)
  - 1% de Penicilina(100 u.i./ml )/Estreptomicina (0,1 mg/ml) (Gibco)
  - 1% de L-Glutamina (200 mM) (Gibco)
- PBS (Sigma)
- Trypsin-EDTA (Gibco)
- Colcemid (10 µgr/ml) (Sigma)
- Solución hipotónica: KCl (0.075 M)
- Fijador: metanol (Merk)/acético (Merk) en proporción 3:1
- Frascos de cultivo de 25cm<sup>2</sup> estériles

- Tubos de centrífuga con fondo cónico de 10 ml estériles
- Pipetas Pasteur estériles
- Pipetas graduadas estériles
- Baño con termostato a 37° C
- Incubador a 37° C con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%
- Centrífuga con rotor basculante

### 2.1.2.1 Línea celular fibroblástica de *Macaca fascicularis*.

Los cultivos celulares se mantienen dentro de los frascos de cultivo en el incubador a 37 °C y con atmósfera controlada de CO<sub>2</sub> al 5%. Se mantiene el cultivo controlando que las células crezcan formando una monocapa y lleguen al estado de confluencia óptima para la extracción.

#### PROTOCOLO

1. Añadir Colcemid (0,02ugr/ml) a los cultivos (frascos de cultivo de 25cm<sup>2</sup>) 180 minutos antes de la extracción.
2. Aspirar el medio de cultivo de los frascos de cultivo con una pipeta graduada estéril.
3. Añadir 5 ml de PBS a los frascos de cultivo para lavar la monocapa de células de los restos de medio.
4. Aspirar el PBS.
5. Añadir 5 ml de tripsina-EDTA a los frascos de cultivo.
6. Incubar los frascos de cultivo a 37° C durante 1 minuto.
7. Agitar los frascos de cultivo para desprender las células de la superficie a la que se han adherido.
8. Traspasar el contenido de los falcon a tubos de centrifuga de 10 ml estériles.
9. Centrifugar a 600g durante 10 minutos.
10. Eliminar el sobrenadante con una pipeta Pasteur y resuspender el *pellet* en seco.
11. Añadir la solución hipotónica KCl (0,075 M) previamente atemperada a 37° C. Mantener las células en la solución hipotónica durante 20 minutos.
12. Centrifugar a 600g durante 10 minutos.
13. Eliminar el sobrenadante con una pipeta Pasteur y resuspender el *pellet* en seco.
14. Añadir 10 ml de fijador (metanol/acético) gota a gota al *pellet* para evitar la aglutinación de las células.
15. Centrifugar los tubos a 600g durante 10 minutos.



16. Decantar el sobrenadante con la pipeta Pasteur.
17. Repetir los pasos 14, 15 y 16, al menos, dos veces más, para conseguir unas preparaciones cromosómicas con un mínimo de restos citoplasmáticos.

### **2.1.2.2 Línea celular linfoblastoide de *Macaca arctoides*.**

A partir de cultivos de una línea celular linfoblastoide, el protocolo de extracción fué el siguiente: (las líneas linfoblastoides crecen en suspensión y no es necesaria la tripsinización).

#### **PROTOCOLO**

1. Añadir Colcemid (0,02 $\mu$ gr/ml) a los cultivos (frascos de cultivo de 25cm<sup>2</sup>) en los últimos 60 minutos previos a la extracción.
2. Transferir el material de los frascos de cultivo a tubos de centrifuga de 10 ml.
3. Centrifugar a 600g durante 10 minutos.
4. Eliminar el sobrenadante con una pipeta Pasteur y resuspender el *pellet* en seco.
5. Añadir la solución hipotónica KCl (0,075 M) previamente atemperada a 37° C. Mantener las células en la solución hipotónica durante 20 minutos.
6. Centrifugar a 600g rpm durante 10 minutos.
7. Eliminar el sobrenadante con una pipeta Pasteur y resuspender el *pellet*.
8. Añadir 10 ml de fijador (metanol/acético) gota a gota al *pellet* con cuidado para evitar la aglutinación de las células.
9. Centrifugar los tubos a 600g durante 10 minutos.
10. Eliminar el sobrenadante con una pipeta Pasteur.
11. Repetir los pasos 8, 9 y 10, al menos, dos veces más, para lavar y obtener unas preparaciones cromosómicas con un mínimo de restos citoplasmáticos.

### **2.1.3 Obtención de preparaciones cromosómicas.**

Una vez lavado y fijado el material celular, se realiza la extensión sobre portaobjetos. Para la obtención de preparaciones cromosómicas se resuspende el *pellet* con 0,5 ml (aproximadamente, en función del tamaño del *pellet*) de fijador. Sobre portaobjetos previamente desengrasados (en metanol a -20° C) se extienden de dos a tres gotas de suspensión celular y se dejan secar a temperatura ambiente. Si las técnicas de tinción no se han de aplicar inmediatamente después de la

extracción del cultivo, se guardan las preparaciones cromosómicas así como la suspensión celular a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 2.2 Técnicas de tinción e identificación cromosómica.

En este trabajo experimental se han aplicado las técnicas de: tinción uniforme, bandeo G y bandeo C. A pesar de que las técnicas de bandeo cromosómico llevan más de 30 años utilizándose de forma habitual tanto en citogenética clínica como experimental, muchos de los mecanismos subyacentes que producen los patrones de bandas son todavía desconocidos.

### REACTIVOS Y EQUIPOS

- Solución Leishman: colorante Leishman (Panreac)/tampón Leishman pH 6,8 en proporción 1:4
- Solución Wright: colorante Wright (Sigma)/tampón Sorensen pH 6,8 en proporción 1:3
- 2xSSC (NaCl 0,03 M, citrato tri-sódico 0,03 M)
- Agua destilada
- Soluciones Etanol (Merck): 70%, 80%, 90%
- Solución  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  al 2% (Merck)
- Solución HCl 0,3 N (Merck)
- Cubetas de vidrio
- Pipetas graduadas de vidrio de 10 ml y 5 ml
- Baño con termostato a  $65^{\circ}\text{C}$
- Microscopio Olympus BX60 acoplado a una telecamara CCD y al sistema informático *GENUS System* (version 2.75) (*Applied Imaging Corporation*)

### 2.2.1 Tinción uniforme.

Con la aplicación de esta técnica se obtiene una tinción uniforme de los cromosomas. Es posible definir el número diploide y visualizar la morfología cromosómica, el tamaño y la posición del centrómero. De la misma forma, revela posibles constricciones secundarias, como pueden ser las NOR, y alteraciones en la estructura longitudinal del cromosoma (reorganizaciones estructurales).

### PROTOCOLO

1. Sumergir las preparaciones cromosómicas en la solución Leishman durante 4 minutos.

2. Lavar con agua destilada y dejar secar a temperatura ambiente.
3. Observar las preparaciones al microscopio, capturar las metafases mediante el sistema informático *GENUS System* y anotar las coordenadas de posición.
4. Realizar el análisis cromosómico.
5. Desteñir las preparaciones cromosómicas para aplicar la siguiente técnica de tinción. Sumergir las preparaciones en una serie de soluciones de etanol (70%-80%-90%-80%-70%) un minuto en cada una de ellas, seguido de dos minutos en una cubeta con agua destilada.
6. Dejar secar las preparaciones a temperatura ambiente.
7. Almacenar las preparaciones a  $-20^{\circ}$  C hasta el momento de aplicar las siguientes técnicas de coloración.

### **2.2.2 Bando G.**

Según la Conferencia de París de 1971 (Paris Conference, 1971), una banda cromosómica se define como una parte del cromosoma que puede distinguirse del segmento adyacente por aparecer más claro o más oscuro mediante una o más técnicas. De esta forma, el cromosoma bandeado se visualizaría como una serie continua de bandas claras y oscuras de diferente grosor. Con el método de bandeo G es posible diferenciar e identificar cada uno de los cromosomas de una especie por su patrón estable de bandas G. La técnica de bandas G utilizada en este trabajo fue la descrita por Seabright (1971), con algunas modificaciones.

#### **PROTOCOLO**

1. Envejecer las preparaciones cromosómicas en una estufa a  $65^{\circ}$  C durante toda una noche.
2. Sumergir las preparaciones en una cubeta con 2xSSC a  $65^{\circ}$  C de 30 segundos a 2 minutos.
3. Lavar con agua destilada.
4. Dejar secar.
5. Teñir las preparaciones en la solución Wright durante 3 minutos.
6. Lavar con agua destilada y dejar secar a temperatura ambiente.
7. Observar al microscopio y capturar mediante el sistema informático *GENUS System* las metafases previamente analizadas con la tinción uniforme.
8. Repetir los pasos 5, 6 y 7 del protocolo de tinción uniforme (*sección 2.2.1*).

### 2.2.3 Bando C.

La técnica de bandas C produce una tinción selectiva de la heterocromatina constitutiva, permitiendo localizar su posición en el cromosoma así como conocer su tamaño. La heterocromatina constitutiva se puede localizar en zonas centroméricas, juxtacentroméricas, intersticiales y terminales. La metodología aplicada es una adaptación de la descrita por Sumner (1972).

#### PROTOCOLO

1. Sumergir las preparaciones cromosómicas en una cubeta de vidrio con la solución de HCl (0,3 N) a temperatura ambiente durante 3 minutos.
2. Lavar con agua destilada.
3. Sumergir las preparaciones cromosómicas en una cubeta de vidrio con la solución  $Ba(OH)_2$  al 2% durante un tiempo variable (entre 30 segundos y 3 minutos) en función del envejecimiento de las preparaciones, especie, individuo, etc.
4. Lavar con agua destilada.
5. Con tal de eliminar los restos de  $Ba(OH)_2$  se sumergen las preparaciones en la solución de HCl (0,3 N) durante 30 segundos y posteriormente en una cubeta con agua destilada durante 30 segundos, agitando en ambos casos.
6. Dejar secar.
7. Sumergir las preparaciones cromosómicas en una cubeta de vidrio con 2xSSC a 65° C durante 15 minutos.
8. Lavar con agua destilada.
9. Teñir las preparaciones con la solución Leishman durante 3 minutos.
10. Lavar con agua destilada y dejar secar a temperatura ambiente.
11. Observar al microscopio las preparaciones y capturar mediante el sistema informático *GENUS System* las metafases previamente analizadas con bandas G.

### 2.2.4 Bando secuencial Uniforme-G-C.

La tinción secuencial permite detectar las anomalías cromosómicas (tinción uniforme), y localizar con precisión la banda cromosómica afectada (bandas G). Las bandas C secuenciales permiten identificar los cromosomas que poseen heterocromatina constitutiva. Con esta técnica de bando secuencial uniforme-G-C es posible identificar el cromosoma afectado así como localizar con precisión los puntos implicados en las anomalías detectadas.

### **2.3 Inducción y análisis de lugares frágiles.**

En este trabajo de investigación se describe la expresión de lugares frágiles inducidos por la afidicolina en diferentes especies de Primates. Las razones de la elección de dicho agente inductor fueron, principalmente, dos: (1) la afidicolina es el agente inductor de la mayor parte de los lugares frágiles comunes descritos en el cariotipo humano y, (2) en la mayoría de los trabajos publicados sobre la inducción de lugares frágiles en diferentes especies de mamíferos, y en Primates en particular, se utiliza la afidicolina como agente inductor. De esta manera nuestros resultados son comparables con los previamente publicados por otros autores.

#### **2.3.1 Inducción de los lugares frágiles.**

##### REACTIVOS Y EQUIPO

- Afidicolina (APC) ( $C_{20}H_{34}O_4$ ) liofilizada (Sigma)
- Medio de cultivo RPMI 1640 complementado (ver pag. 36)
- DMSO (dimetil sulfóxido)
- Eppendorfs de 1,5 ml esterilizados
- Micropipetas 1ml, 50  $\mu$ l y 10  $\mu$ l

##### PROTOCOLO

Preparación de las alícuotas de APC:

1. Resuspender 1 mgr de APC liofilizada en 1450  $\mu$ l de DMSO para obtener una concentración final de 2 mM. La APC es un producto soluble en metanol, etanol y DMSO. Se eligió el DMSO como solvente por su baja toxicidad celular, naturaleza polar y su estructura molecular pequeña y compacta. La utilización de etanol no se recomienda porque es un solvente con una alta toxicidad celular y aumenta la fragilidad cromosómica, interfiriendo en el efecto causado por la APC.
2. Resuspender en 990  $\mu$ l de medio RPMI 1640 complementado 10  $\mu$ l de APC (2 mM) para obtener una concentración final de 0,02 Mm de APC.
3. Alicuotar APC (0,02 mM) en epperdorfs de 1,5 ml.
4. Almacenar las alícuotas hasta su utilización en el congelador a  $-20^{\circ}$  C.

Inducción de lugares frágiles en el medio de cultivo:

En cada uno de los tubos de centrifuga de 10 ml se colocó 4,5 ml de medio de cultivo completo, 0,25 ml de Pokeweed, 0,25 ml de Fitohemaglutinina y 0,5 ml de sangre periférica. De cada muestra de sangre recogida por cada espécimen estudiado los cultivos se distribuyeron y rotularon de la siguiente forma: cultivos control, APC 0,1  $\mu$ M y APC 0,2  $\mu$ M.

El número de cultivos de cada tipo se distribuyó en función del volumen total de sangre recogida por cada espécimen, procurando tener un mínimo de dos cultivos de cada tipo.

A las 72 horas de cultivo:

1. Centrifugar los cultivos a 600g durante 10 minutos.
2. Eliminar el sobrenadante con una pipeta Pasteur.
3. Resuspender el *pellet* en 4,5 ml de medio fresco RPMI 1640 complementado y añadir 0,25 ml de cada mitógeno (Pokeweed y Fitohemaglutinina). Todo el proceso debe hacerse bajo la campana de flujo horizontal para evitar contaminaciones.
4. Añadir la APC:
  - Cultivos APC 0,1  $\mu$ M: Añadir 25  $\mu$ l de APC por cada 5 ml de medio.
  - Cultivos APC 0,2  $\mu$ M: Añadir 50  $\mu$ l de APC por cada 5 ml de medio.
  - Cultivos control: sin APC.
5. Incubar los cultivos 24 horas más a 37° C.
6. Realizar la extracción del cultivo y obtener las preparaciones cromosómicas tal como se ha explicado anteriormente (*sección 2.1.1 y 2.1.3*).

### **2.3.2 Análisis de los lugares frágiles.**

#### **2.3.2.1 Selección de las metafases.**

Las metafases se seleccionaron con la tinción uniforme, se rastrearon las preparaciones con el objetivo de 10 aumentos (10x) buscando que cumplieran las siguientes características: metafases redondeadas, completas, con el mínimo de superposiciones cromosómicas y teñidas adecuadamente. Al pasar al objetivo de inmersión (100x) se capturaron las metafases con el sistema *GENUS System* (version 2.75) (*Applied Imaging Corporation*), se tomaron las coordenadas de posición y se procedió al análisis de las anomalías cromosómicas. Posteriormente se realizaron las bandas G secuenciales en las metafases seleccionadas y se volvieron a capturar con tal de poder

localizar con precisión los cromosomas y las bandas cromosómicas afectadas por las anomalías detectadas con la tinción uniforme.

**2.3.2.2 Criterio de valoración de las anomalías cromosómicas.**

Se computaron como aberraciones cromosómicas las siguientes alteraciones: roturas de cromátide y cromosómicas, *gaps* de cromátide y cromosómicos, trirradiales y translocaciones. Para introducir los datos en el programa estadístico que se explica a continuación, las aberraciones cromosómicas anteriormente citadas se consideraron como eventos únicos.

**2.3.2.3 Análisis estadístico.**

Para determinar qué bandas cromosómicas pueden considerarse frágiles, se aplicó el programa estadístico FSM (versión 995) (*Department of Statistics, Texas University*), programa de MS-DOS diseñado para la identificación estadística de lugares frágiles cromosómicos. Este programa incluye los test estadísticos  $X^2$  y  $G^2$  para determinar qué bandas cromosómicas están significativamente afectadas por roturas y *gaps* ( $\alpha=0,5$ ).

**2.4 Hibridación “in situ” fluorescente (FISH).**

En el conjunto de trabajos presentados en este estudio se utilizaron tres tipos de sondas de DNA en función del objetivo a conseguir: sondas de pintado cromosómico (*WCP*), sonda telomérica ( $(TTAGGG)_n$ ), y por último sondas específicas de banda (*BAC* y *YAC*). En la Tabla 3.2 se resume la procedencia de cada una de ellas, así como el tipo y el método de marcado.

**Tabla 3.2:** Tipos de sondas utilizadas. (\*: Pico de absorción de cada fluorocromo)

Sonda	Marcado	Abs (nm)*	Procedencia
<i>WCP</i>	Indirecto: Digoxigenina	Hapteno	ONCOR
	Directo: FITC	491	<i>National Cancer Institute</i> (Frederick, USA)
<i>Sonda telomérica (TTAGGG)<sub>n</sub></i>	Indirecto: Biotina	Hapteno	<i>Dipartimento Genetica, Università di Pavia</i>
<i>BAC</i>	Directo: FITC	491	<i>National Cancer Institute</i> (Frederick, USA)
	Cy3	550	
	Cy5	649	
<i>YAC</i>	Indirecto: Digoxigenina	Hapteno	<i>University of Michigan</i> (USA)

En función del tipo de sonda utilizada, el protocolo de hibridación *in situ* fluorescente fue ligeramente diferente. Ya que el material utilizado fue, sustancialmente, el mismo, a continuación se detallan todos los reactivos y equipos necesarios de forma general.

## REACTIVOS Y EQUIPOS

- Kit de *Nick Translation* (Gibco). Reactivos:
  - Biotin-16-dUTP
  - BRL A4 (Mix dNTPs, excepto dTTP)
  - BRLC (polimerasaI/DNasaI)
  - Stop buffer
  - Agua destilada
- Columnas Sephadex G-50 (Boeringher)
- Tween 20 (10%) (Boeringher)
- 10xPBS (Oncor)
- 2xSSC (NaCl 0,03 M, citrato tri-sódico 0,03 M)
- NFMD (leche descremada)
- Dextran sulfato (DXS) (Sigma)
- Formamida (Boeringher): 70% formamida/2xSSC pH 7-7.5  
50% formamida/2xSSC pH 7-7.5  
25% formamida/2xSSC pH 7-7.5
- Soluciones de detección: 4xSSC/Tween 20 (0,05%) pH 7
- Tampón de dilución de los anticuerpos: 4xSSC/Tween20/NFMD
- Anticuerpos:
  - Avidina-FITC
  - anti-Avidina
  - Anti-digoxigenina-FITC (ONCOR)
  - *Rabbit anti-sheep* (ONCOR)
  - *Anti-Rabbit-FITC* (ONCOR)
- Solución de trabajo de los anticuerpos para detectar sondas marcadas con Biotina:
  - Avidina-FITC: 1,5 ml tampón de dilución/3.75 µl Avidina-FITC
  - Anti-Avidina: 1,5 ml tampón de dilución/15 µl anti-Avidina
- Tampón de hibridación: 25% formamida/4xSSC/1% Tween 20/10% DXS



- *Antifade*: 1% p-fenilenediamina (Sigma)/glicerina (Sigma)/1xPBS
- 1xPBD (detergente de tampón fosfato): Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Sigma)/NP-40 (Sigma)
- PBS/50 mM MgCl<sub>2</sub>
- Paraformaldehído 4% (Sigma)
- DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol) liofilizado (Sigma)
- DNA de esperma de salmón (SSD) (Amershan Pharmacia)
- *Human Cot-1 DNA* (Invitrogen)
- RNAsa (Roche)
- Pepsina A (Sigma)
- NaAc 3 M
- HCl 0,01 M
- Etanol (Merck)
- Agua bidestilada
- Cámara húmeda
- Baño con termostato
- Estufa a 37° C
- Termociclador
- *Thermomixer compact* (Eppendorf)
- Cubetas de tinción
- Cubreobjetos de plástico (ONCOR)
- Cubreobjetos de vidrio (25x25 mm y 25x50 mm)
- Cola de encuadernar
- Tubos *Eppendorf* de 1,5 ml estériles
- Microscopio de epifluorescencia Olympus BX60 con filtros específicos para FITC, Cy3, Cy5 y DAPI conectado a una cámara de vídeo CCD y a un ordenador PC dotado con el sistema de análisis de imágenes *GENUS System (version 2.75)* (*Applied Imaging Corporation*)

#### **2.4.1 Pintado cromosómico comparativo (Zoo-FISH).**

Se utilizaron dos tipos de sondas de pintado cromosómico de todos los cromosomas humanos:

1. Sondas marcadas de forma indirecta conjugadas con Digoxigenina (DIG).
2. Sondas marcadas de forma directa con FITC.

## PROTOCOLO

### Método 1: Sonda comercial conjugada con DIG.

#### Desnaturalización de la sonda:

1. Incubar el vial de sonda a 37° C durante 5 minutos.
2. Traspasar 8 µl de la sonda a un eppendorf estéril (se utilizan 8 µl para hibridar una superficie de 25x25 mm de un portaobjetos).
3. Desnaturalizar la sonda a 72° C durante 10 minutos.
4. Dejar reasociar el DNA repetitivo de la sonda a 37° C en una cámara húmeda durante 2 horas.

#### Preparación del portaobjetos y desnaturalización del DNA cromosómico:

Extraer los portaobjetos del congelador una hora antes de iniciar la hibridación, y mantenerlos a temperatura ambiente. Media hora antes de que finalice el tiempo de reasociación del DNA repetitivo de la sonda, proceder a la preparación de los portaobjetos para la hibridación.

1. Deshidratación de las preparaciones sumergiéndolas en una serie de soluciones con etanol al 70%, 80% y 95% durante 2 minutos en cada paso, a temperatura ambiente.
2. Dejar secar a temperatura ambiente.
3. Desnaturalización del DNA cromosómico: sumergir los portaobjetos en una solución de Formamida al 70% en 2xSSC a 72° C  $\pm$ 2° C durante 2 minutos.
4. Para parar la reacción de desnaturalización, sumergir los portaobjetos en una serie de soluciones frías (-20° C) con etanol al 70%, 80% y 95%, 2 minutos en cada una.
5. Dejar secar.

#### Hibridación:

1. Transcurridas las dos horas de incubación de la sonda a 37° C, colocar la sonda sobre la superficie del portaobjetos seleccionada para la hibridación.
2. Colocar un cubreobjetos de vidrio (25x25 mm) sobre la gota que contiene la sonda.
3. Sellar portaobjetos y cubreobjetos con la cola de encuadernar.
4. Dejar hibridar en una cámara húmeda introducida en una estufa a 37° C y en oscuridad, durante 72 horas.

Detección y amplificación de la señal de hibridación:

1. Eliminar, con cuidado, la cola de sellado y el cubreobjetos con unas pinzas.
2. Sumergir el portaobjetos en una cubeta con 2xSSC a 72° C  $\pm$ 2° C durante 2 minutos.
3. Sumergir el portaobjetos en 1xPBD a temperatura ambiente, durante 2 minutos, con tal de eliminar los restos de 2xSSC.
4. Eliminar el exceso de 1xPBD.
5. Colocar sobre el portaobjetos 40  $\mu$ l del primer anticuerpo (Anti-digoxigenina conjugada a FITC).
6. Colocar sobre el portaobjetos un cubreobjetos de plástico y dejar en la cámara húmeda a 37°C durante 15 minutos.
7. Retirar el cubreobjetos de plástico y realizar dos lavados de 2 minutos cada uno en 1xPBD.
8. Eliminar el exceso de 1xPBD.
9. Colocar sobre el portaobjetos 40  $\mu$ l del segundo anticuerpo (*rabbit anti-sheep*).
10. Repetir los pasos 6, 7 y 8.
11. Colocar sobre el portaobjetos 40  $\mu$ l del tercer anticuerpo (*anti-rabbit* conjugado a FITC).
12. Repetir los pasos 6, 7 y 8.
13. Sumergir la preparación cromosómica en una cubeta con DAPI (100ngr/ml).
14. Montar las preparaciones con 15  $\mu$ l de *Antifade*.
15. Sellar con laca de uñas.
16. Observar al microscopio de fluorescencia.
17. Capturar las metafases que presentan señales de hibridación con el sistema de análisis de imágenes *GENUS System* y almacenarlas en formato JPG o TIFF para su posterior análisis.

Método 2: Sonda no-comercial marcada con FITC.

Las sondas WCP no-comerciales fueron sintetizadas y marcadas en el *National Cancer Institute* (Frederick, USA) mediante DOP-PCR (Stanyon y col., 2002). Al tratarse de productos de PCR, antes de utilizarla para FISH deben de purificarse con tal de eliminar los restos de sales y productos de la PCR. Para ello se procede a la precipitación con etanol.

## Preparación de la sonda:

1. En eppendorf de 1,5 ml estéril se prepara la mezcla de precipitación:
  - 3  $\mu$ l sonda
  - 3  $\mu$ l Cot-1 DNA
  - 1  $\mu$ l SSD
  - 1 volumen NaAc 3 M
  - 3 volumen etanol absoluto (-20° C)
2. Dejar precipitar la sonda a -20° C durante toda una noche.
3. Centrifugar a 14000 rpm a 4° C durante 30 minutos.
4. Eliminar el sobrenadante por decantación y lavar dos veces con etanol al 70%, sin resuspender el precipitado.
5. Dejar secar el precipitado durante 1 hora en el *Thermomixer* a 37° C.
6. Añadir 14  $\mu$ l de tampón de hibridación al precipitado. Dicho volumen está definido en función del área a hibridar sobre en portaobjetos (25x25 mm).
7. Mezclar el precipitado y el tampón en el *Thermomixer* a 37° C durante 1 hora.
8. Desnaturalizar la mezcla de hibridación a 80° C durante 10 minutos.
9. Dejar reasociar a 37° C durante 1 hora.

## Preparación del portaobjetos y desnaturalización del DNA cromosómico:

1. Extraer los portaobjetos del congelador y envejecerlos durante 1 hora en estufa a 65° C.
2. Desnaturalización del DNA cromosómico: sumergir los portaobjetos en una solución de formamida al 70% en 2xSSC a 65° C  $\pm$ 2° C durante 1 minuto y 30 segundos.
3. Para parar la reacción de desnaturalización, sumergir los portaobjetos en una serie de soluciones frías (-20° C) con etanol al 70%, 80% y 95%, 2 minutos en cada una.
4. Dejar secar.

Hibridación: Repetir el proceso del Método 1 (página 49).

## Detección de la señal de hibridación:

1. Eliminar con cuidado la cola de sellado y el cubreobjetos con unas pinzas.
2. Sumergir el portaobjetos en una cubeta con 2xSSC a 42° C  $\pm$ 2° C durante 5 minutos.

3. Sumergir el portaobjetos en una cubeta con 50% formamida/2xSSC a 42° C  $\pm$ 2° C durante 10 minutos.
4. Realizar tres lavados de 5 minutos cada uno en 2xSSC a 42° C  $\pm$ 2° C.
5. Sumergir la preparación cromosómica en una cubeta con DAPI (100ngr/ml).
6. Lavado rápido en una cubeta con 2xSSC, seguido de otro lavado rápido en agua destilada, todo a temperatura ambiente.
7. Dejar secar a temperatura ambiente.
8. Montar las preparaciones con 15  $\mu$ l de *Antifade*.
9. Sellar con laca de uñas.
10. Observación al microscopio de fluorescencia.
11. Capturar las metafases que presentan señales de hibridación con el sistema de análisis de imágenes *GENUS System* y almacenarlas en formato JPG o TIFF para su posterior análisis.

#### 2.4.2 Sonda telomérica.

La sonda telomérica utilizada es una sonda no-comercial, sintetizada mediante PCR en el *Dipartimento di Genetica e Microbiologia* de la *Università di Pavia* (Italia). Consiste en una mezcla de polinucleótidos sintéticos (TTAGGG)<sub>n</sub> de longitud variable.

#### PROTOCOLO

Marcado de la sonda mediante la reacción de *nick translation*:

1. Para el marcaje de 2  $\mu$ gr de DNA (200ngr/  $\mu$ l) se prepara una mezcla de los reactivos del kit de *nick translation*. Para un volumen final de 100  $\mu$ l se necesitan:
  - 10  $\mu$ l sonda telomérica
  - 10  $\mu$ l BRL A4 (Mix dNTPs, excepto dTTP)
  - 10  $\mu$ l BRLC (polimerasaI/DNasaI)
  - 2  $\mu$ l Biotin-16-dUTP
  - 68  $\mu$ l H<sub>2</sub>O
2. Incubar la reacción a 16 ° C durante 90 minutos en un termociclador.
3. Añadir 10  $\mu$ l de *Stop Buffer*, para detener la reacción. Mantener en hielo picado.
4. Filtración de la mezcla por una columna de Sephadex G-50.

5. Precipitación de la sonda: Añadir a la mezcla purificada 0,1 volúmenes de NaAC y 3 volúmenes de etanol absoluto y dejar precipitar a  $-20^{\circ}$  C durante toda una noche.
6. Centrifugar a 14000 rpm durante 20 minutos a  $4^{\circ}$  C.
7. Eliminar el sobrenadante por decantación.
8. Añadir 100  $\mu$ l de etanol absoluto ( $-20^{\circ}$  C).
9. Repetir los pasos 6 y 7.
10. Resuspender en precipitado en 20  $\mu$ l de agua destilada para llegar a la concentración final de sonda de 100 ngr/ $\mu$ l.
11. Preparar la mezcla de hibridación: Para obtener una concentración final de 100 ngr de sonda por portaobjetos en un área de hibridación de 25x25 mm se mezclan en un eppendorf de 1,5 ml:
  - 1  $\mu$ l sonda telomérica (100 ngr/ $\mu$ l)
  - 7  $\mu$ l tampón de hibridación
  - 2  $\mu$ l H<sub>2</sub>O
12. Desnaturalizar la sonda a  $80^{\circ}$  C durante 10 minutos.
13. Mantener la sonda en hielo picado hasta que las preparaciones cromosómicas estén preparadas para el momento de la hibridación.

Preparación del portaobjetos y desnaturalización del DNA cromosómico:

Se preparan las extensiones cromosómicas un día antes de la hibridación.

a) Tratamiento con RNAsa: 10  $\mu$ l RNAsa (10 mgr/ml) en 1 ml 2xSSC

1. Colocar 100  $\mu$ l de solución RNAsa sobre el portaobjetos y cubrir con un cubreobjetos de vidrio.
2. Incubar dentro de una cámara húmeda a  $37^{\circ}$  C durante 60 minutos.
3. Sumergir el portaobjetos dos veces en una cubeta con 2xSSC a temperatura ambiente durante 5 minutos.
4. Deshidratación de la preparación sumergiéndola en una serie de soluciones con etanol al 70%, 80% y 95% durante 2 minutos en cada una, a temperatura ambiente.
5. Dejar secar a temperatura ambiente.

b) Tratamiento con pepsina: 0,005% pepsina/ 0,01 M HCl

1. Incubar el portaobjetos en una cubeta con 0,005% pepsina/ 0,01 M HCl a 37° durante 30 minutos.
2. Lavar en una cubeta con 1xPBS durante 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Traspasar la preparación a una cubeta con PBS/50 mM MgCl<sub>2</sub> durante 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Traspasar la preparación a una cubeta con 4% paraformaldehido durante 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Lavar en una cubeta con 1xPBS durante 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Deshidratación de la preparación sumergiéndola en una serie de soluciones con etanol al 70%, 80% y 95% durante 2 minutos en cada una, a temperatura ambiente.
7. Dejar secar.

c) Desnaturalización:

1. Desnaturalización del DNA cromosómico: sumergir los portaobjetos en una solución de formamida al 70% en 2XSSC a 75° C ±2° C durante 3 minutos.
2. Deshidratación de la preparación sumergiéndola en una serie de soluciones con etanol al 70%, 80% y 95% durante 2 minutos en cada una, a temperatura ambiente.
3. Dejar secar.

Hibridación:

1. Colocar 10 µl de la mezcla de hibridación sobre la superficie del portaobjetos seleccionada para la hibridación (25x25 mm).
2. Sellar con cola de encuadernar.
3. Incubar a 37° C en una cámara húmeda durante toda la noche.

Detección y amplificación de la señal de hibridación:

1. Eliminar con cuidado la cola de sellado y el cubreobjetos con unas pinzas.
2. Lavados de baja estringencia:
  - Tres lavados de 5 minutos en 25% formamida/2xSSC a 37° C
  - Tres lavados de 5 minutos en 2xSSC a 37° C
  - Un lavado de 5 minutos en 4xSSC/Tween20 0,05% a temperatura ambiente

3. Preincubación del portaobjetos con 100  $\mu$ l de tampón de dilución de los anticuerpos durante 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Incubación con el primer anticuerpo (anti-Avidina): colocar sobre el portaobjetos 100  $\mu$ l de la solución de trabajo de los anticuerpos preparada previamente.
5. Colocar un cubreobjetos de vidrio de 25x50 mm y dejar en cámara húmeda durante 20 minutos a temperatura ambiente.
6. Eliminar el cubreobjetos y realizar tres lavados de 5 minutos cada uno en 4xSSC/Tween 20 a temperatura ambiente.
7. Incubación con el segundo anticuerpo (Avidina conjugada con FITC): colocar sobre el portaobjetos 100  $\mu$ l de la solución de trabajo de los anticuerpos preparados previamente.
8. Eliminar el cubreobjetos y realizar un lavado de 5 minutos en 4xSSC/Tween 20 a temperatura ambiente.
9. Realizar dos lavados de 5 minutos cada uno en 1xPBS a temperatura ambiente.
10. Sumergir la preparación cromosómica en una cubeta con DAPI (100 ngr/ml).
11. Lavado rápido en una cubeta con 2xSSC, seguido de otro lavado rápido en agua destilada, todo a temperatura ambiente.
12. Dejar secar a temperatura ambiente.
13. Montar las preparaciones con 15  $\mu$ l de *Antifade*.
14. Sellar con laca de uñas.
15. Observación al microscopio de fluorescencia.
16. Capturar las metafases que presentan señales de hibridación con el sistema de análisis de imágenes *GENUS System* y almacenarlas en formato JPG o TIFF para su posterior análisis.

### **2.4.3 Sondas específicas de bandas: BACs y YACs.**

Las sondas específicas de bandas utilizadas en este estudio provienen del banco de datos del *National Cancer Institute* (Frederick, USA). Se tratan de cromosomas artificiales de bacteria (BAC) y levadura (YAC) que contienen insertos de DNA genómico humano específicos para una banda cromosómica de 200 Kb y de longitud aproximadamente en el caso de los BACs y hasta 1000Kb en el caso de los YACs.



## PROTOCOLO

Se tratan de sondas marcadas de forma directa mediante PCR y el Método 2 de hibridación *in situ* es el mismo utilizado para WCP no-comerciales descrito en la página 50.