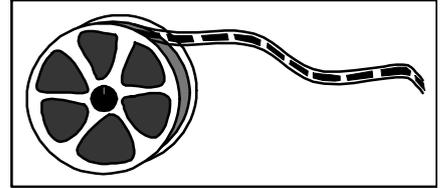


## A MODO DE INTRODUCCIÓN

El estudio de los cromosomas como entidades portadoras de la información genética debe hacerse con mesura, sin caer en el misticismo críptico de considerar al cromosoma “algo más” que una asociación de ADN y proteínas ni en la simplificación de considerar la secuencia de nucleótidos como la explicación de toda la información genética.

Es normal que tratando de hacer símiles para la comprensión de conceptos por los alumnos se definan v.g. locus como un marco; una ventana de reloj, algo donde está encajado el gen.

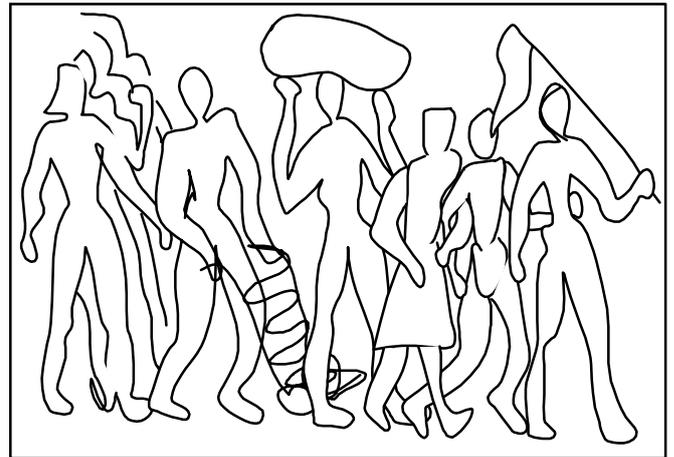
La impresión que este tipo de definiciones trae emparejada es que, al igual que un carrete de fotografía tiene un soporte donde se van impresionando las imágenes y unas muescas laterales para poder funcionar correctamente, el cromosoma tiene “algo” (etéreo o físico) donde se van colocando los genes, además de una serie de estructuras (p.e. centrómero y telómeros) necesarias para su correcto funcionamiento pero que no están incluidas en el concepto de locus.



Si se desea poner un símil, sería más ajustado a la realidad del concepto de locus el de la situación de una persona concreta en una fila para sacar entradas de teatro. Si la persona se quita no queda nada y si permanece está entre otras dos, con paraguas, carrito de la compra e impedimenta en general que le son propios a ella o al grupo de amigos que juntos están en la fila.

El problema de este tipo de explicaciones es que llegados a este punto es estrictamente necesario empezar a complicar el modelo pues la fila tiene un comportamiento corporativo (avanza, se para....) como una entidad de rango superior a la suma de sus componentes. Es la interacción de los componentes entre sí y con el medio en el que están el que determina su comportamiento.

En el otro extremo se encuentran casos que relacionan directamente el gen o la secuencia con el fenotipo, como el análisis divulgativo que se ha hecho de los trabajos de Bono y Bargman sobre el carácter social o solitario de *Caenorhabditis elegans* publicado en Cell en 1998.



*C. elegans* tiene un receptor de neuropéptidos funcional tanto si en una posición concreta de su cadena aminoacídica tiene valina como si tiene fenilalanina.

Por otra parte *C. elegans* manifiesta una conducta solitaria en algunos casos y en otros es social; al hacer el análisis de aminoácidos del receptor de neuropéptidos se observa que los solitarios portan valina y los sociales fenilalanina. Para excluir cualquier otro cambio asociado a la variación de aminoácidos y comportamiento se efectuaron experimentos de mutagénesis dirigida, observándose que el cambio aislado de la secuencia codificadora de valina por la de fenilalanina trae parejo el cambio de comportamiento de solitario a social.

Aunque podría parecer impecable la conclusión “la fenilalanina es responsable del carácter social de *C. elegans*” no debe caerse en esta simplificación, sería como considerar que el manguito de la gasolina es el responsable de la velocidad que alcanza un coche ya que si se disminuye su diámetro el coche va más lento.

Tampoco es estrictamente correcto considerar que hay un gen (productor del receptor de neuropéptidos) que es responsable del carácter social, pero estas afirmaciones se utilizan mucho y están llenas de utilidad en el análisis genético.



EL COMPORTAMIENTO CORPORATIVO NO ES EL MISMO QUE EL DE CADA GEN INDIVIDUALMENTE CONSIDERADO

DE MOMENTO NO ES POSIBLE EXTRAPOLAR EL COMPORTAMIENTO CORPORATIVO DE LOS GENES EN LOS CROMOSOMAS DE LA SUMA DE LOS COMPORTAMIENTOS INDIVIDUALES DE LOS GENES.

El estudio de los cromosomas y su comportamiento es el primer paso del camino hacia el conocimiento de los controles supragénicos que tienen los fenotipos.

# CITOGENÉTICA

**Definición:** (Sutton 1903) La citogenética es el campo de investigación que se desarrolla a partir de dos ciencias, la genética y la citología.

La citogenética tradicionalmente comprende el estudio del comportamiento cromosómico durante la mitosis y la meiosis, así como su relación con la transmisión y recombinación de los genes.

Además en la actualidad se añade en la citogenética el estudio de la estructura de los cromosomas con la idea amplia de considerar cromosoma como un continuo en el ciclo celular formado por el DNA y sus asociados.

## Nacimiento y antecedentes:

Del mismo modo que la genética nace al tratar de contestar la pregunta ¿cómo se transmiten los caracteres?, la citogenética tiene su nacimiento en la cuestión ¿dónde están los genes?

La primera respuesta la presentaron a la comunidad científica de manera simultánea Walter SUTTON (USA) y Theodor BOVERI (Alemania) cada uno independientemente, recogiendo los conocimientos que en el momento se tenían, postularon en 1902 la TEORÍA CROMOSÓMICA DE LA HERENCIA (los genes están situados sobre los cromosomas).

En ese momento los autores de esta teoría conocían los trabajos de:

- 1865 G. MENDEL (Transmisión de los caracteres).
- 1875 E. STRASBURGER (mitosis vegetal)
- 1877 E. STRASBURGER (fusión de núcleos en la fecundación vegetal).
- 1882 W. FLEMMING (mitosis animal; 1ª descripción de cromosomas que llama cromatina).
- 1882 - 1885 VARIOS (constancia del número de cromosomas).
- 1885 A. WEISMANN y E. STRASBURGER (Proponen: la cromatina es la base de la herencia).
- 1888 E. STRASBURGER (meiosis en plantas).
- 1888 Van BENEDEEN (gametos portan  $\frac{1}{2}$  del número de cromosomas)
- 1888 T. BOVERI (identidad e individualidad persistente de los cromosomas).
- 1892 T. BOVERI (meiosis en *Ascaris*; apareamiento de los cromosomas).
- 1900 H. DE VRIES, C. CORRENS, E. TSCHERMAK (redescubren los trabajos de Mendel y los corroboran con otros organismos).
- 1901 C.E. McCLUNG (correlación entre cromosomas especiales y sexo).

En síntesis sabían que:

- Los gametos deben ser los portadores de la información.
- Los gametos de distinto sexo aportan, en principio, la misma cantidad de información genética.
- Los gametos de distinto sexo son muy diferentes y la estructura más parecida en los dos sexos es el núcleo.
- Los espermatozoides prácticamente sólo llevan núcleo.
- Los elementos más conspicuos de los núcleos son los cromosomas.

En ese momento SUTTON y BOVERI proponen: LOS GENES ESTÁN SITUADOS SOBRE LOS CROMOSOMAS pero.....

Objeciones a la teoría cromosómica de la herencia.

La principal contestación que se hizo a la teoría fue que no presentaba pruebas, proponía sólo indicios por paralelismo entre genes y cromosomas y además:

Los cromosomas desaparecen en interfase.

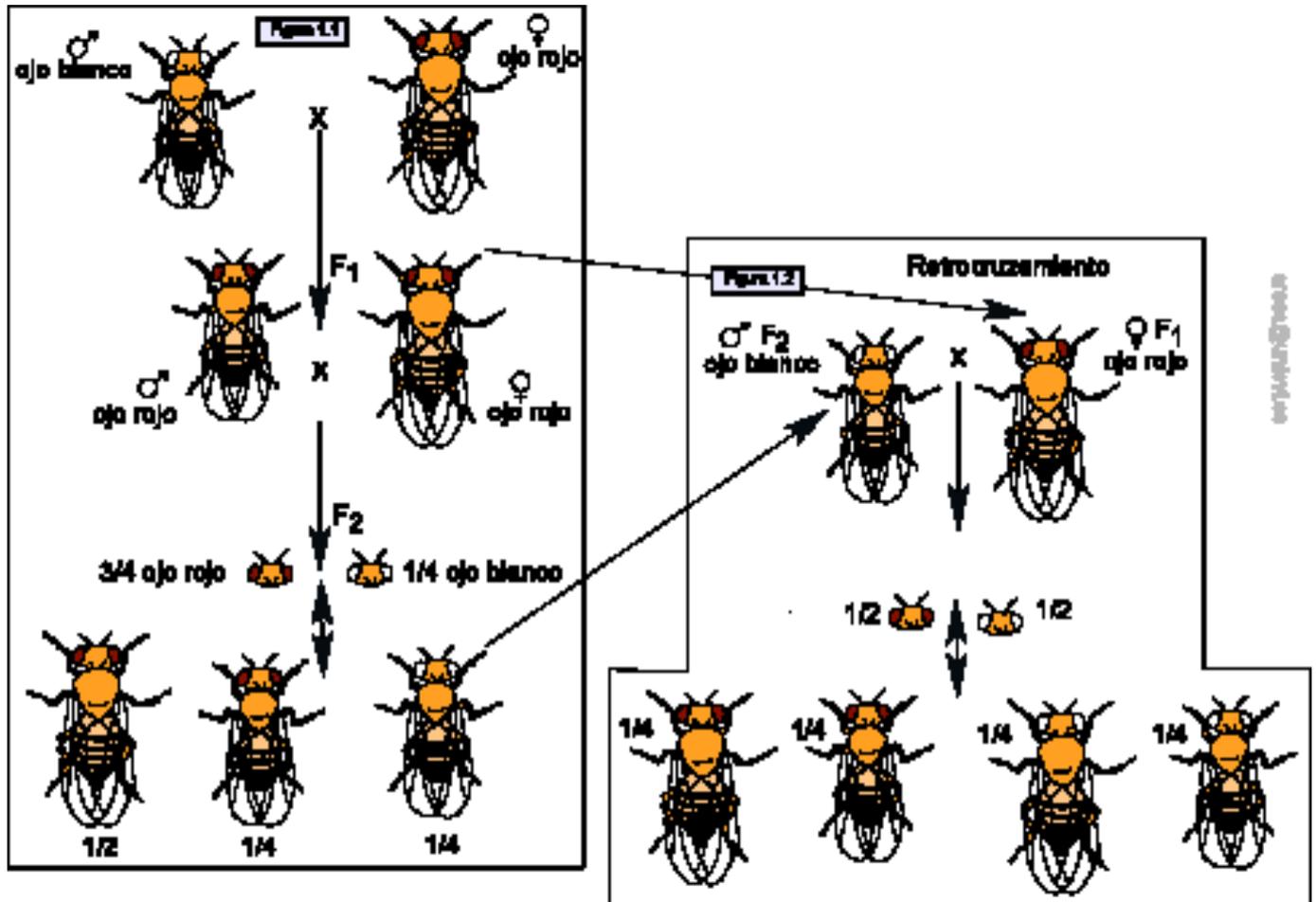
No estaba probado que los cromosomas fuesen estructuras estables, es decir: ¿eran y contenían lo mismo al desaparecer y al reaparecer?

**EL CROMOSOMA:** El término fue acuñado por Waldeyer en 1888 y en la actualidad, desde el punto de vista genético se define el cromosoma como “una estructura de ligamiento que está constituida por una secuencia lineal específica de información genética”. Una definición un poco más citológica pero igualmente actual podría ser: “son estructuras autorreplicativas (de complejidad diferente en eucariotas y procariotas) cuyo número por célula, morfología y organización son características específicas del organismo”.

Estas definiciones no podían hacerse ni cuando Strasburger vio los primeros cromosomas en vegetales, ni cuando Fleming los descubrió en animales ni cuando Waldeyer inventó el término ni tan siquiera cuando se postuló la teoría cromosómica de la herencia. Probablemente en el principio del siglo XX la definición de cromosoma sería: “estructuras inestables que aparecen al principio de las divisiones celulares, durante las que tienen un comportamiento característico y que desaparecen al final de ellas. El número y la morfología de los cromosomas son específicos de la especie y empiezan siendo estructuras dobles (o se ven dobles al poco de aparecer) y acaban escindiéndose en dos estructuras sencillas”.

## TEORÍA CROMOSÓMICA DE LA HERENCIA (“los genes están situados en los cromosomas”)

En el momento en que Morgan encontró en el laboratorio un macho de ojos blancos, la comunidad científica discutía con cierta vehemencia sobre la propuesta de Sutton y Boveri, pero Morgan consideraba prioritario comprobar una vez más que el nuevo mutante de *Drosophila melanogaster* se comportaba de acuerdo a los postulados de Mendel y lo cruzó con una hembra de ojos rojos (Fig.1.1). La F1 resultó homogénea de ojos rojos (rojo domina sobre

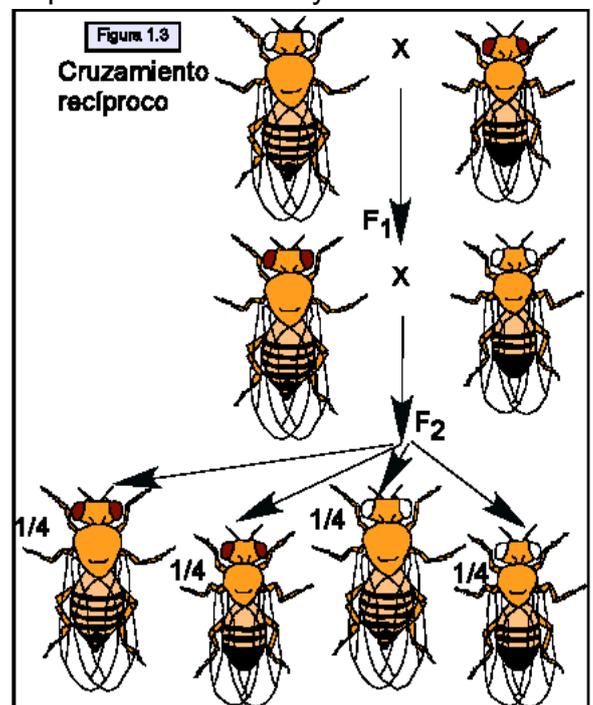


blanco) y la F2, segregó 3/4 rojo; 1/4 blanco como en los experimentos mendelianos pero todos los individuos de ojos blancos eran machos. Sigue los pasos de Mendel y retrocruza hembra F1 y macho de ojo blanco (Fig.1.2).

La descendencia es la esperada según los postulados de Mendel.

La obtención de hembras de ojos blancos en el retrocruzamiento permite abordar el cruzamiento recíproco, hembra de ojo blanco y macho de ojo rojo (Fig. 1.3). En este caso la F1 resulta diferente, todos los machos son de ojo blanco y todas las hembras de ojo rojo, y la F2 resulta igual que el retrocruzamiento. Las irregularidades respecto a los postulados de Mendel están asociadas al carácter sexo. El color blanco se presenta tanto en machos como en hembras pero, por lo que se observa en la F2 del primer cruce (Fig. 1.1) y en la F1 del segundo (Fig. 1.3), el color de ojo no se hereda independientemente del carácter sexo.

En aquellos años se suponía que la determinación del sexo en *Drosophila* era XX-X0, pero como para esta explicación es lo mismo, se

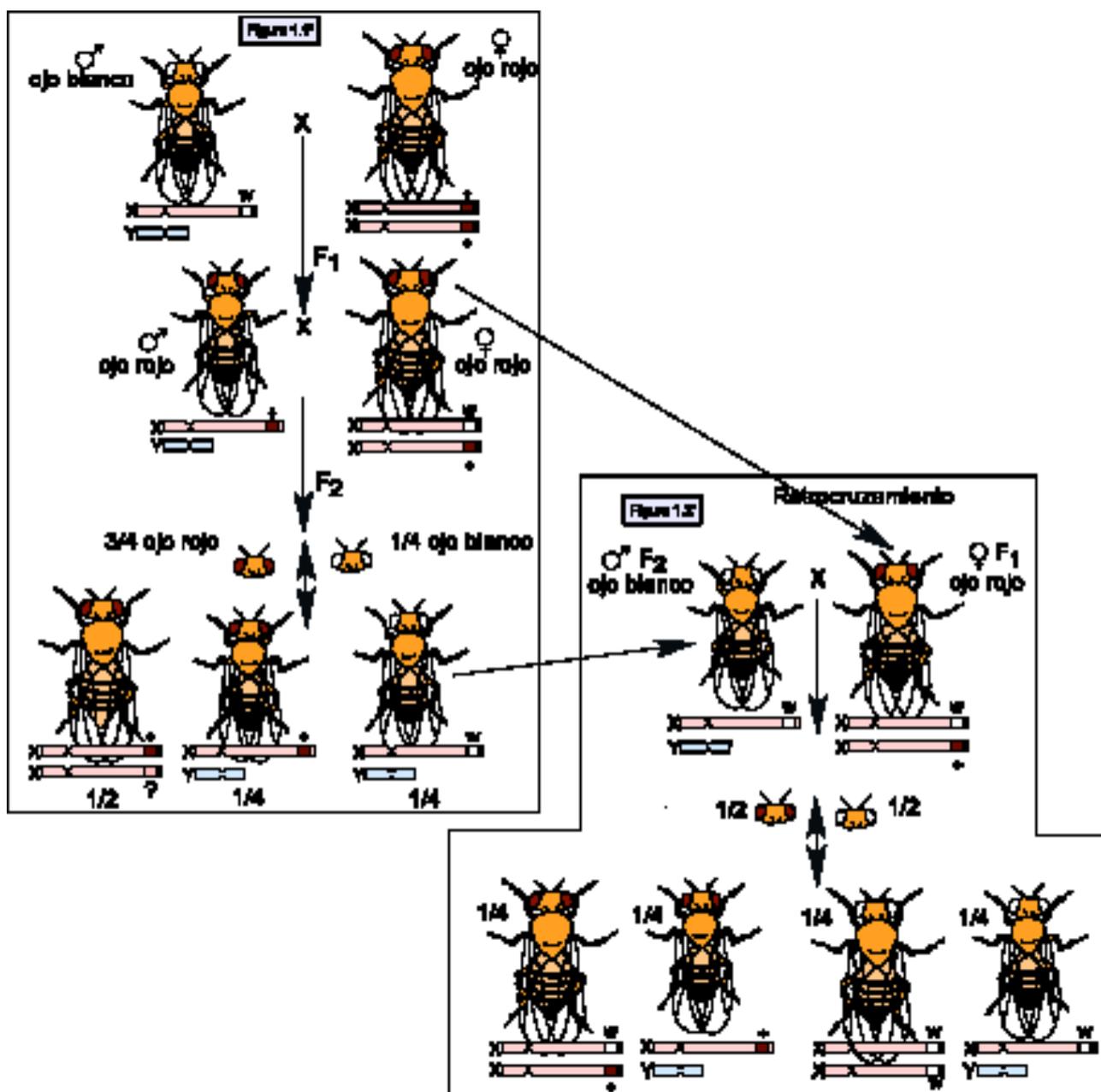


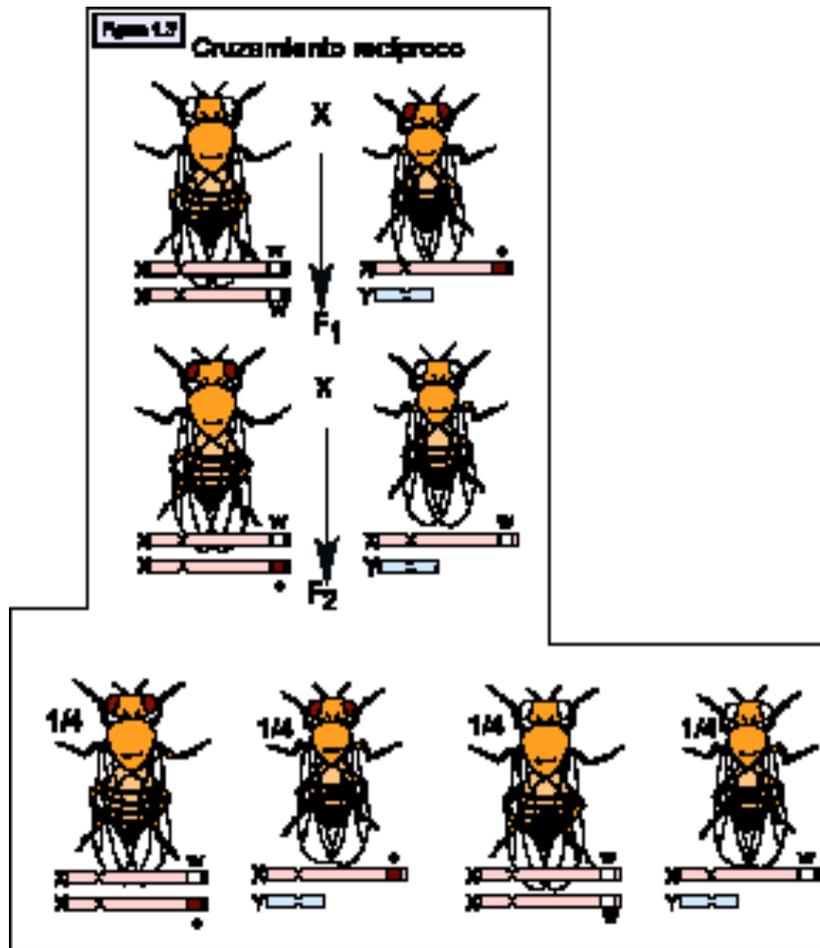
utiliza la nomenclatura correcta (XX hembra normal; XY macho normal; X0 macho estéril; Y0 inviable; 00 inviable; XXX normalmente inviable pero sobreviven unas pocas hembras).

Teniendo en cuenta estos datos y sabiendo que el carácter sexo de un individuo está directamente relacionado con ciertos cromosomas,

Morgan propone la siguiente hipótesis explicativa: Si el sexo de las moscas estuviese determinado por el número de cromosomas X que lleva cada individuo (recuérdese que se había establecido una correlación positiva entre los cromosomas X y el sexo) los resultados obtenidos podrían explicarse si los genes determinantes del color del ojo se encontrasen en el cromosoma X.

Si el carácter "color de ojos" estuviese controlado por un factor que se situase sobre los cromosomas especiales relacionados con el sexo, se explicarían los resultados que no se ajustan a los presupuestos mendelianos. (Fig. 1.1'; 1.2'; 1.3').





Los experimentos de Morgan no prueban que el gen está en los cromosomas. Establece una relación directa entre el sexo y el carácter "color de ojo".

En su momento se sabía:

sexo--directamente relacionado con cromosomas

sexo--directamente relacionado con carácter

deduce: cromosomas--directamente relacionados con carácter

(los genes están sobre los cromosomas)

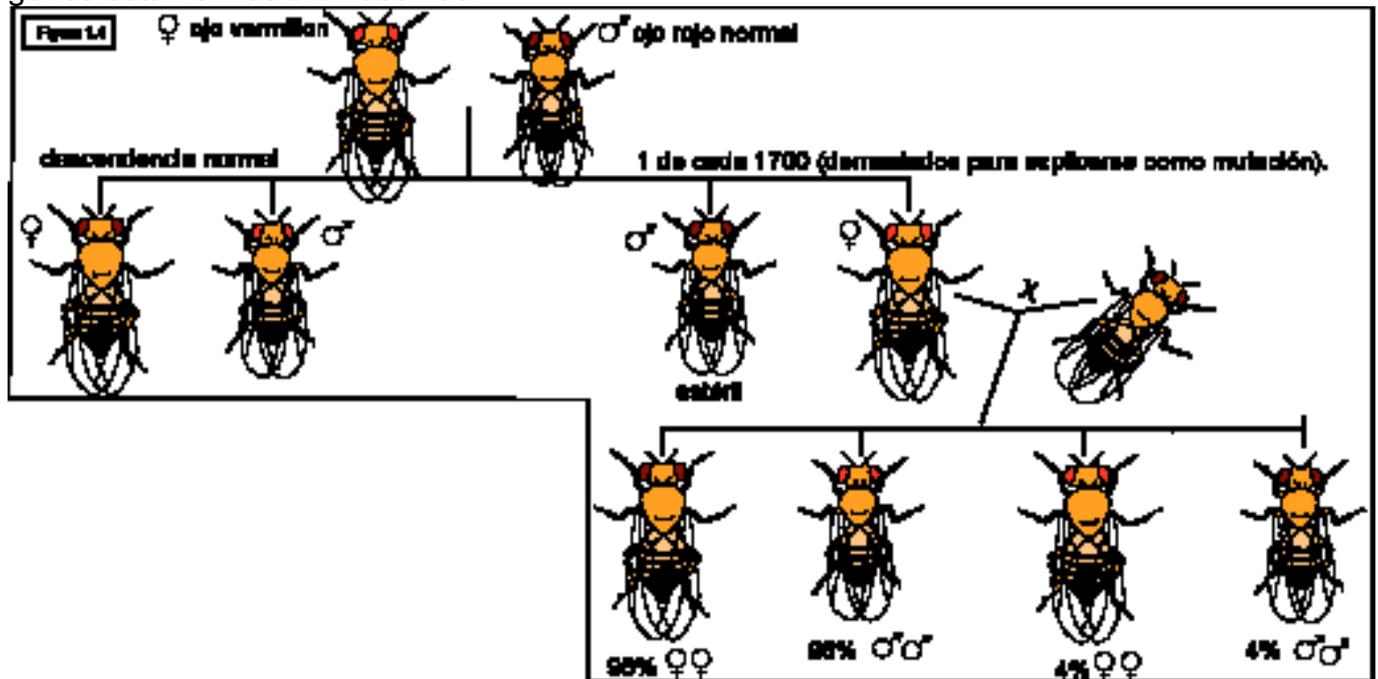
No prueba nada pues existen otras muchas posibles localizaciones de los genes que permitirían interpretar los resultados (por ejemplo, cualquier estructura que se encuentre en el núcleo al igual que los cromosomas).

Por otra parte los machos y las hembras no sólo se diferencian en los cromosomas, tienen distinto metabolismo, desarrollo o fisiología. También pueden existir distintos niveles de manifestación por diferencias en el sexo.

## DEMOSTRACIÓN DE LA TEORÍA CROMOSÓMICA DE LA HERENCIA

(Calvin Bridges 1916)

Cuando ya se sabía que  $XX \text{ ♀}$ ;  $XY \text{ ♂}$ ;  $XXY \text{ ♀}$ ;  $XO \text{ ♂}$  estéril;  $XXX$  mueren,  $YY$  mueren; Bridges trabajó con otro mutante de color de ojos ligeramente más claro que el rojo normal, llamado *vermilion* (*v*) y sus experimentos se consideran hoy la prueba irrefutable de que los genes están en los cromosomas.

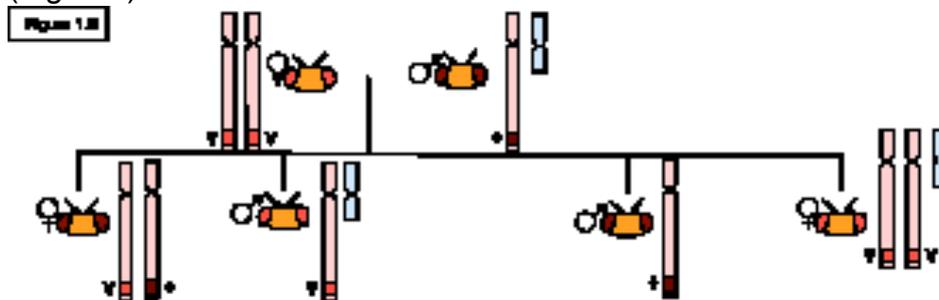


Al estudiar descendencias amplias de cruzamientos entre hembras vermilion y machos normales (fig.1.4) encuentra una amplia mayoría de descendientes hembras de ojos normales y machos vermilion, pero 1 de cada 1700 aproximadamente era o hembra vermilion o macho normal y estéril. Las hembras vermilion cruzadas con machos normales fértiles, producían una descendencia de:

hembras - 96% normales, 4% vermilion

machos - 96% vermilion, 4% normales

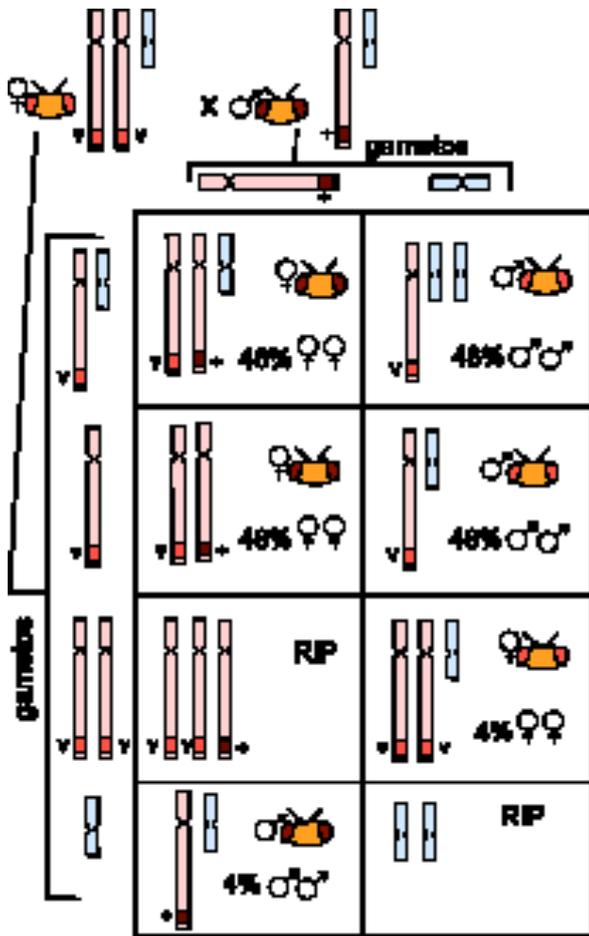
Bridges conociendo el fenómeno de la “no-disyunción” cromosómico, con frecuencias similares a las de los individuos no esperados en las descendencias, propone la siguiente explicación (Fig. 1.5):



Del cruzamiento de una hembra vermilion (homocigoto vermilion) con un macho normal (hemicigoto normal), además de la F1 esperada de hembras normales heterocigotas y machos vermilion hemicigotos,

aparecen 1 de cada 1700 aproximadamente era o hembra vermilion ( $XXY$  homocigoto vermilion) o macho normal y estéril  $XO$  hemicigoto normal.

Las hembras  $XXY$  vermilion se cruzan con machos normales para obtener descendencias



otro mutante de *Drosophila*.

*Bibliografía: Genetics 1 (1-2): (1-52)(107-163) 1916*

Los trabajos de Bridges no fueron bien comprendidos por la totalidad de la comunidad científica, y autores como Bateson publicaron en aquel momento fuertes opiniones contra la teoría cromosómica de la herencia. Por eso el grupo de Morgan no dudó en volver sobre el tema cuando las condiciones biológicas para la prueba de la teoría fueron más favorables.

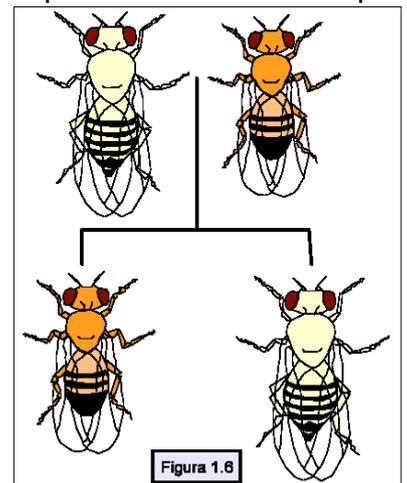
Se conocía un mutante de *Drosophila* de cuerpo amarillo que se comportaba normalmente igual que ojo blanco, era ligado al sexo y por tanto las hembras de cuerpo amarillo al cruzarse con machos de color de cuerpo normal tenían una descendencia de machos de cuerpo amarillo y hembras de color de cuerpo normal.

Pero en 1922 L.V.Morgan, encontró una hembra excepcional, mosaico, a partir de la cual pudo obtener otra de cuerpo color amarillo, también excepcional por la descendencia que produjo, y con su análisis despejó dudas sobre las conclusiones de Bridges.

La hembra de cuerpo amarillo, cruzada con un macho normal, sólo tenía hijas de cuerpo amarillo e hijos de cuerpo normal (Fig. 1.6).

Estas amarillas cruzadas con sus hermanos o con otros machos normales producían la misma descendencia que su madre.

Los resultados eran los mismos que explicaba Bridges por fenómenos de no disyunción pero en este caso no eran sólo el 4% de las hembras las que heredaban el fenotipo de la madre, eran la totalidad en las que se producía la no disyunción y de igual forma todos los machos recibían el cromosoma X de su padre.

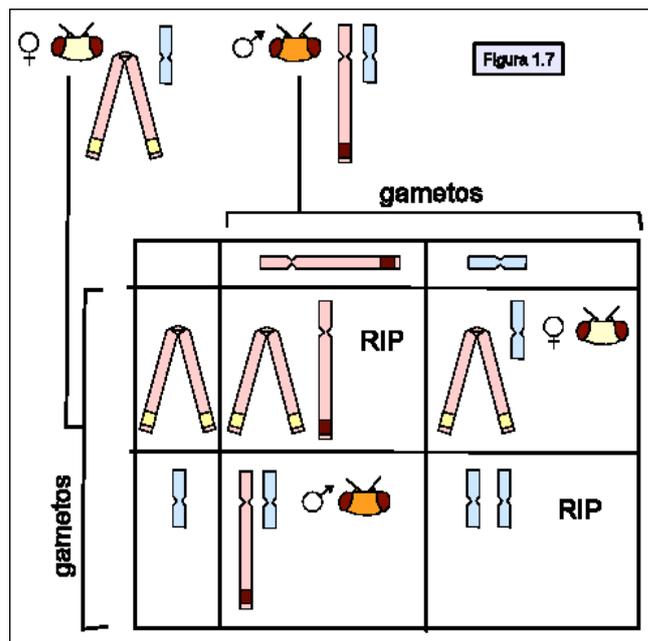


La explicación para transmitir siempre a la vez dos cromosomas X es que estén unidos, y esta hipótesis puede comprobarse citológicamente (Fig. 1.7).

Si la hipótesis es correcta deben ocurrir que:

- Las hembras de comportamiento especial deben tener dos cromosomas X unidos.
- Estas hembras deben tener además un cromosoma Y.
- La mitad de los huevos no producirán moscas viables.

Las tres propuestas se estudiaron y quedó claramente comprobado que los genes se encuentran en los cromosomas.



**La teoría cromosómica de la herencia se enunció de forma más completa en los años siguientes, considerándose en la actualidad:**

- Los genes están alineados sobre los cromosomas (Briden y Boveri 1903). (Bridges 1916)
- La ordenación de los genes sobre los cromosomas es lineal. (Sturtevant 1913, primeros mapas)
- La recombinación se corresponde con el intercambio de segmentos cromosómicos. (Janssens 1900).

**EL CICLO CELULAR:** Los cromosomas se pueden observar durante la división del núcleo (**mitosis**). El resto del tiempo de vida de la célula no hay actividad cromosómica “visible” y por ello a este periodo se le llamó **interfase**, definiéndolo como “un momento de reposo de la célula” (Fig. 2.1).

Sin embargo nada es menos cierto que el que la interfase sea una etapa de reposo. Durante este periodo la célula hace, de modo invisible, la mayor parte de su actividad metabólica incluyendo la preparación de la división celular.

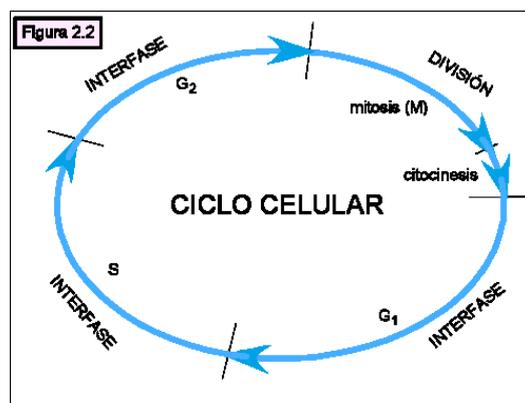
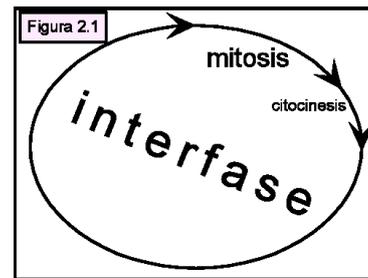
La mayoría de los componentes celulares se están formando de manera continua a lo largo de la interfase y, por tanto, resulta muy difícil establecer momentos o fases estrictas en la progresión del crecimiento de la célula.

Una excepción la constituye la síntesis de ADN pues la replicación sólo tiene lugar durante una etapa concreta de la interfase. A este periodo de síntesis se le llama **S**.

Definida la mitosis (M) y el periodo de síntesis (S) el ciclo celular queda dividido en 5 partes. La división comprende dos etapas que se solapan ligeramente (mitosis y **citocinesis**) y la interfase comprende tres, la de síntesis del ADN (S), la etapa entre el final de la división y el principio de S, que se denominó **gap 1 (G1)** y la que se desarrolla entre el final de S y el comienzo de M que se denominó **gap 2 (G2)**.

Desde el punto de vista de la genética dos son las cosas que interesan sobre todo en el ciclo celular, en primer lugar qué ocurre con la información genética durante cada ciclo y en segundo lugar cómo se regula el ciclo celular en sí mismo.

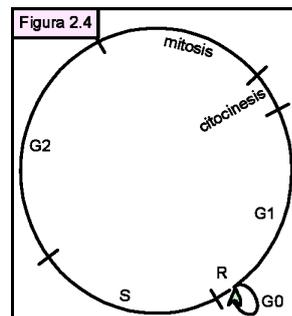
La información genética se encuentra en los cromosomas y éstos aparecen con el comienzo de la división con dos cromátidas cada uno, copia exacta una de otra. Durante el proceso van espiralizándose (**profase**) hasta que su tamaño relativamente pequeño y grueso les permite los desplazamientos; con el comienzo de la fase cinética se dice que se inicia la prometáfase en la que el huso mitótico juega un papel fundamental y acaba por colocar todos los cromosomas en un plano, central en la célula, momento que ha dado en llamarse **metafase**. Poco tiempo permanecen en quietud pues al escindirse el centrómero cada cromátida es arrastrada a un polo de la célula llamándose a esta etapa de emigración **anafase**. Para acabar la división del núcleo sólo queda que se vuelva a formar la envoltura nuclear englobando a las cromátidas reunidas en cada polo y que éstas se desespiralicen y desaparezcan todo ello en un proceso que se conoce con el nombre de **telofase**. Antes de terminar la telofase ya comienza el proceso la división del citoplasma o **citocinesis**. De esta forma al final de la división celular a partir de una célula con  $2n$  cromosomas y  $4n$  moléculas de ADN se tienen dos células con  $2n$  cromosomas y  $2n$  moléculas de ADN cada una siendo importante que, como las  $4n$  moléculas de ADN que entran en división son estrictamente iguales dos a dos y durante la división se separan a polos opuestos moléculas idénticas, las células hijas tienen exactamente la misma información genética que la célula de la que provienen (Fig. 2.3).



Con el final de la división los cromosomas dejan de ser visibles y comienzan la interfase en la que no hay referencias visuales. Se ha podido comprobar que cuando las células están metabólicamente más activas y por tanto no se dividen, tienen su cromatina sin replicar; lo mismo ocurre con las células diferenciadas.

Las células que alargan su ciclo celular o no van a dividirse más, se detienen en G1.

Se ha podido comprobar que existe en G1 un punto sensible a las condiciones externas (nutrientes etc) en el que la célula detiene su desarrollo si no son favorables. Se localizó al final de G1 y se le llamó punto de restricción o punto **R** (Fig. 2.4). Se interpretó como probable que existiera una proteína de disparo de la que se necesita un determinado nivel para que se pueda superar el punto de restricción R. Se postuló que debía ser una proteína inestable para que no se almacenase fácilmente en las células y su nivel fuese un exponente claro del momento metabólico en que se encontrase la célula y se la denominó **U** (*unstable protein*). De esta forma se asegura que la información genética cuando comienza a replicarse complete la duplicación preservándose su integridad y que las células que ya diferenciadas no van a dividirse tengan más material hereditario del necesario para su metabolismo.



Mediante pulsos con marcadores se pudo determinar que el periodo S estaba muy estructurado y cada fragmento de información genética tenía un momento concreto en el que se replicaba. Los segmentos más tempranos terminan la replicación antes de acabar el periodo S pero aunque haya en la célula condiciones para comenzar una 2ª replicación no la inician y esperan pacientemente a los segmentos más tardíos (se verán peculiaridades en los cromosomas politénicos).

Una vez que se completa la replicación comienza una nueva etapa de actividad transcripcional en la que se sintetizan y acumulan todos los componentes necesarios para llevar a buen término la división que ha de hacerse sin síntesis nueva durante su desarrollo pues el material informativo está condensado en forma cromosómica y es difícilmente accesible para la transcripción.

En resumen la información genética a lo largo del ciclo celular tiene distintos momentos de actividad y estructura coordinados de tal manera que en condiciones naturales nunca comienza la siguiente etapa sin haber finalizado la anterior. Existe un control del ciclo celular rígido, hasta tal punto que resultó difícil abordarlo para su estudio pues en condiciones naturales no tiene posibilidades de variación compatibles con la continuidad de la vida.

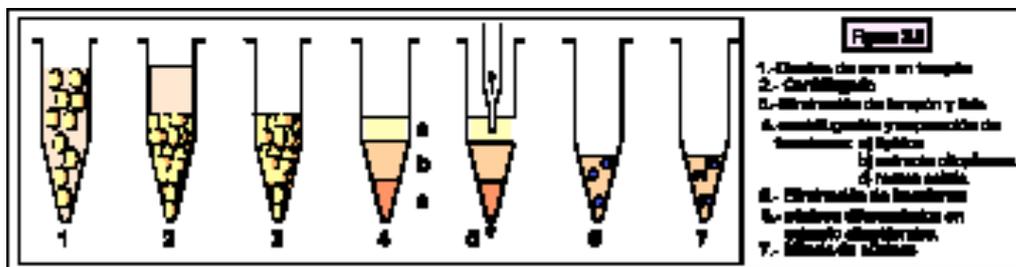
### ESTUDIO DEL CONTROL DEL CICLO CELULAR:

La gran cantidad de proteínas sintetizadas durante la interfase y las pequeñas cantidades de cada una de ellas hacía muy difícil encontrar alguna proteína que pudiera ser U ((proteína de disparo que hacía superar el punto de restricción R) y que se había postulado como inestable, pero su búsqueda era sin lugar a duda el punto en el que había que comenzar.

Después de varios años manejando extractos celulares en 1971 Masui y Markert presentaron ante la comunidad científica los siguientes experimentos: De oocitos de rana (estaban sufriendo la meiosis) aíslan el extracto citoplásmico y le añaden núcleos de células diferenciadas (núcleos de espermatozoides).

Estos núcleos diferenciados entraban en división por lo que se postuló la existencia de una sustancia proteica que inducía la división y la denominaron **FPM** (factor promotor de la maduración) (Fig. 2.5).

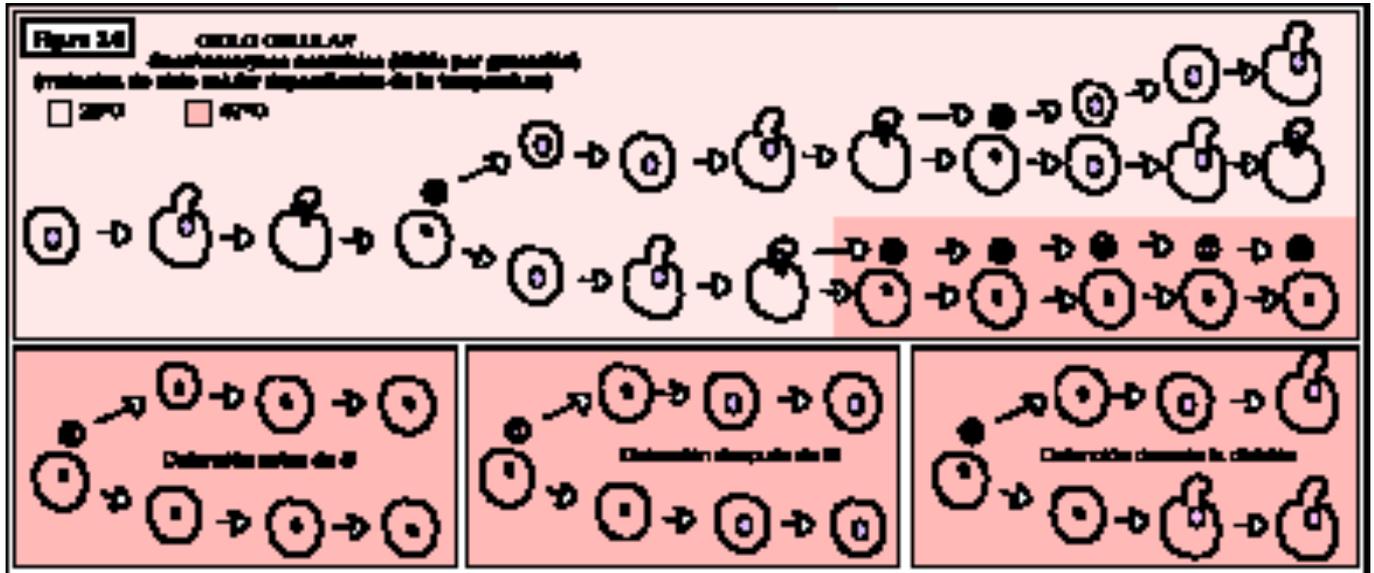
El extracto también inducía la división en células somáticas y se comprobó poco más adelante que su actividad oscilaba (era activo en mitosis o



meiosis y no en interfase).

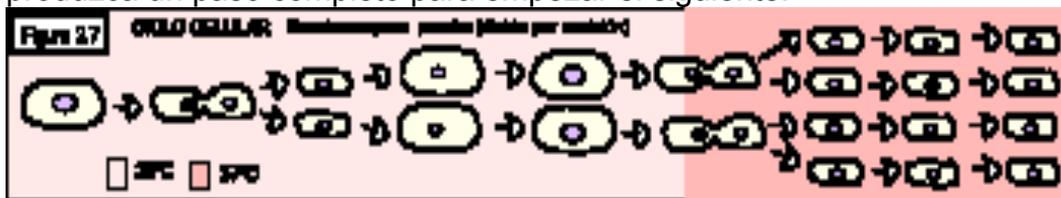
Por otra parte trabajando con levaduras se encontraron mutantes que se dividen con normalidad a bajas temperaturas (23°C) y no se dividen a temperaturas más altas (36°C). También se encontraron este tipo de mutantes en otros organismos como mamíferos con temperaturas críticas de 34 y 39°C para división y no división respectivamente.

En *Saccharomyces cerevisiae* se encontraron numerosos mutantes algunos de los cuales detenían su crecimiento en un momento concreto del ciclo celular, unos al iniciar la mitosis, otros al principio de S,... (Fig. 2.6).



Se llamaron mutantes de ciclo de división celular, **cdc** añadiéndose un número a cada uno de ellos. Se interpretaron como mutaciones para proteínas necesarias en cada uno de los pasos que detenían.

Vista la variedad de mutantes y la repetición de resultados que se producían en otros organismos como *S. pombe* con una división más parecida a los eucariotas superiores (Fig. 2.7), se postuló que el ciclo celular es un proceso secuencial en el que es necesario que se produzca un paso completo para empezar el siguiente.



En plena fiebre de descripción de mutantes cdc se aisló por fin el FPM y se descubrió que estaba compuesto por dos proteínas.

Hartwell y Nurse fueron los responsables de la identificación de uno de los componentes del Factor Promotor de la Maduración; era una proteína coincidente con la proteína deficiente para los mutantes **cdc2**, que no entraban en división. En otras palabras la proteína del gen **CDC2** era uno de los componentes del FPM. Se vio que era una proteína muy conservada evolutivamente, se encontraron genes **cdc2** en todos los organismos eucariotas y su producto era prácticamente igual desde las levaduras al hombre. Es sin duda una proteína fundamental en la vida de los eucariotas y una buena candidata a ser la responsable del control del ciclo celular en la entrada en división.

El análisis genético puso de manifiesto que los mutantes **cdc2** tenían el enzima inactivo y como consecuencia les era imposible entrar en división, mientras que mutantes **cdc2** que producían una proteína hiperactiva lanzaban a las células a una mitosis precoz. El producto de **CDC2** era sin duda responsable, al menos en parte, de la entrada en división.

Con el análisis bioquímico de esta proteína se determinó que su concentración era constante en todo el ciclo celular. Sin ella se ha visto que no se desencadena la división y ella,

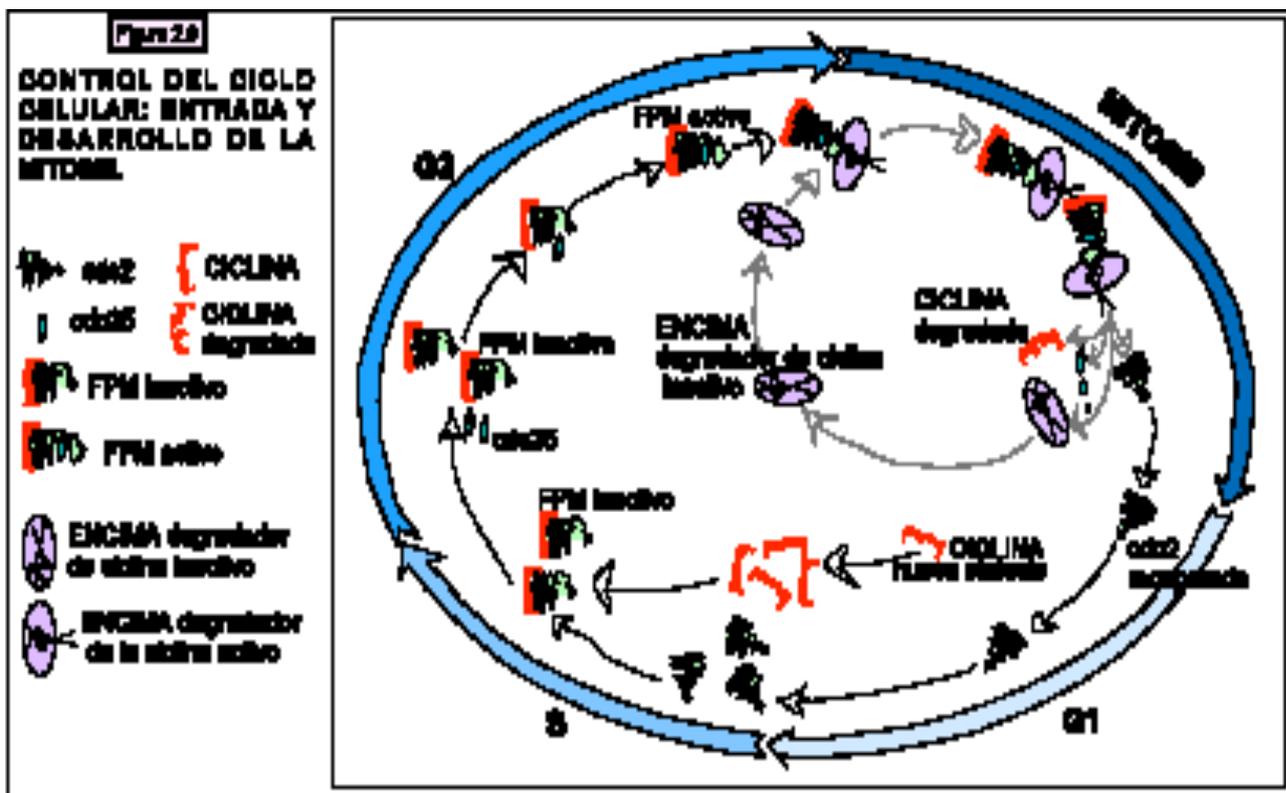
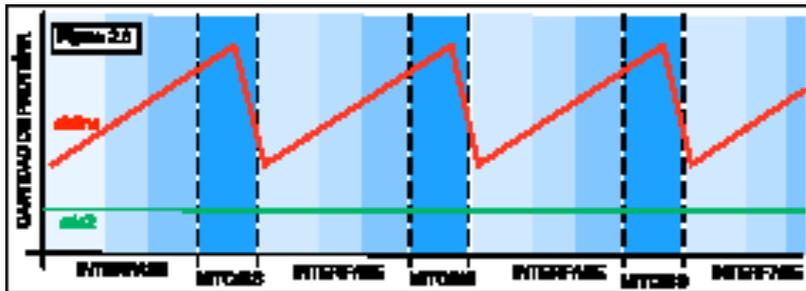
como parte del FPM, es capaz de desencadenar la división, ¿cómo actúa concretamente después de G2 si su concentración es constante en todo el ciclo celular?

La respuesta llegó con la identificación y estudio de la otra parte del dímero FPM. Se debe a Hunt quien determinó que era una proteína a la que llamó **ciclina** pues su concentración aumentaba a lo largo de la interfase y desaparecía bruscamente durante la mitosis (Fig. 2.8).

La conclusión fue inmediata, es la acción conjunta la que permite iniciar la división; ésta probablemente está desencadenada por cdc2 pero para que cdc2 sea activa necesita determinados niveles de ciclina.

Para seguir indagando se aislaron los dos componentes del dímero, se unieron, se añadieron a núcleos diferenciados y curiosamente ahora no se produjo la entrada en división.

Se volvió a buscar entre los mutantes de ciclo celular que detenían antes de la división y se encontró el **cdc25** descubriéndose que su producto era necesario para que el dímero cdc2 + ciclina fuese activo.



Tal como se indica en el esquema (Fig. 2.9), cdc2 no se degrada en todo el ciclo celular, la ciclina se sintetiza a partir de G1 y se van formando dímeros inactivos. cdc25 sólo se sintetiza durante G2 y entonces se une al dímero activándolo. De esta forma la acción de cdc25 asegura que no comience la división antes de terminar S. El FPM activo desencadena la división por la acción de cdc2 que es una proteinquinasa soluble que realiza las siguientes funciones: Fosforila la lámina; Fosforila el citoesqueleto; fosforila histona H1. Como consecuencia: se desorganiza la envoltura nuclear; se deshace el citoesqueleto y se acumula tubulina para formar el huso mitótico; se espiralizan los cromosomas. Hasta hace poco se pensaba que también fosforilaba (activaba) el enzima degradador de la ciclina.

Con el tiempo se vio que este modelo era una simplificación de lo que ocurría ya que en el proceso intervienen otra serie de factores enzimáticos como la cdc20 o mecánicos, poco conocidos, como el apareamiento cromosómico.

La mitosis que comenzó siendo el punto de referencia para subdividir el ciclo celular, podría en la actualidad del año 2006, describirse como el proceso que comienza con la acción fosforilativa de la quinasa FPM compuesto por la proteína cdc2 + ciclina y activado por cdc25, cuyos efectos principales son:

Espiralización de los cromosomas mediante la fosforilación de proteínas no histonas (denominadas condensinas) que se unen a determinados sitios de los cromosomas y se asocian entre sí produciendo el plegamiento de la fibra de 30nm.

Fosforilación de los filamentos intermedios del citoesqueleto desorganizándolos con lo que a nivel citoplásmico se relajan las uniones entre células y la forma de la célula tiende al quedar más libre a la esfericidad. Por otra parte, a nivel nuclear se eliminan las uniones entre los filamentos intermedios que forman la lámina (asociación proteica que permite la estabilización de las uniones entre sáculos del retículo endoplásmico rugoso y con ello la formación de la envoltura nuclear) con lo que la doble membrana que rodea al núcleo se vuelve inestable.

Alteración del equilibrio GTP - GDP en los microtúbulos del citoesqueleto y consecuentemente eliminación de la polarización del núcleo; formación del huso; anclaje de los cromosomas, formación de la placa metafásica: migración a los polos de los cromosomas anafásicos.

Todos estos procesos, que desembocan en el reparto equitativo de la información genética en las células hijas, deben explicarse al menos someramente para comprenderlos y rellenar con hipótesis razonables las partes poco conocidas a día de hoy.

Los microtúbulos están formados por 13 protofilamentos constituidos por dímeros de tubulina a y b que le confieren polaridad, cada microtúbulo tiene un extremo a que asocia nuevos dímeros más lentamente (es el polo -) y un extremo b que asocia dímeros más rápidamente. Pero para que tenga lugar la adición de los dímeros, éstos tienen que estar asociados a una molécula de GTP. Luego el GTP se hidroliza pasando a GDP y los túbulos con GDP no son estables, los protofilamentos se separan y los dímeros se liberan al citosol. En resumen, aunque en principio pueden asociarse nuevos dímeros y por tanto crecer el microtúbulo por sus dos extremos, lo normal es que haya un polo de crecimiento (b) que tendrá una zona final de moléculas con GTP y un polo de retracción con dímeros GDP. Con este modelo que dio en llamarse efecto noria, y con la existencia en la célula de lugares que parece que favorecen el crecimiento llamados "centros de nucleación" se produce un equilibrio que mantiene el citoesqueleto de la célula.

La aparición en escena de una fuerte quinasa desequilibra los centros nucleadores y comienzan a crecer rápidamente los microtúbulos inestables (sin un casquete protector en el extremo opuesto al del centro de nucleación) mientras merman los estables que aportan las tubulinas para el crecimiento de los otros. de este modo según dicen los autores, se desorganiza el sistema microtubular del citoesqueleto y se forma el huso mitótico. En realidad todo resultaría más comprensible si se parte del hecho de que los microtúbulos tienen una zona de crecimiento en el extremo opuesto al centro de nucleación (se ha comprobado que el polo + es el distal) y en el otro lado (centriolos o zona de nucleación se concentrarían los extremos de retracción. La llegada de la quinasa transforma los centros de nucleación en polos de crecimiento activo mientras haya tubulina disponible. El huso se forma a partir de las microtúbulos inestables que ahora crecen por los dos extremos y se forma el huso mientras que los estables protegidos no pueden crecer y de alguna forma desconocida se desorganizan aportando la tubulina para el crecimiento de los no protegidos. Cuando escasea la tubulina de la célula el centro nucleador vuelve a funcionar como polo de retracción tubular pero en ese momento ya los otros extremos de los microtúbulos se han asociado a las proteínas cinetocóricas los dos centriolos o centros de nucleación se separarían por el crecimiento de las fibras y la redondez de la célula producida por la ausencia de citoesqueleto los llevaría a extremos opuestos. probablemente en ese instante las fibras que no se hayan asociado a los cinetocoros interaccionan entre ellas pero no se asocian, probablemente por ser extremos de la misma polaridad yuxtapuestos y con el concurso de alguna proteína como la dineína, se deslizan unos sobre otros separando aún más los centros nucleadores.

Al formarse el huso las fibras que rodean al núcleo presionan la envoltura nuclear que carente de la consistencia que le proporciona la lámina se desorganiza fácilmente. Este efecto puede observarse tratando las células con colchicina que impide la polimerización de los microtúbulos, no se forma el huso y el tiempo de duración de la envoltura se alarga suficientemente como para que se puedan observar cromosomas muy espiralizados.

Desorganizada la envuelta nuclear se considera terminada la profase y los cromosomas ya tienen formados los cinetocoros asociados a los centrómeros. La formación se produce en cada centrómero de cromátida de forma opuesta a la colocación de las moléculas de cohesina que mantiene las cromátidas unidas y por tanto las dos unidades cinetocóricas divergen  $180^\circ$ . Esta colocación hace muy probable que se asocien cada uno a fibras del huso de distinto polo y esta unión impide que sigan polimerizándose nuevos dímeros de tubulina con lo que la fibra deja de crecer en este extremo y va mermando en el polar; pero al estar el cromosoma anclado a los dos polos y con la cohesina que impide la separación de las cromátidas, se produce un estacionamiento tensionado de los cromosomas en el ecuador de la célula que dio en llamarse placa metafásica. Si se unieran las unidades cinetocóricas a túbulos del mismo polo dejarían de crecer los microtúbulos y el cromosoma se desplazaría hacia un polo pero al llegar a determinado paralelo se desorganizarían completamente los restos de los microtúbulos asociados por lo que el cromosoma libre es arrastrado de nuevo a la zona central de la célula.

En ese momento se produce lo que dio en llamarse "spindle checkpoint" (punto de control de unión al huso) que mantiene los cromosomas en esa posición hasta que todos están tensionados y por ello en ningún polo se está liberando tubulina. En el momento en que estén tensionados todos los cromosomas, se activa el "complejo promotor de la anafase (APC, anaphase promoting complex) compuesto al menos por la proteína cdc20 y la 26S y cuyas acciones inmediatas son: 1.- degradación de la ciclina del FPM. 2.- Actuar sobre la securina impidiendo que inhiba la separasa que degrada la cohesina, lo que al final se traduce en una separación de las cromátidas que ya pueden migrar a los polos. Pero esa migración debe hacerse rápidamente pues la degradación de la ciclina hace que cese su actividad quinasa y comience de nuevo a organizarse la lámina, a desespiralizarse los cromosomas.....por ello a la vez que se producen las 2 acciones inmediatas se activan las enzimas "cinesinas" (KLP59C en el polo + y KLP10A en el - de las fibras del huso) que eliminando la tubulina arrastran a las cromátidas a los polos.

Mientras todo esto ocurre las fibras que no estaban unidas a los cinetocoros siguen desplazándose entre sí y alejando de este modo los polos asegurándose que al volver a organizarse la envoltura no hay interacciones entre las dos por una parte y lo que es más importante que en la zona central de la célula se condensen los elementos necesarios para el desarrollo de la citocinesis.

Otros puntos importantes del ciclo celular que también están controlados son la entrada en S (no debe iniciarse si no está acabada la división) en la que también están involucradas proteínas cdc que son dependientes de ciclinas y por ello reciben el nombre genérico de CDK, "quinasas dependientes de ciclina".

## EL CROMOSOMA EUCARIÓTICO:

**Cromosoma:** El término fue acuñado por Waldeyer en 1888, hoy se define como estructura de ligamiento constituida por una secuencia lineal específica de la información genética.

**CONCEPTO INTERFÁSICO DE CROMOSOMA:** Según la nomenclatura tradicional sólo es cromosoma la estructura que se observa durante la división individualizadamente de otras similares. El término cromatina queda relegado a la interfase y sería la forma interfásica del material genético nuclear de la célula.

Sin embargo desde el punto de vista de la genética el concepto de cromosoma permanece a lo largo de todo el ciclo celular, ya que se define como soporte de los genes que asegura su correcto funcionamiento y su adecuado reparto en la división.

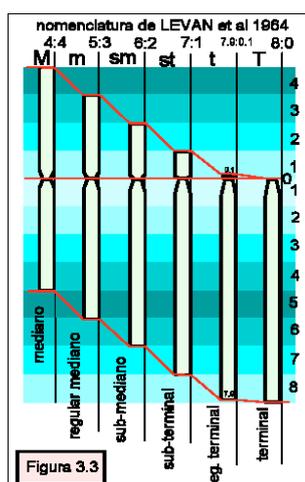
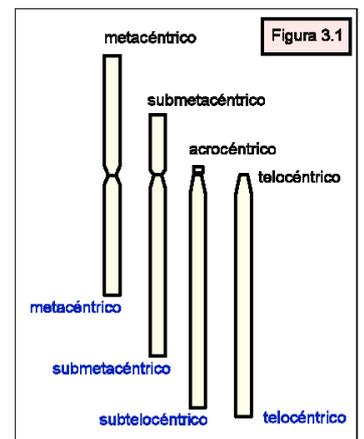
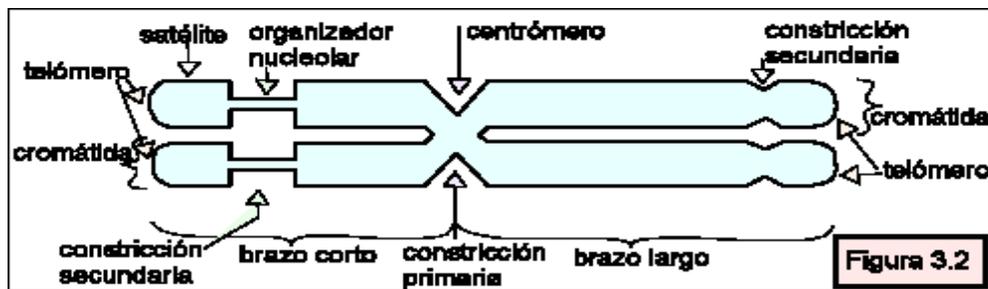
Con la extensión del concepto de cromosoma a todo el ciclo celular se pueden entender expresiones como replicación de los cromosomas, transcripción de los cromosomas y algunos casos especiales como los cromosomas politénicos.

El cromosoma eucariótico debe considerarse como formado por una sola molécula de ADN que se replica durante el periodo S, y está asociada a una serie de proteínas histonas y no histonas que modifican su estructura y plegamiento a lo largo del ciclo celular.

**ESTRUCTURA DEL CROMOSOMA:** La macroestructura del cromosoma está directamente relacionada con la función. En la actualidad se piensa que las cosas de las que se dice que “no sirven para nada” en realidad revelan que “no se sabe para qué sirven”.

El estudio de la organización del cromosoma eucariótico se desarrolló históricamente por los siguientes pasos: 1.- Morfología de los cromosomas (tinción uniforme). 2.- Diferenciación longitudinal (bandeos cromosómicos). 3.- Diferenciación funcional de segmentos (comportamientos cromosómicos). 4.- Análisis de secuencias y fragmentos.

Una vez demostrado en 1884 que el número de cromosomas es constante para los individuos de una especie, aumentó el interés de la comunidad científica por estas estructuras y se trató de describirlas en lo posible ya que sólo su número no es suficiente para definir especies. Para la clasificación de los cromosomas se atiende a las marcas más conspicuas de su morfología: posición del **centrómero** (*metacéntricos*, *submetacéntricos*, *acrocéntricos*, *telocéntricos*) o (*meta*, *submeta*, *subtelo* y *telocéntrico*) (Fig. 3.1); tamaño relativo (total del cromosoma, brazo corto y brazo largo); constricciones secundarias (sobre todo el organizador nucleolar) (Fig. 3.2).



Con el fin de superar los problemas que en las comparaciones entre medidas absolutas se producen como consecuencia de la manipulación (tinción, aplastamiento de célula y extensión de cromosomas) y sobre todo del grado de espiralización, se establecen fórmulas que relacionan al menos dos medidas absolutas.

La relación más utilizada es el **índice centromérico =  $I_c$** :

$$I_c = \text{long. brazo corto} / \text{long. total del cromosoma.}$$

Al relacionar dos longitudes el índice centromérico resulta una medida relativa (sin unidades) que puede compararse con otras medidas relativas de otros cromosomas homólogos o no. El índice centromérico varía entre 0 y 0.5 y una vez conocido permite clasificar

los cromosomas en las clases establecidas por la posición del centrómero.

Otras medidas relativas utilizadas relacionan las longitudes de los brazos cromosómicos entre sí; como ejemplo se presenta un esquema de la propuesta de Levan y colaboradores que clasifican los cromosomas en 6 clases diferentes (Fig. 3.3).

A pesar de todos los esfuerzos clasificatorios de los cromosomas, en algunos casos no se consiguen identificar individualizadamente y por ello se han buscado técnicas que permitan una diferenciación longitudinal de los cromosomas, es decir, técnicas que pongan de manifiesto marcas o bandas transversales a lo largo del cromosoma. Esta diferenciación longitudinal además de la finalidad identificativa aporta información sobre la estructura y funcionalidad de los cromosomas.

A las técnicas especiales de diferenciación longitudinal se les denomina “**técnicas de bandeo**”.

El primer intento de obtener un bandeo en cromosomas se debe a **Darlington y Le Cour** (1940). Utilizaron liliáceas como material biológico por tener cromosomas grandes y en número bajo. Recogen meristemos radiculares y los someten durante largos tiempos a bajas temperaturas (cerca de 0°C). Este tratamiento provoca la aparición de bandas transversales en los cromosomas.

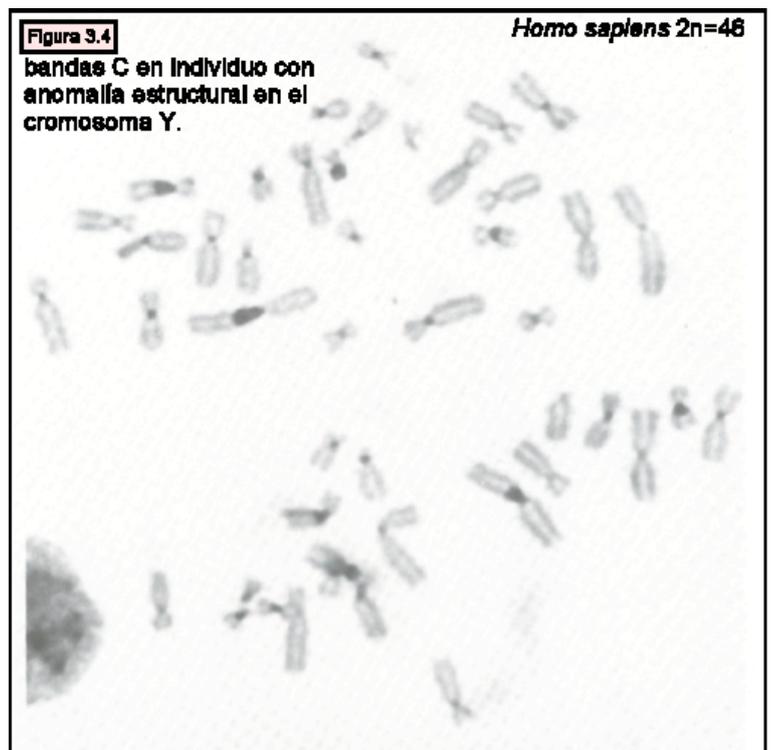
La técnica presentaba algunos inconvenientes de los que el principal era la poca repetitividad del proceso; además no todas las células se bandeaban igual. Por último el tratamiento con frío reducía enormemente el número de células en división.

A pesar de los inconvenientes la técnica puso de manifiesto que, tal como se suponía por la observación al principio de profase meiótica y de politénicos, los cromosomas tenían diferencias estructurales en su longitud que probablemente implicaban diferencias en función.

El segundo intento corrió a cargo de **Yamasaki** (1956) que trató raíces de orquídeas con soluciones ácidas y tiñó luego con orceína. Al hacer la preparación se pudieron observar bandas transversales. Esta técnica con el tiempo fue desplazada por otras que tienen como denominador común el realizar primero la extensión celular y luego el tratamiento para poner de manifiesto la diferenciación longitudinal.

Siguiendo una metodología propuesta por Pardue y Gall (1970) e introduciendo ligeras modificaciones, se consiguieron poner de manifiesto en cromosomas humanos pequeñas bandas centroméricas, otras pericentroméricas en algunos pares (1, 9 y 16) y otra en el área medio distal del cromosoma Y (Fig. 3.4).

Se interpretó como la tinción selectiva de la heterocromatina constitutiva que permanece siempre más condensada que el resto. Se denominaron bandas C. En la actualidad la técnica de bandeo C se utiliza tanto en animales como en vegetales y consiste en un tratamiento de hidrólisis suave con ácido seguida de una degradación de los cromosomas mediante tratamiento con álcalis [(OH)<sub>2</sub>Ba ó OHNa] pasando luego a reconstituir los cromosomas en una solución salina. Con este tratamiento los cromosomas son degradados progresivamente por la solución alcalina fuerte, salvo en aquellas zonas donde se encuentran más compactamente asociados a proteínas, más empaquetados y son más difícilmente degradables. Esas bandas C presentan cierta variabilidad de tamaño lo que hizo considerar como posible que no contengan información genética que se exprese. Ya antes del bandeo C comenzaron a desarrollarse



antes del bandeo C comenzaron a desarrollarse

una serie de técnicas que añadían fluorocromos a preparaciones ya fijadas. Estas sustancias fluorescentes (mostaza de quinacrina o clorhidrato de quinacrina) mostraron afinidad por determinadas regiones de los cromosomas dando lugar a un amplio patrón de bandas transversales muy repetibles. Se llamaron bandas Q y el principal inconveniente que tienen es que los fluorocromos “se gastan al observarlos”. Aunque en la actualidad el problema trata de solventarse con la utilización de sustancias antimarchitadas que alargan las posibilidades de excitación de los fluorocromos, las preparaciones tienen una vida corta sobre todo en observación.

A partir de 1971 se describen multitud de métodos de bandeado que tienen en común el tratamiento con proteasas seguido de lavados con soluciones salinas. Al teñir después (normalmente con colorante de Giemsa por lo que se denominan bandas G) aparecen bandas transversales en los cromosomas que son coincidentes con las bandas Q obtenidas con quinacrininas (Fig.3.5). La coincidencia de estos 2 tipos de bandas aconseja un análisis conjunto.

Se ha podido determinar que las quinacrininas se asocian preferentemente a los pares A-T ya que anticuerpos fluorescentes anti-adenina producen un patrón de bandas en los cromosomas similar a las bandas Q. Las regiones con bandas Q+ deben tener un porcentaje de pares A-T significativamente mayor que las zonas de bandas Q-.

Por otra parte las bandas G+ si se tiñen más intensamente con giemsa es porque las proteínas cromosómicas han sido menos atacadas por las proteasas (la tripsina es la más empleada) y este efecto sin duda es debido a la compactación pues cualitativamente no hay diferencias en proteínas entre bandas + y -.

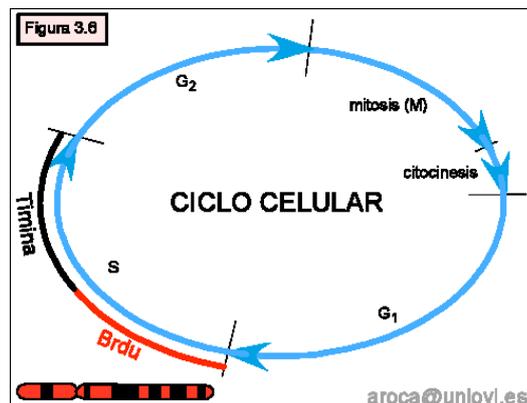


Muy probablemente la secuencia determina el grado de compactación. Pero lo verdaderamente interesante es determinar si esta distinta estructuralización de las zonas del cromosoma, determina una distinta funcionalidad o es consecuencia de ella.

El siguiente paso se debe a Zakhlov y Esolina (1972) que sustituyeron durante una parte concreta del periodo de replicación del ADN (S), alguno de los precursores de nucleótidos por análogos identificables o marcados y analizaron posteriormente la morfología de los cromosomas durante la división siguiente.

La sustitución de la timina por su análogo 5-bromodesoxiuridina (BrdU) durante la replicación, dependiendo de cómo se den los pulsos permite obtener los siguientes resultados:

**Diferenciación longitudinal:** Los segmentos cromosómicos bromosustituidos muestran en metafase un grado de condensación menor de lo normal y se tiñen por eso más tenuemente. Si el pulso con 5-bromodesoxiuridina se da en el principio del periodo S y luego se vuelve a poner como precursor timina, las zonas del cromosoma metafásico más teñidas serán las de replicación tardía; aparecen una serie de bandas que son coincidentes con las G+ (Fig. 3.6). Si el pulso se da



al final de S (las bandas oscuras indicarán las zonas que replican tempranamente), aparecen bandas coincidentes con las G-.

**Diferenciación transversal:** Si se mantiene el cultivo una generación entera en Brdu, en cada cromátida una hebra será bromosustituida pero en la siguiente generación volviendo a los precursores normales habrá una cromátida con dos hebras normales y otra con una hebra bromosustituida por lo que una se teñirá normal y la otra en toda su longitud más tenuemente. La utilidad de esta diferenciación transversal, a todo lo largo del cromosoma, se verá en el análisis de la metafase meiótica y en el estudio de los intercambios entre cromátidas hermanas.

Cuando el aislamiento de productos génicos permitió la localización física de los genes en el cromosoma se vio que éstos estaban distribuidos en ambos tipos de bandas (G+ y G-) pero cuando se analizó la función de los genes localizados se encontró que los genes localizados en las bandas G+ eran *específicos de tejidos* (G<sub>specific</sub>), mientras que los localizados en las bandas G- eran genes de *mantenimiento general de la célula* (G<sub>keeping</sub>).

En resumen se puede concluir que las bandas tienen una clara funcionalidad en el cromosoma y, con estos datos y alguno más se puede establecer un cuadro clasificatorio de las zonas cromosómicas:

Bandas	G <sub>+</sub> (G <sub>specific</sub> ) [G <sub>+</sub> (G <sub>+</sub> )]	G <sub>-</sub> (G <sub>keeping</sub> ) [G <sub>-</sub> (G <sub>-</sub> )]
Parce de bases predominantes	A-T	C-G
Promotores	TATA-box	G-C-box
Replicación	lenta (S <sub>late</sub> )	temprana (S <sub>early</sub> )
Replicación de secuencias	temprana	lenta
Tipo de genes	específicos (G <sub>specific</sub> )	mantenimiento (G <sub>keeping</sub> )
Carácter de información	genes genes	muchos genes
Transmisión repetida	LFCE	oligonucleótidos, ALL y DNEB
	FALEOCROMOMA	NEOCROMOMA

El llamado neogenoma se corresponde con bandas G-, de espiralización más lenta, ricas en zonas G-C, de replicación temprana, con promotores G-C box y genes de mantenimiento general de la célula.

Se han descrito otras técnicas de bandeado para diferenciar transversalmente los cromosomas, entre las que tiene interés la descrita por Lejeune y Dutrillaux en 1971 permite obtener un bandeado en negativo del bandeado G. Se llaman bandas R precisamente por ser las reversas (anglicismo por inversas) y son de utilidad en el estudio de las zonas G-, concretamente las regiones teloméricas que no siempre se ven bien.

Con otras técnicas se pueden teñir regiones concretas de los cromosomas, cualquier región si se dispone de la secuencia adecuada mediante hibridación in situ o, si la zona tiene una estructura diferente como pasa en los organizadores nucleolares, mediante técnicas específicas (bandas N por teñir el NOR).

Por último debe señalarse que la estructura de los cromosomas debe presentar cierta variabilidad entre grandes grupos de seres vivos ya que, por ejemplo, no se ha conseguido obtener bandas G en muchos grupos vegetales en los que se ha intentado.



EJEMPLOS DE CÓDIGOS PARA DESCRIBIR TÉCNICAS DE BANDEO:	
<b>Q</b>	Bandas Q
<b>QF</b>	Bandas Q de fluorescencia
<b>QFQ</b>	Bandas Q de Fluorescencia por quinacrina
<b>QFH</b>	Bandas Q de fluorescencia por Hoechst 33258
<b>G</b>	Bandas G
<b>GT</b>	Bandas G por tripsina
<b>GTG</b>	Bandas G por tripsina con Giemsa
<b>C</b>	Bandas C
<b>CBG</b>	Bandas C por hidróxido bórico con Giemsa
<b>R</b>	Bandas R
<b>RH</b>	Bandas R por calentamiento

## EUCROMATINA - HETEROCROMATINA:

Durante la interfase el cromosoma desespiralizado se observa en el núcleo como cromatina, pero no toda la cromatina tiene el mismo aspecto. Utilizando productos que reaccionan específicamente con el ADN, se pueden ver regiones más intensamente coloreadas que otras. A las más coloreadas se las llamó heterocromatina y a las menos coloreadas eucromatina. (La reacción específica del ADN es la denominada de Feulgen, en la que el reactivo de Schiff interacciona con los aldehídos específicamente. Sólo se tiñe el ADN pues la célula no tiene aldehídos de forma natural, pero se pueden provocar mediante hidrólisis suave de las cetosas de los nucleótidos que se desciclan y se transforman en aldehídos).

La eucromatina tiñe menos intensamente porque está empaquetada de manera más laxa o relajada, en un estado del que se piensa que es compatible con la transcripción. (Apoya este supuesto el que al localizar mediante mapas físicos los genes en los cromosomas se ha visto que la práctica totalidad se encuentran en zonas eucromáticas). Eucromatina y heterocromatina son estados de la cromatina.

La heterocromatina tiñe más intensamente y su empaquetamiento es más compacto que la eucromatina. La heterocromatina empezó a observarse en núcleos interfásicos como grandes bloques asociados generalmente a la cara interna de la envoltura nuclear; durante la división, en los cromosomas, la heterocromatina tiene una disposición específica, como ya se ha descrito al hablar de bandeó C está en lugares concretos de los cromosomas y puede presentar variación en cuanto a su cantidad (tamaño de cada uno de los bloques de heterocromatina) entre cromosomas homólogos. Se ha podido comprobar que se hereda sin variaciones transmitiéndose los mismos bloques de generación en generación.

De manera muy esporádica se han encontrado genes en la heterocromatina; los trabajos de Hilliker demostraron que en *Drosophila* hay mutaciones letales para genes situados en zonas heterocromáticas aunque su función sólo se ha podido determinar en algunos casos.

Del análisis molecular de estas zonas heterocromáticas se concluye que están relacionadas en muchas ocasiones con secuencias más o menos cortas y muy repetidas pero no siempre es así, que una zona sea heterocromática no sólo depende de su secuencia nucleotídica.

A todos estos datos sobre la heterocromatina llamada constitutiva o estable a lo largo de las generaciones y del ciclo celular (que depende de la secuencia nucleotídica) hay que añadir casos especiales en que la cromatina que en ocasiones es eucromática se comporta en otras como heterocromática (no depende de la secuencia sino de la metilación). En resumen para englobar todos los casos en la actualidad se describe la heterocromatina como un estado de la cromatina y a través de los casos especiales es como se trata de estudiar la estructura de la heterocromatina.

**EFEECTO DE POSICIÓN VARIEGADO:** La heterocromatina constitutiva tiene normalmente los bordes bien definidos, sin embargo cuando por una anomalía estructural (inversión o translocación normalmente) un gen cambia de posición (pasa a estar cerca de la heterocromatina cuando antes no lo estaba), se inactiva el gen en algunas células (no en todas) dando un aspecto de fenotipo variegado por lo que al fenómeno se le llama efecto de posición variegado.(Fig. 3.7)

En hembras de *Drosophila melanogaster* con un cromosoma X de ordenación normal portador del gen *w* (recesivo, color blanco del ojo) y otro cromosoma X portador del gen *w<sup>+</sup>* y de una inversión cuyos puntos de rotura y reunión están: uno distal y cerca del locus *w<sup>+</sup>*, *w* y el otro dentro de la zona heterocromática, aunque se esperaría ojo de color rojo normal aparecen algunas facetas de color blanco. Esta variegación tiene que producirse por



inactivación del gen  $w^+$  que se encuentra en el cromosoma portador de la inversión y muy próximo a la heterocromatina pericentromérica. La inactivación debe producirse por influencia de la heterocromatina, tiene que ser por heterocromatinización de la zona del cromosoma donde se encuentra  $w^+$ .

Se comprobó con tinciones específicas que la heterocromatina en algunas células se extendía más allá del punto de rotura y reunión de la inversión, invadiendo el segmento invertido.

Para explicar esta heterocromatinización, que tiene como base o fuente la heterocromatina constitutiva, se buscaron mutantes que la modificasen (aumentando o disminuyendo la variegación). Es decir, de entre las moscas con variegación se seleccionaron las que tenían más y menos facetas blancas

En hembras heterocigotas para la inversión y el locus  $w^+w$ , se han encontrado mutantes que tenían una variegación menor de lo normal. Se comprobó que eran mutantes autosómicos y al gen se le llamó **Su(var)** siendo el alelo normal **Su(var)<sup>+</sup>**

En hembras con el genotipo adecuado en los cromosomas sexuales para presentar variegación, se encontraron otros mutantes con un número de facetas blancas mayor de lo normal (mayor variegación). Se comprobó también que eran mutaciones autosómicas y al gen se le llamó **E(var)** por estimular la variegación siendo el alelo normal **E(var)<sup>+</sup>**.

Estos mutantes que alteran el número de células afectadas también se ha visto que modifican el tamaño de la inactivación en el cromosoma.

Al analizar en hembras con genotipo para variegación el fenotipo que producen las distintas combinaciones de genes  $Su(var)^+$ ,  $Su(var)$  (Fig. 3.8) se observa un claro efecto de dosis que se explica por la producción limitada de un producto génico relacionado con la inactivación o heterocromatinización.

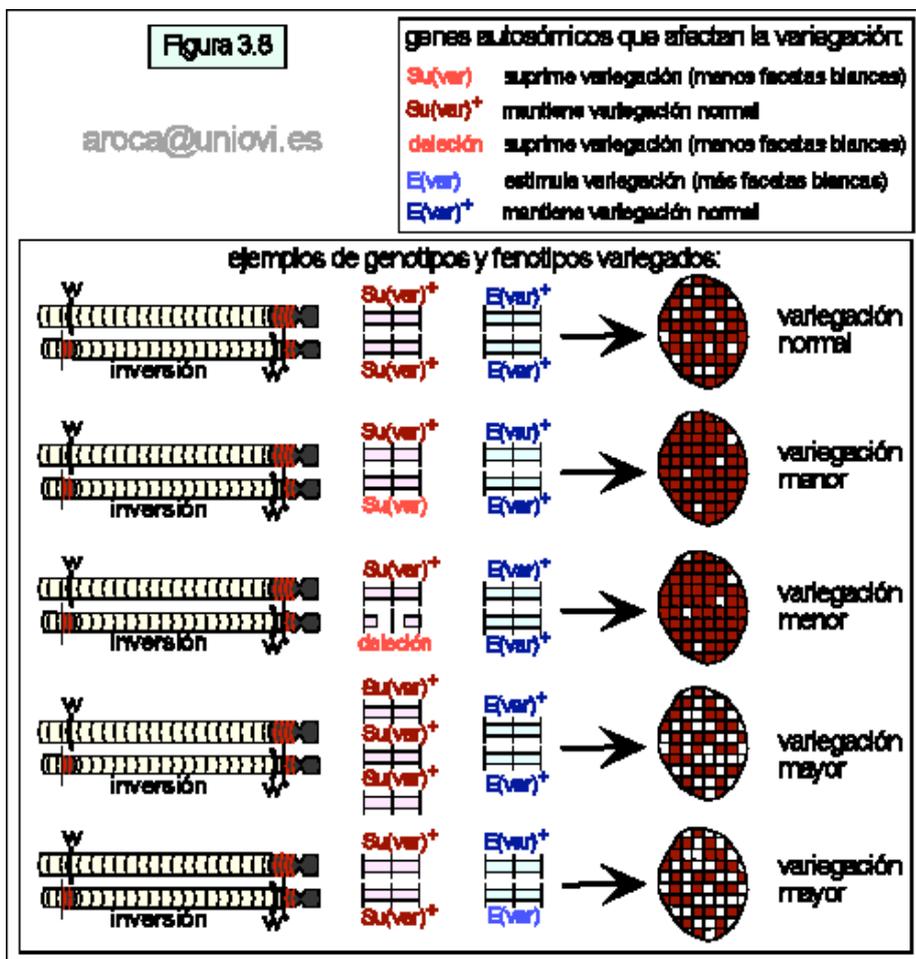
La delección de  $Su(var)^+$ , igual que el alelo  $Su(var)$  produce una disminución en el número de células que se inactivan.

La adición de una dosis extra del gen  $Su(var)^+$  produce un aumento en el número de células que se inactivan, (mayores niveles de producto génico aumentan la capacidad de heterocromatinización).

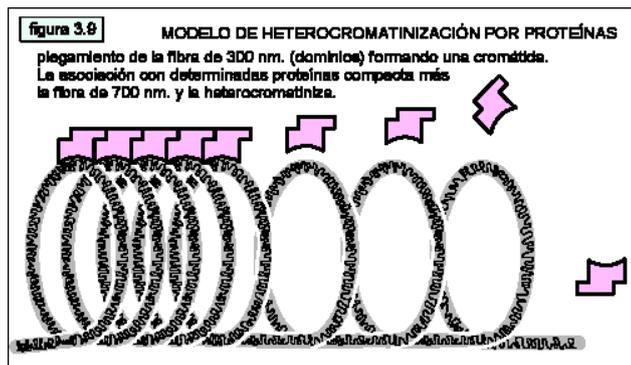
Por otra parte la presencia del gen  $E(var)$  también produce un aumento en el número de células que se inactivan en el locus  $w^+,w$ .

A partir de la propuesta del efecto de dosis se ha desarrollado el siguiente modelo:

La heterocromatinización se produce por metilación o por adición de complejo proteínico en una determinada zona cromosómica (las dos posibilidades no son excluyentes) lo cual determina una compactación de la cromatina.



En especies como *Drosophila* que no metilan el ADN, la heterocromatinización probablemente se produzca por asociación con proteínas (Fig.3.9). La variegación se produciría o no dependiendo de la disponibilidad de las células. No queda claro cómo se produciría el límite de la heterocromatina.



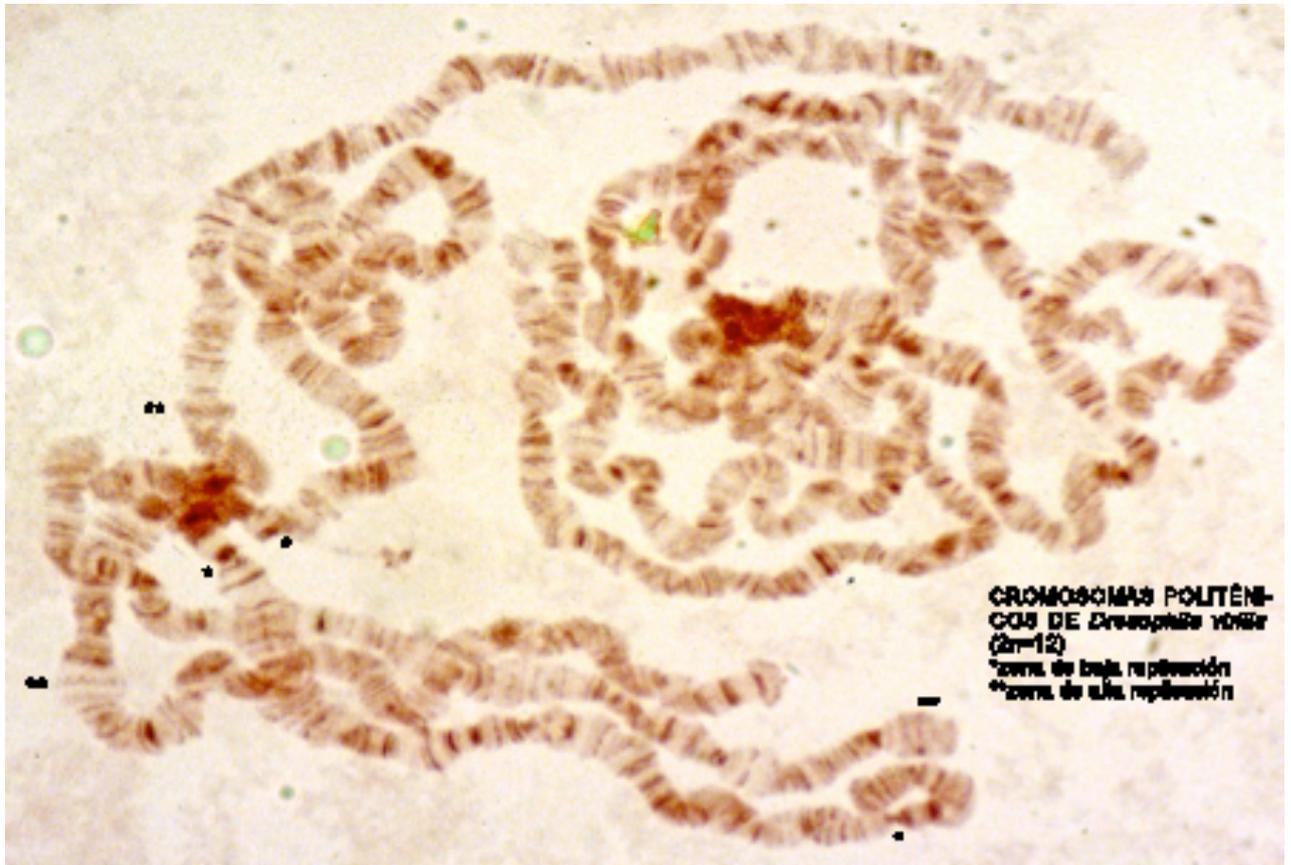
En la mayoría de los organismos vivos la heterocromatinización parece que se produce por metilación de citosinas en determinadas secuencias. La metilación a partir de un punto concreto progresaría siempre que se encontrase a poca distancia otra de las secuencias diana de metilación; una larga secuencia sin diana impide que progrese.

Este modelo, mucho más sencillo, tendría como modificadores los genes encargados de la metilación que dependiendo de cómo actuaran serían supresores o estimuladores. La metilación en sí produciría la heterocromatinización impidiendo el acceso de las transcriptasas y retardando el de las polimerasas.

En resumen, la heterocromatina que es constitutiva de las células en condiciones normales es estable y se transmite sin pérdidas ni ganancias de generación en generación. Esta heterocromatina constitutiva (cuando se modifica en su situación por una anomalía estructural) crece en algunos casos y en algunas células, invade de forma variegada, produciendo mosaicos si se dan las condiciones genotípicas adecuadas para ello. También existe en algunos organismos lo que dio en llamarse heterocromatina facultativa que se define como la cromatina que en una serie de casos varía de eucromatina a heterocromatina dependiendo de: estado de desarrollo; tipo celular; diferentes células de un tejido; cromosoma específico.....

El caso más conspicuo de heterocromatina facultativa es el de la heterocromatinización del cromosoma X en el sexo homogamético de mamíferos que se abordará al final del programa en el capítulo de la compensación de la dosis génica.

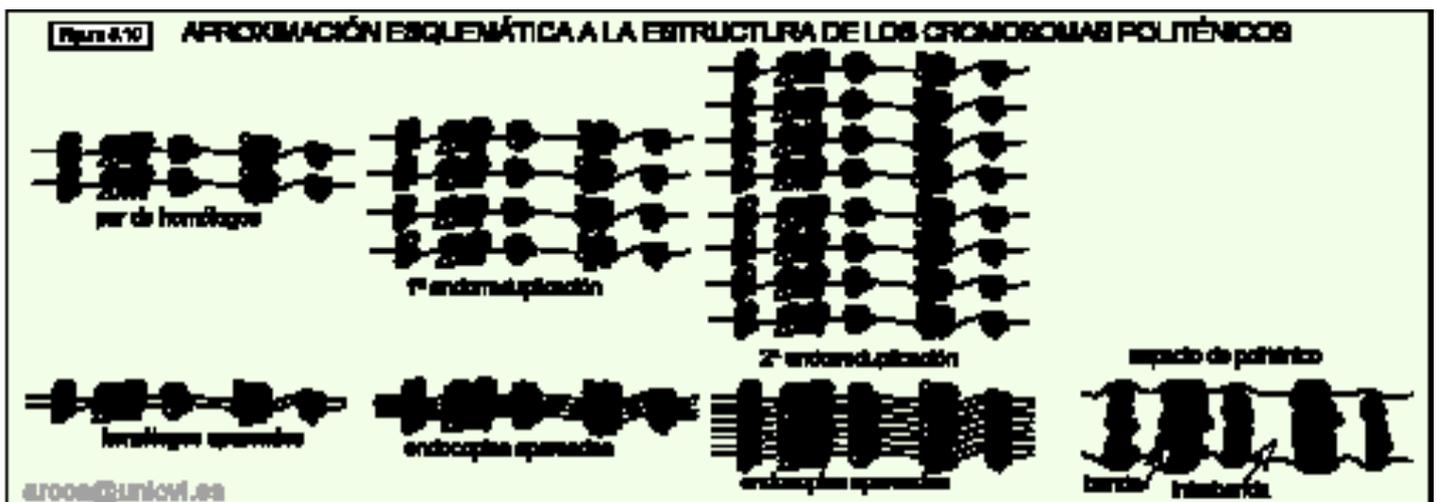
Nº DIPLOIDE DE CROMOSOMA: (especies más utilizadas en citogenética)	Nº DE CROMOSOMAS (casos extremos)
Homo sapiens: 2n=46	Crepis capilaris 2n=6
Drosophila melanogaster 2n=8	Crocus s.p. 2n=6
Drosophila virilis 2n=12	Ophioglossum (helecho) 2n=(aproximadamente) 500
Alium cepa 2n=16	Voaniola geradii (monocotiledónea) 2n=596
Secale cereale 2n=14	Sedum suaveolens (dicotiledónea) 2n=640
Triticum aestivum 2n=42	Myrmecia pilosula (hormiga) machos n=1; hembras 2n=2
Triticum monococcum 2n=14	Parascaris (nematodo) somática 2n=60; germinal n=1 ó n=2
Triticum turgidum durum 2n=28	Lysandra atlantica (lepidóptero) 2n entre 430 y 470
	Tympanoctomys barrarae (roedor) 2n= 102



### CROMOSOMAS ESPECIALES: CROMOSOMAS POLITÉNICOS

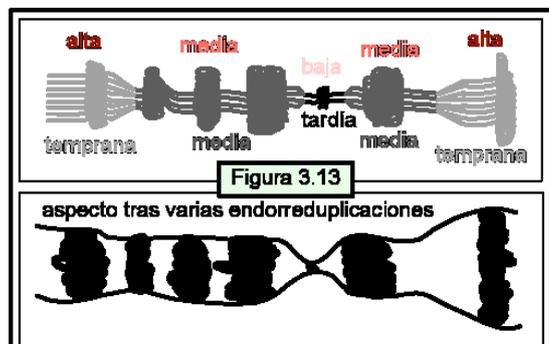
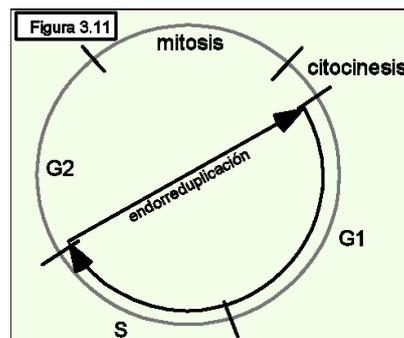
En 1933 Painter, Meitz y Bauer descubrieron que las estructuras largas con engrosamientos y estrías que Balbiani había descrito en 1881 en glándulas secretoras de dípteros eran en realidad un tipo especial de cromosomas. Se les llamaron cromosomas politénicos (muchos filamentos) y se pudo determinar que están formados por sucesivas replications de pares de cromosomas homólogos sin separación ni de cromosomas ni de cromátidas (endorreduplicaciones). El número de cromosomas politénicos que presenta una célula es  $n$  ( $1/2$  de los de una célula diploide normal) ya que como punto de iniciación de las endorreduplicaciones los cromosomas homólogos aparean o se asocian entre sí [por ejemplo, *Drosophila melanogaster* ( $2n=8$ ) tiene 4 cromosomas politénicos y *D. virilis* ( $2n=12$ ) tiene 6]. Se han descrito en algunos tejidos de algunos animales como las glándulas salivales de dípteros y en algunos tejidos de algunos vegetales como el suspensor del guisante.

Las endorreduplicaciones se producen en cromosomas interfásicos y el aspecto bandeado de estos cromosomas se debe a la coincidencia en el apareamiento de homólogos y en las endocopias de los cromómeros (bandas) y la cromatina intercromomérica (interbandas). (Fig. 3.10)



Como la espiralización a nivel de cromómeros se mantiene en las endocopias, los cromosomas politénicos resultan unas 200 veces más largos que los metafásicos y su diámetro al cabo de entre 13 y 16 endorreduplicaciones alcanza entre 100 y 250  $\mu\text{m}$ .

Tradicionalmente se han explicado las endorreduplicaciones como una modificación del ciclo celular tal que al acabar S las células pasan directamente al ciclo siguiente en G1 (Fig.3.11). Sin embargo este modelo no explica satisfactoriamente las observaciones realizadas por Sorsa y Sorsa al microscopio electrónico de transmisión, consistentes en que el grosor de los cromosomas politénicos no es homogéneo en toda su longitud, no todos los segmentos tienen el mismo número de endocopias. (Fig. 3.13)

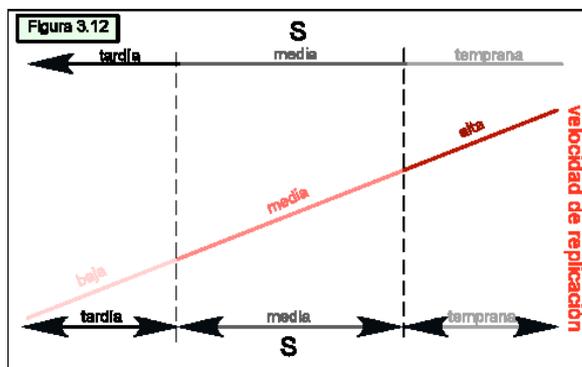


Las endocopias se dicotomizan al pasar de zonas más estrechas a otras más anchas.

Sabiendo además que las zonas heterocromáticas que replican durante el final del periodo S tienen un número muy bajo de endorreduplicaciones y que las zonas con número alto se corresponden con zonas de replicación temprana, en la actualidad los modelos de endorreduplicación proponen que las células se mantienen siempre en la

fase S endorreduplicándose más veces las de replicación más temprana (en este caso lo importante es que es más rápida) y menos las de comienzo de replicación más lento. (Fig.3.12).

Así, después de 13 endorreduplicaciones las zonas de replicación más temprana estarán compuestas por 16.384 cromosomas en paralelo y en el mismo tiempo las zonas heterocromáticas apenas se habrán endorreduplicado hasta 8 o 16 endocopias.



La finalidad de la politenia parece ser la obtención de más copias de información que permitan transcribir más y obtener así un producto génico mucho más abundante. En este sentido se ha detectado transcripción en las bandas de los politénicos aunque la cromatina se encuentra plegada sobre sí misma (cromómeros) y niveles mayores de transcripción en las zonas de alta endorreduplicación que reciben el nombre de ADN puff. Por contra las zonas estrechas tienen poca transcripción y en las zonas heterocromáticas ésta es nula.

*Los genes de mantenimiento general de la célula (Gk), con replicación temprana, tienen más endorreduplicaciones y producen más proteína. Este hecho explica la endorreduplicación en tejidos con alta actividad metabólica (glándulas salivales de dípteros) pero parece contrapuesto con que la sufran sólo unos pocos tejidos y que no son más activos los genes específicos (Gs) de esos tejidos en concreto.*

Existe un mecanismo para hiperactivar determinados genes en determinados momentos del desarrollo, por supuesto en células con politenia. Se trata de la desespiralización completa de una banda o zona de pequeñas bandas próximas entre sí, con lo que la transcripción se multiplica exponencialmente. Cuando se produce este tipo de desespiralización se dice que se forma un puff (Fig. 3.14).

Los puff son producidos por la acción directa de hormonas como la ecdisona y son estructuras reversibles.

Los segmentos heterocromáticos están menos endorreduplicados y además de la fragilidad propia de su estrechez, presentan la propiedad de tener cierta tendencia a

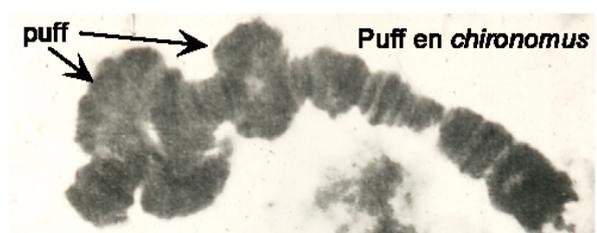


unirse entre sí. Las zonas heterocromáticas que son muy extensas, como los centrómeros de *Drosophila*, quedan muy reducidas en las células con politenia y además se asocian entre sí formando una estructura llamada cromocentro, de la que salen los brazos cromosómicos.

Otras zonas heterocromáticas como telómeros y estrechamientos tienden también a unirse entre sí y con los cromocentros con una frecuencia que según Barr y Ellison es proporcional a la cantidad de heterocromatina. A este tipo de uniones esporádicas se les llamó apareamientos ectópicos.

Los patrones de bandas igual que los patrones de cromómeros en las etapas iniciales de la profase I en meiosis, permiten identificar cromosomas e incluso regiones cromosómicas muy pequeñas. Esta característica hace de los cromosomas politénicos el material ideal para el análisis citogenético de anomalías estructurales, para la realización de mapas físicos y para su integración con los genéticos.

El modelo que explica perfectamente la politenia puede considerar solamente la velocidad de replicación. Los cromosomas entran en una sucesión de replications a diferentes velocidades; al final las zonas rápidas tienen muchas más endorreduplicaciones que las zonas lentas.



*Los puffs ponen de manifiesto que toda la banda es una unidad de función y funciona de forma coordinada. ello hace pensar que no debe contener genes aleatoriamente asociados.*