

# Localización in situ de heterocromatina -ADN satélite- en cromosomas humanos \*

Dr. Emilio Yunis \*\*

## INTRODUCCION

La técnica para localizar heterocromatina constitutiva, de la variedad respectiva (ADN satélite), surgió de los trabajos de Jones (1) y Pardue y Gall (2). Con ellos se mostró claramente que el ADN satélite, marcado radioactivamente, hibridizada in situ con regiones complementarias en los cromosomas. Las zonas de híbridos formados de esa manera estaban localizadas alrededor del centrómero. El hecho notorio de que esas regiones tienden en muchas oportunidades espontáneamente a colorearse más intensamente cuando se usa el colorante

de Giemsa, llevó a pensar y desarrollar técnicas que permitieran realizar dicho fenómeno (3, 4). Esto se ha logrado empleando el mismo procedimiento que el seguido por Pardue y Gall usando como agente desnaturizador del ADN el calor o el NaOH seguida de renaturalización en buffer adecuado por períodos de tiempo variables.

## MATERIAL Y METODOS

Cultivos de leucocitos de varios pacientes procesados en forma rutinaria fueron empleados como base del presente trabajo y tratadas luego las preparaciones de acuerdo a la técnica descrita por Arrighi y Hsu (4) con ligeras modificaciones. En esencia consiste en tratar las células con RNasa previa hidrólisis de las mismas

\* De la Sección de Genética Humana, Departamento de Morfología, Facultad de Medicina, Universidad Nal. de Colombia.

\*\* Profesor Asociado, Director de la Sección de Genética Humana, Universidad Nal. de Colombia.

con HCl 0.2N. El agente desnaturador empleado fué en todos los casos NaOH 0.07N seguida de renaturalización durante toda la noche en 2 x SSC (5). La técnica empleada difiere de la seguida por Pardue y Gall en el hecho de no ser auto-radiográfica sino cito-química.

## RESULTADOS Y DISCUSION

La heterocromatina aparece prácticamente en todos los cromosomas en la región centromérica. Sin embargo, una mirada más detenida permite ver que la cantidad de la misma no es igual en todos ellos. (Figuras N<sup>os</sup>. 1 y 2).

Presentan un bloque mayor heterocromatina los cromosomas 1,16, un par del grupo C, un par del grupo D y el cromosoma Y.

El cromosoma 3 muestra en forma constante un bloque heterocromático menor que el que presenta el 1, pero mayor que el que se aprecia en el 2. (Figura N<sup>o</sup> 3).

El grupo B de cromosomas presenta cantidades pequeñas de heterocromatina, en forma muy similar para cada uno de los pares.

El grupo C despliega cantidades variables de heterocromatina en

cada uno de sus cromosomas; es notorio un bloque de mayor tamaño en uno de ellos, como fue anotado antes.

El grupo D de cromosomas presenta un patrón diferente para cada uno de sus pares; los contenidos de heterocromatina parecen decrecer hasta llegar a ser poco ostensible en uno de ellos. (Figura N<sup>o</sup> 4).

El cromosoma 16 presenta un bloque grande de heterocromatina, localizado sobre los brazos largos, en tanto que el tamaño del mismo es menor para el 17 y el 18 localizándose en éste último preferencialmente sobre los brazos cortos.

En el grupo F la distinción es difícil y aparentemente ambos pares presentan bloques visibles localizados centroméricamente.

En el grupo G el contenido de heterocromatina es mayor aparentemente en un par. (Figura N<sup>o</sup> 4).

Notorio es el hecho de no revelarse heterocromatina en sitio diferente a la región del centrómero, con excepción del cromosoma Y que presenta heteropicnosis en la porción distal de los brazos largos. (Figuras N<sup>os</sup>. 2 y 4). Este fenómeno es de gran interés dado que concuerda exactamente con

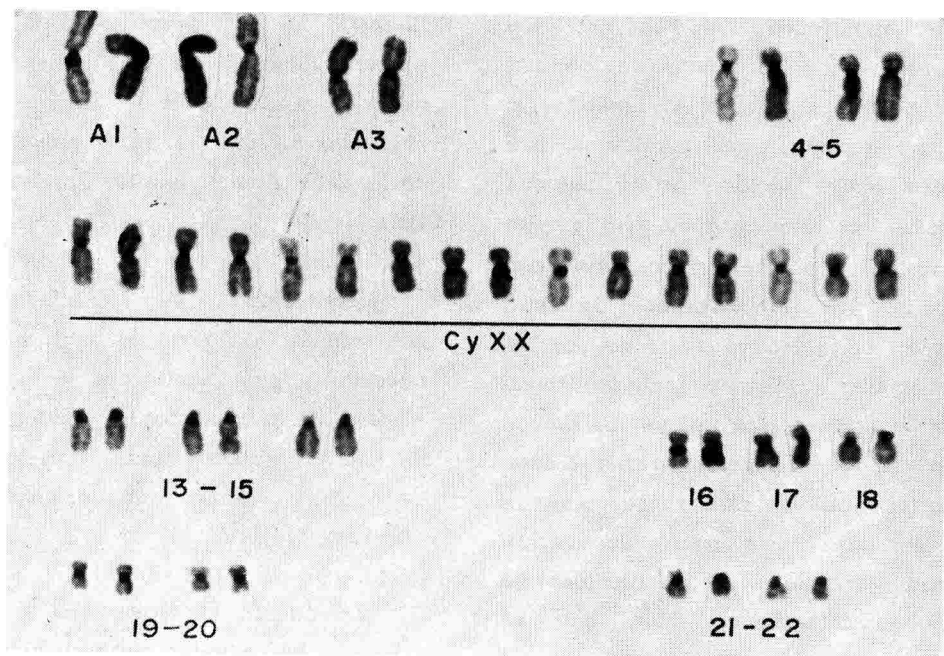


FIGURA N° 1 Cariotipo correspondiente a una célula femenina. Nótese la constancia en la localización de la heterocromatina repetitiva en la región centromérica.

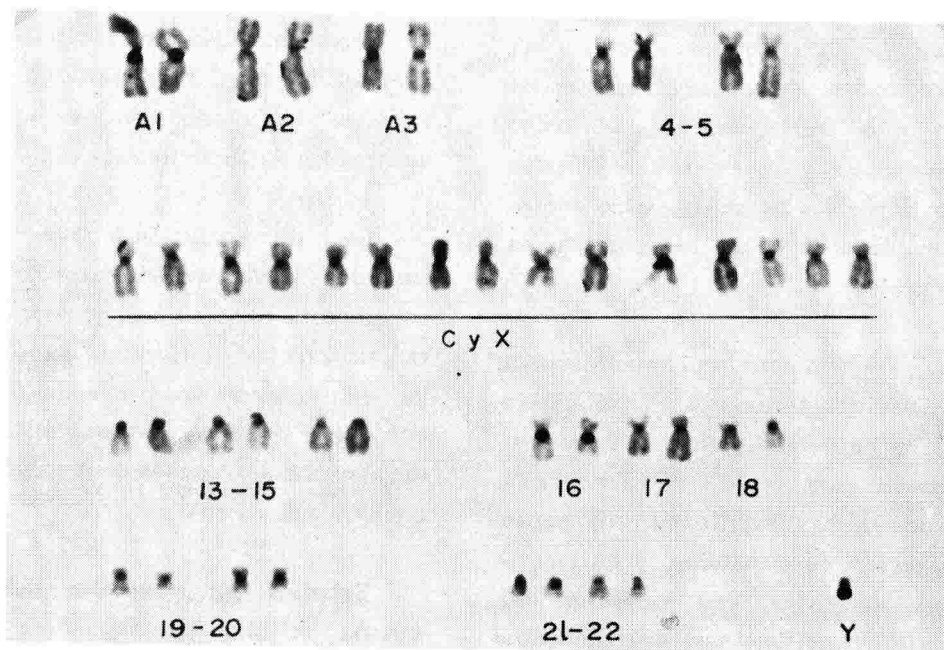


FIGURA N° 2 Cariotipo correspondiente a una célula masculina. Se observa el mismo patrón que en la Figura N° 1. El cromosoma Y muestra clara heteropícnosis en la porción distal de sus brazos largos.

los resultados obtenidos en los estudios de fluorescencia con el cromosoma Y humano (6). Sin embargo, aparentemente, los resultados que ésta nueva técnica arroja parecen más ventajosos dada la amplia gama de patrones demostrada para todos los cromosomas. De otro lado, en el cromosoma Y es posible demostrar siempre eucromatismo en la porción proximal de los brazos largos, el centrómero y los brazos cortos. Esto último se muestra importante como punto de partida para dilucidar la evolución de dicho cromosoma, dado que se piensa que originalmente era un eucromático pequeño que fue aumentando su tamaño por translocaciones de heterocromatina autosómica; observaciones en ese sentido se desprenden de estudios realizados en mamíferos primitivos del orden Marsupialia y una especie de primates en donde no ha sido posible encontrar dimorfismo en los cromosomas sexuales (7).

Por otra parte, en la confrontación de las dos técnicas es significativo el hecho de que patrones de fluorescencia para todos los cromosomas solo se ha descrito en muy pocas especies de mamíferos, y en prácticamente todas, con excepción del gorilla gorilla, no se encuentra fluorescencia en el cromosoma Y (8). Por el contrario, la localización

in situ de ADN repetitivo con la técnica descrita es más universal como se desprende de los resultados obtenidos en ratón (3, 4), en especies de los órdenes Marsupialia, Carnívora, Insectívora y Primates diferentes al hombre (9), con un patrón de comportamiento y localización muy similar al discutido aquí. Esto concuerda plenamente con el gran número de informaciones existentes en la literatura sobre presencia de ADN satélite en diferentes especies (10, 11, 12).

En cuanto al cromosoma X se refiere, no revela comportamiento especial heteroploico con ésta técnica debido a que la heterocromatina puesta aquí de presente es del tipo constitutivo y no facultativo, lo cual ha sido demostrado ya en estudios de cromosomas sexuales de hembras de *Microtus Agrestis* (13).

La diferenciación clara de los dos pares de cromosomas G se presenta como un hecho importante para dilucidar el discutido problema de si existen dos trisomías en ese grupo con fenotipos muy similares o si todos los casos corresponden a trisomía de un solo par. (14).

Estudios por desarrollar deben mostrar si la visualización de la heterocromatina de naturaleza repetitiva preferencialmente en la

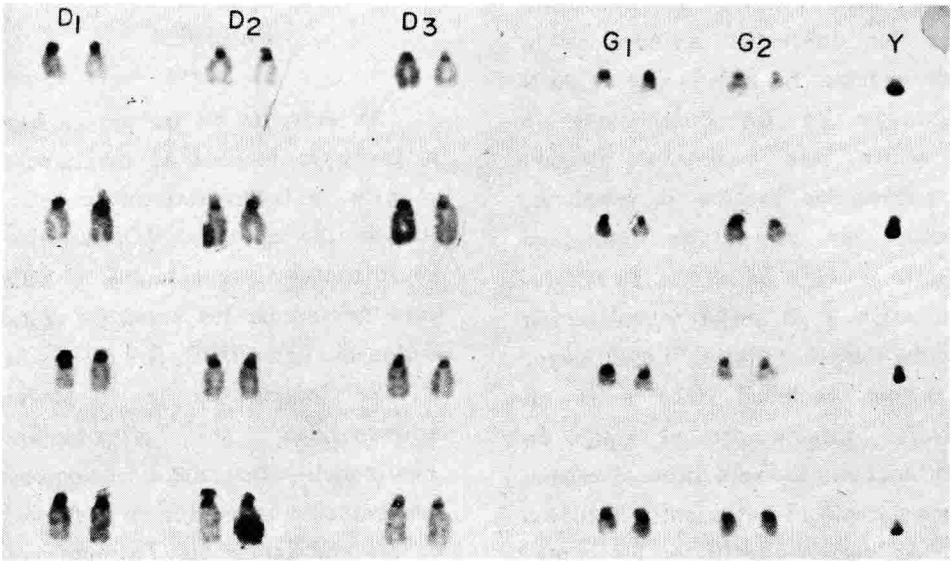


FIGURA N° 4 Composición fotográfica de cromosomas del grupo D, del grupo G y cromosoma Y correspondientes a cuatro células diferentes. Ver texto.



FIGURA N° 3 Cromosomas del grupo A correspondientes a cuatro células diferentes.

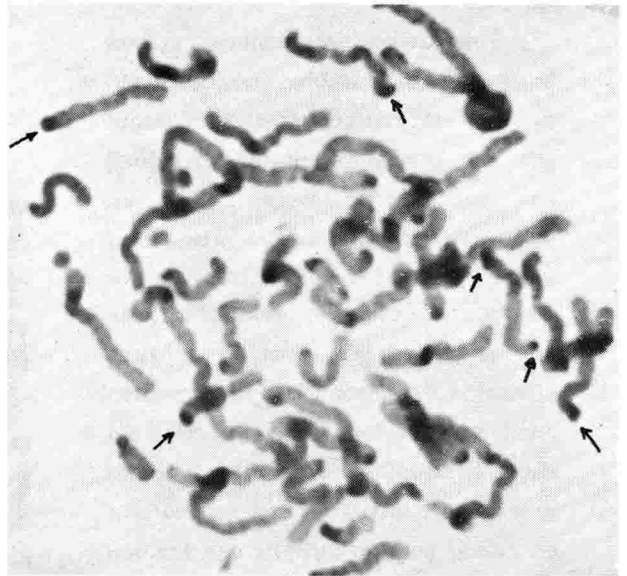


FIGURA N° 5 Profase. Las flechas están indicando porciones teloméricas en los cromosomas con heteropícnosis. Igualmente es notorio la heteropícnosis centromérica en algunos cromosomas.

región centromérica es constante para los diferentes períodos de la vida celular. Es sabido que el ADN encerrado en los cromosomas se encuentra más compacto, plegado y condensado durante la metafase, mucho más si es de naturaleza repetitiva; esto facilitaría su renaturalización y la mejor visualización de la heterocromatina cuya mayor o menor densidad debe estar en relación directa con el grado de contracción que ha sufrido el cromosoma durante el tratamiento. Estudios futuros podrán cuantificar los contenidos relativos de este tipo particular de heterocromatina en cada uno de ellos.

Sin embargo, debe tenerse presente la posibilidad de que cistrones de ADN repetitivo en menor cuantía que los presentes en la proximidad del centrómero puedan estar en otros segmentos del cromosoma y que estadios diferentes en la división celular, modificaciones al procedimiento técnico y una situación de mayor "Desplegamiento" puedan ponerlos de presente. En ese sentido, podría ser valioso revelarlos a nivel de los telómeros, en donde podrían cumplir una función como de "limitantes" o "delimitadores" de la individualidad del cromosoma. (15). (Figura Nº 5).

## RESUMEN

Se presenta un trabajo en base a la nueva técnica de localización in situ de heterocromatina constitutiva de tipo repetitivo (ADN satélite). Se discute su constancia y valor para diferenciar los pares de cromosomas del grupo D, G, A y cromosoma Y. Se insiste en la posible universalidad del procedimiento, confrontado con las restricciones que presenta la técnica de la fluorescencia con quinacrina, aparentemente limitada su positividad a primates superiores.

## SUMMARY

This paper presents the results of a work based on a new technique for "in situ" localization of constitutive heterochromatin of the repetitive type (satellite DNA). We discuss its constancy and value to differentiate the chromosomal pairs of groups A, D, G and Y chromosome. We point out the possible universalization of the new technical procedure vis a vis the restrictions presented by the fluorescent quinacrine technique which, apparently, gives a positivity limited to higher primates.

## REFERENCIAS

1. Jones, K.W. *Nature*, 225: 912, 1970.
2. Pardue, M.L., y Gall, J.G. *Chromosomal Localization of Mouse Satellite DNA*. *Science*, 168: 1.356, 1970.
3. Yunis, J.J., Roldan, Liliana., Yasmineh, Walid., Lee, J.C. *Satining of Satellite DNA in metaphase chromosomes*. *Nature*, 231: 532, 1971.
4. Arrighi, F.E., y Hsu, T.C. *Localization of heterochromatin in human chromosomes*. *Cytogenetics* 10: 81, 1971.
5. Marmur, J. A. *Procedure for the isolation of DNA from microorganisms*. *J. Molec. Biol.* 3: 208, 1961.
6. Caspersson, T., Zech, L., y Johansson, C. *Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes*. *Exp. Cell. Res.* 60: 315, 1970.
7. Yunis, E., Cayón, J., Ramírez, E. *Observaciones no publicadas aún.*
8. Pearson, P.L. y Col. *Quinacrine fluorescence in mammalian chromosomes*. *Nature*, 231: 327, 1971.
9. Yunis, E., Cayón, J., Ramírez, E. *Observaciones no publicadas aún.*
10. Yasmineh, W.G., y Yunis, J.J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 35: 779, 1969.
11. Yunis, J.J., y Yasmineh, W.G. *Satellite DNA in Constitutive Heterochromatin of the Guinea Pig*. *Science*, 168:263, 1970.
12. Yasmineh, W.G., y Yunis, J.J. *Localiza-tion of Mouse satellite DNA in Constitutive Heterochromatin* *Exp. Cell. Res.* 64:41, 1971
13. Arrighi, F.E., y Col. *Localization of repetitive DNA in the chromosomes of Microtus Agrestis by means of in situ hybridization*. *Chromosoma, Berl.* 32: 224, 1970.
14. Penrose, L.J. *Ciba Foundation* 25: 41, 1967.
15. Yunis, E., Cayón, J., Ramírez, E. *Observaciones no publicadas aún.*