

MORFOLOGÍA CROMOSÓMICA - CARIOTIPO

INTRODUCCIÓN

Morfología cromosómica

El cromosoma es el material hereditario (ADN) organizado alrededor de un esqueleto proteico, cuyas funciones son las de conservar, transmitir y expresar la información genética contenida en los genes que porta. En un núcleo eucariótico cada uno de los cromosomas es estructuralmente independiente de los otros, aunque no funcionalmente, debido a las interrelaciones que se establecen entre los mismos. Su estructura ha adquirido mayor complejidad a lo largo de la evolución, desde únicas moléculas de ADN de simple organización (procariontes), hasta complejas asociaciones de ADN con proteínas histónicas, que constituyen la cromatina (eucariontes). El cromosoma metafásico, corresponde al estado de máxima contracción de la cromatina, en el cual es posible estudiar los caracteres externos tales como forma, tamaño y número.

COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA CROMATINA: EL NUCLEOSOMA

Principales componentes

Los principales componentes que se obtienen cuando se aísla la cromatina de los núcleos interfásicos son el ADN, las histónicas, las proteínas no histónicas y el ARN. Si se toma como unidad de comparación la cantidad de ADN, los demás componentes aparecen en las siguientes proporciones:

ADN	HISTONAS	NO HISTONAS	ARN
1	1	0,5 - 1,5	0,05

La cantidad de las proteínas no histónicas puede variar de unos tejidos a otros en el mismo individuo y dentro del mismo tejido a lo largo del desarrollo.

Las Histonas

Las son proteínas básicas, ricas en residuos de lisina y arginina, que muestran un elevado conservadurismo evolutivo y que interacción con el ADN formando una subunidad que se repite a lo largo de la cromatina denominada Nucleosoma. Los principales tipos de histonas que se han aislado en los núcleos interfásicos en diferentes especies eucariontes son: H1, H2A, H2B, H3 y H4. Las características más sobresalientes de estas histonas aparecen en la siguiente tabla:

Histona	Nº residuos	Pm	Contenido en moles % de		Lys/Arg	Modificación	V. cambio evolutivo
			Lys	Arg			
H1	213	21.000	27,7	1,4	19,78	Fosforilación	4
H2A	129	13.900	10,9	9,3	1,17	Fosforilación, acetilación	1
H2B	125	13.774	15,2	6,1	2,49	Fosforilación, acetilación	1
H3	135	15.273	9,6	13,3	0,72	Acetilación, metilación fosforilación	0,1
H4	102	11.236	10,8	13,7	0,79	Acetilación, metilación fosforilación	0,06

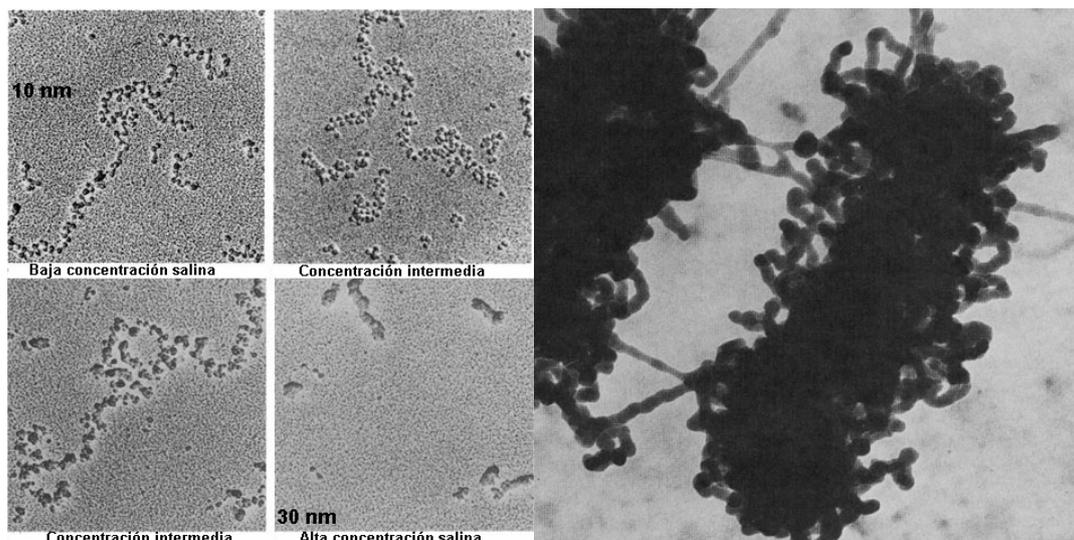
La velocidad del cambio evolutivo se mide como el número de cambios por cada 100 aminoácidos por cada 100 millones de años. Además de estas histonas, también existen otras que son específicas de tejido como es la histona H5 muy rica en lisina (25 moles%) específica de eritrocitos nucleados de vertebrados no mamíferos, y de las histonas del esperma.

Una de las características más destacables es su elevado conservadurismo evolutivo, sobre todo de las histonas H3 y H4. La histona H4 de guisante y de timo de ternera se diferencia solamente en dos aminoácidos. Este dato, indica que las interacciones entre el ADN y las histonas para formar la cromatina deben ser muy semejantes en todos los organismos eucariontes.

Los genes para las histonas se encuentran agrupados en nichos (o clusters) que se repiten decenas o centenas de veces (erizo de mar). Cada cluster o grupo contiene el siguiente orden de los genes para histonas: H1-H2A-H3-H2B-H4. Los genes para las histonas son ricos en pares G-C ya que codifican proteínas con elevado contenido en Lys y Arg, pero están separados por secuencias espaciadoras ricas en pares A-T.

El nucleosoma

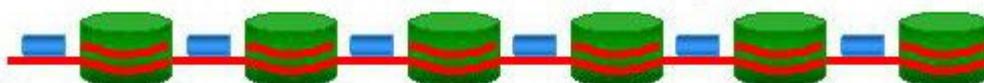
La observación de la cromatina interfásica mediante técnicas de microscopía electrónica podría describirse como la repetición de una subunidad esférica o globular (los nucleosomas) que estarían unidos por fibras de ADN. Esto le da un aspecto como de cuentas de un collar o de un rosario.



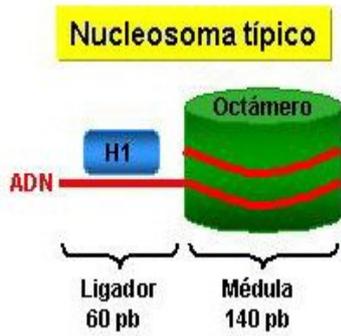
Cromatina eucariótica

Cromosoma metafásico de abeja

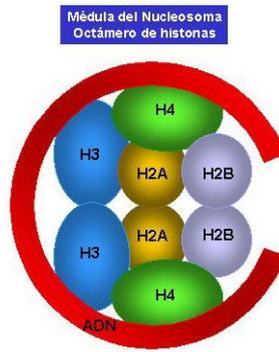
En la estructura de la cromatina la subunidad que se repite es el Nucleosoma



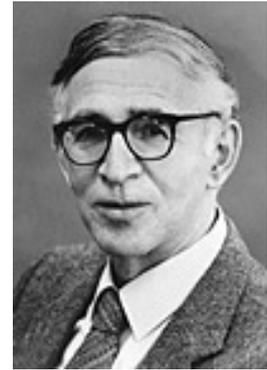
Un nucleosoma típico está asociado a 200 pares de bases (pb) y está formado por una médula ("core") y un ligador (o "linker"). La médula está formada por un octámero constituido por dos subunidades de las siguientes histonas: H2A, H2B, H3 y H4. Se trata de un dímero de las histonas (H2A, H2B, H3 y H4)₂. Los trabajos de A. Klug y colaboradores (1980) sobre la disposición de las histonas en la médula del nucleosoma le valieron el Premio Nobel de Química en 1982.



Nucleosoma Típico



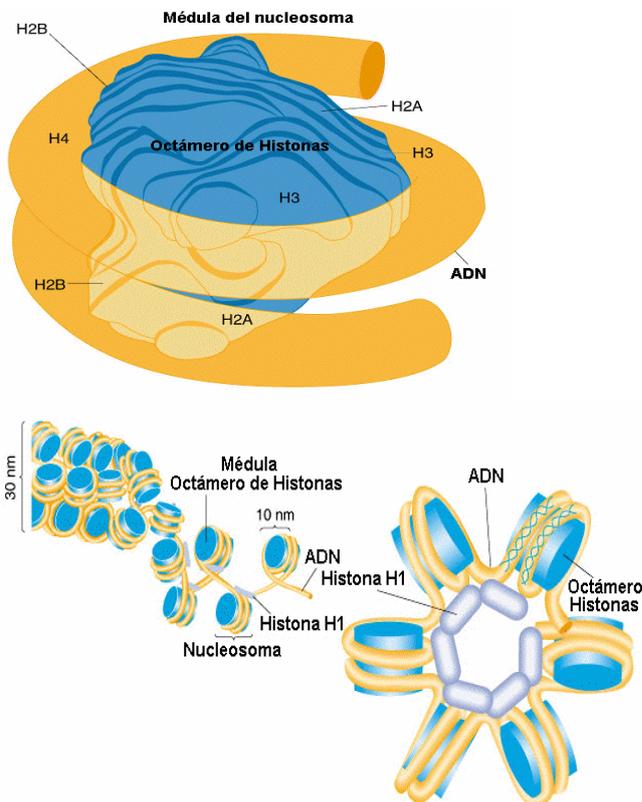
Médula de nucleosoma



Aaron Klug

Alrededor de la médula se enrolla el ADN (140 pb) dando casi dos vueltas (una vuelta y tres cuartos). El resto del ADN (60 pb) forma parte del ligador ("linker") y está interaccionando con la histona H1. La cantidad de ADN asociado con un nucleosoma varía de una especie a otra, de 154 pb a 241 pb, esta variación se debe fundamentalmente a la cantidad de ADN asociada al ligador ("linker").

Las fibras de ADN dúplex desnudo tienen un grosor de 20 Å. La asociación del ADN con las histonas genera los nucleosomas que muestran unos 100 Å de diámetro, a su vez los nucleosomas se pueden enrollar helicoidalmente para formar un solenoide (una especie de muelle) que constituye las fibras de cromatina de los núcleos interfásicos con un diámetro aproximado de 300 Å. Los solenoides pueden volver a enrollarse para dar lugar a supersolenoides con un diámetro de 4.000 Å a 6.000 Å que constituirían las fibras de los cromosomas metafásicos.

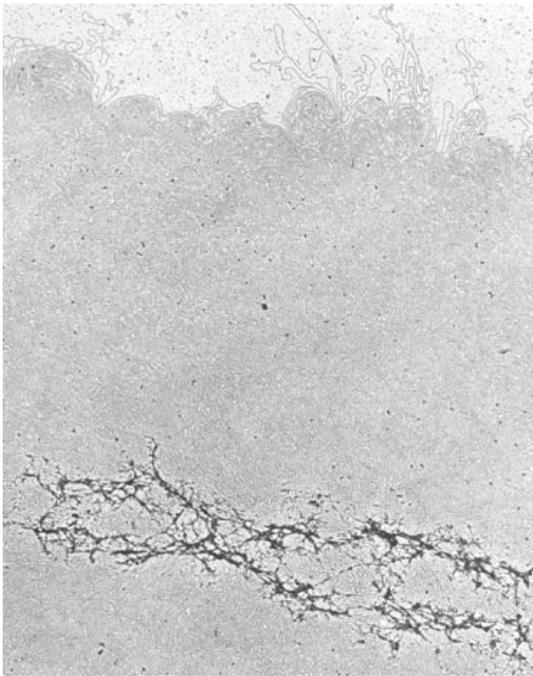


PROTEÍNAS CROMOSÓMICAS NO HISTÓNICAS: EL ARMAZÓN PROTEICO

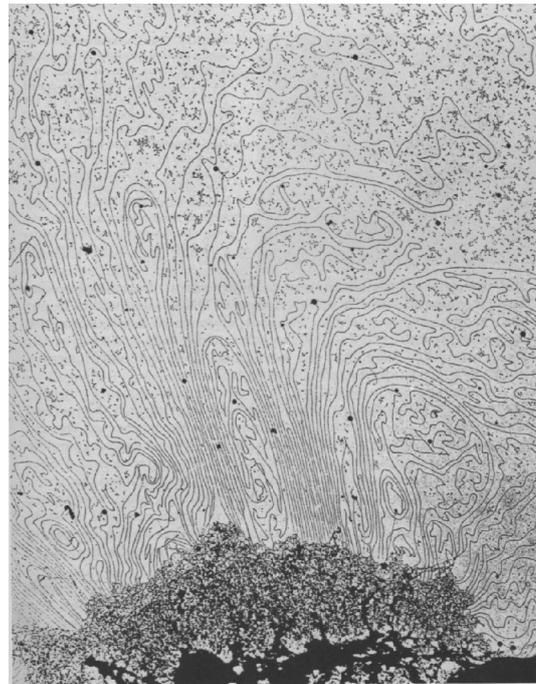
Las proteínas cromosómicas no histónicas son proteínas diferentes de las histonas que se extraen de la cromatina de los núcleos con ClNa 0.35M (solución salina), tienen un alto contenido en aminoácidos básicos (25% o más), alto contenido en aminoácidos ácidos (20-30%), una elevada proporción de prolina (7%), bajo contenido en aminoácidos hidrofóbicos y una alta movilidad electroforética. Las proteínas cromosómicas no histónicas que se extraen de la cromatina de los núcleos varían mucho dependiendo de la técnica de aislamiento empleada. Un grupo de estas proteínas cromosómicas no histónicas presentan alta movilidad electroforética y se denominan abreviadamente HMG (grupo de alta movilidad). Se han detectado más de 20 proteínas HMG, habiéndose encontrado las proteínas HMG-1, HMG-2, HMG-14 y HMG-17 en todas las especies de mamíferos, aves y peces estudiadas hasta el momento. Las proteínas HMG-1 y HMG-2 se encuentran sólo en el núcleo, están implicadas en la replicación, se unen preferentemente a ADN de hélice sencilla, desenrollan el ADN dúplex y se estima que existe una molécula de HMG-1 ó HMG-2 por cada 15 nucleosomas. Las proteínas HMG-14 y HMG-17 se encuentran en el núcleo y en el citoplasma, están relacionadas con la regulación de la transcripción y se estima que existe una molécula de HMG-14 ó HMG-17 por cada 10 nucleosomas.

Muchos estudios citogenéticos muestran que los cromosomas están claramente enrollados cuando se observan al microscopio, un buen ejemplo de esta situación son los cromosomas de los núcleos de algunos protozoos. El diámetro de las fibras de solenoides (enrollamiento helicoidal de las fibras de nucleosomas) observadas en núcleos en interfase es de 30 nm, sin embargo, el diámetro observado al microscopio para las fibras cromosómicas durante la división celular es de 700 nm. Por tanto, se han tenido que producir nuevos superenrollamientos. ¿De qué forma se producen estos nuevos niveles de compactación?

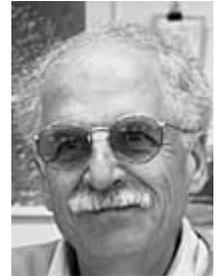
Laemmli y colaboradores en 1977 consiguieron aislar cromosomas metafásicos desprovistos de histonas mediante un tratamiento con sulfato de dextrano y heparina. Estos cromosomas metafásicos desprovistos de histonas presentan una médula central densamente teñida que ha sido denominada "scaffold" (armazón). Este armazón proteico ("scaffold") es resistente a la acción de la ADNasa, ARNasa y también a soluciones de ClNa 2M. Sin embargo, desaparece por tratamientos con urea 4M y dodecil sulfato sódico o por tratamiento con enzimas proteolíticas. Por tanto, se trata de un armazón proteico. La observación a microscopía electrónica pone de manifiesto que de este armazón proteico ("scaffold") salen y llegan lazos o fibras que pueden hacerse desaparecer mediante tratamiento con ADNasa. Por tanto, estos lazos o dominios que arrancan del armazón proteico son lazos de ADN. Uno de los principales componentes del armazón proteico es la enzima topoisomerasa II que produce cortes en el ADN dúplex a nivel de ambas hélices. La topoisomerasa II (girasa) interviene durante la replicación del ADN creando o relajando los superenrollamientos. La aparición de la topoisomerasa II (girasa) sólo en el armazón proteico sugiere que se encuentra en la base de los lazos o dominios de ADN, indicando que esta organización en dominios podría estar relacionada con la replicación y transcripción. Otras enzimas como la topoisomerasa I que produce cortes en el ADN dúplex a nivel de una sola hélice y la HMG-17 se encuentran sólo en los lazos o dominios y no en el armazón proteico.



Armazón proteico no histónico

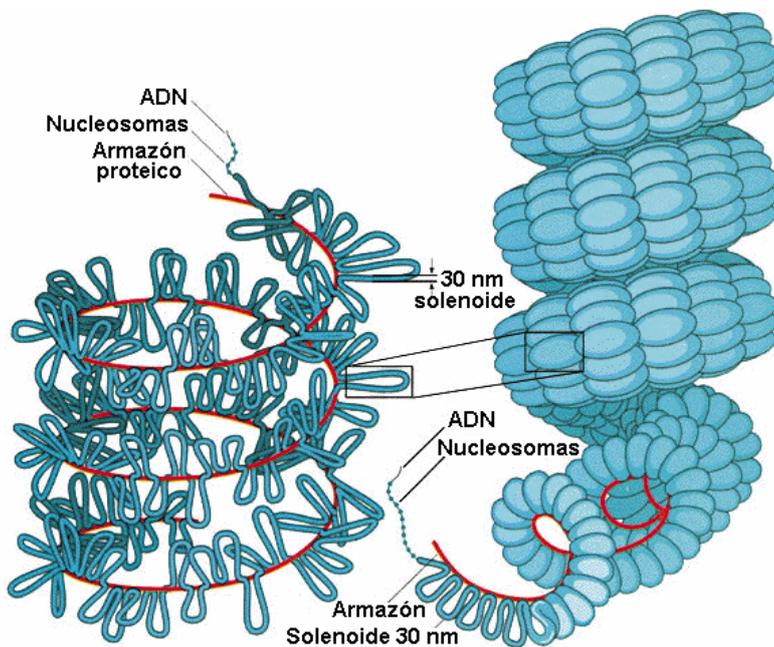


Armazón proteico no histónico

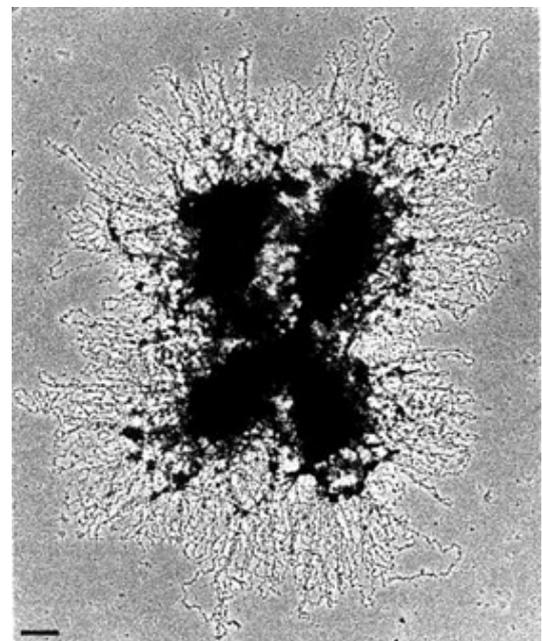


Ulrich K. Laemmli

La evidencia existente hasta el momento sugiere que las fibras de solenoides (30 nm) formarían los lazos o dominios que emanan del armazón proteico y que este armazón estaría a su vez enrollado formando una espiral.



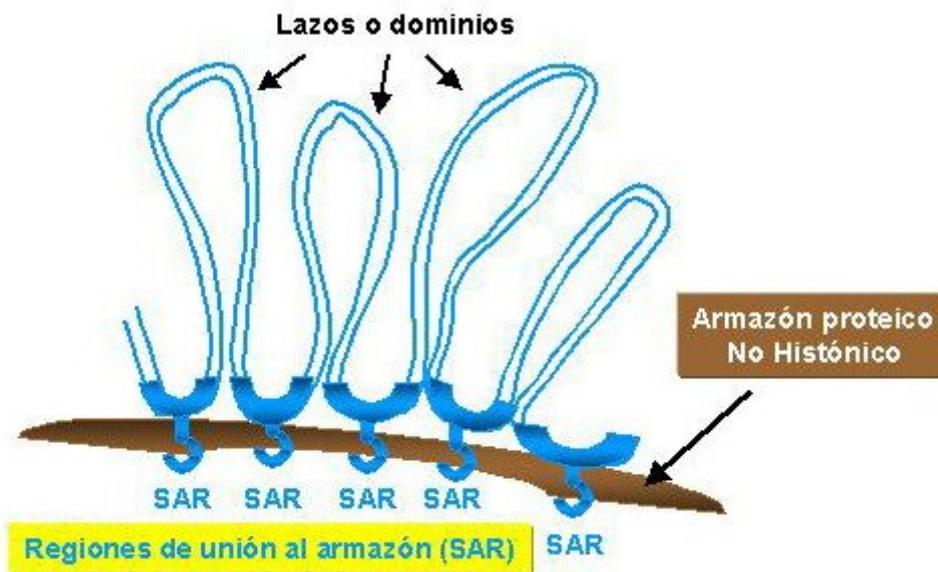
Organización en Dominios y Armazón proteico



Lazos en cromosomas sin extraer (Laemmli)

Los dominios de ADN parecen estar unidos al armazón proteico por unas regiones específicas denominadas abreviadamente SARs (regiones de asociación específicas) que se detectan cuando los cromosomas metafásicos desprovistos de histonas se tratan con endonucleasas de restricción. Después de este tratamiento quedan regiones de ADN unidas al armazón que a su vez resisten la digestión con exonucleasas gracias a que están

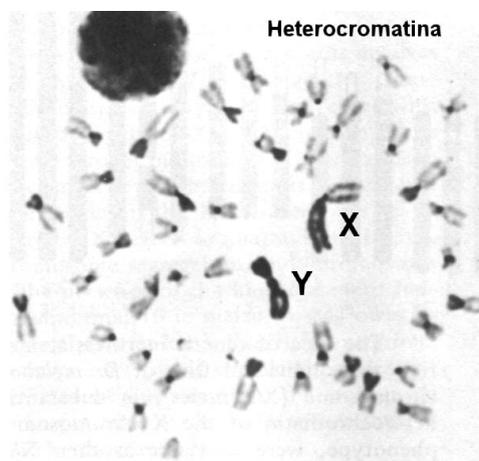
protegidas por una proteína. Cuando se digiere esta proteína, las regiones de ADN protegidas contienen secuencias que se sabe que son específicas para la unión de topoisomerasas. Estas regiones de unión específicas de los dominios al armazón proteico son las regiones SARs.



Unión de los dominios al armazón a través de las regiones SAR

EUCROMATINA Y HETEROCROMATINA

La cromatina o sustancia que compone los núcleos de las células y que resulta de la interacción del ADN con las proteínas histónicas, no histónicas y ARN; puede presentar distintos grados de empaquetamiento o contracción. Cuando los cromosomas se tiñen con sustancias químicas que se unen al ADN aparecen regiones densamente teñidas y regiones menos densamente teñidas. La cromatina mayoritaria, la que constituye la mayor parte del núcleo recibe el nombre de eucromatina y la minoritaria el de heterocromatina. La heterocromatina puede aparecer más densamente teñida que la eucromatina (heteropícnosis positiva) o menos densamente teñida que la eucromatina (heteropícnosis negativa). La aplicación de determinados tratamientos experimentales en combinación con diferentes tipos de tinción de los cromosomas, puede producir la aparición de zonas heterocromáticas en los cromosomas de muchas especies.



Eucromatina (menos teñida) y Heterocromatina (más teñida)

Estas zonas heterocromáticas presentan una distribución característica o patrón de bandas típico de cada cromosoma que permite identificar cromosomas distintos. Estas técnicas reciben el nombre de técnicas de bandeado cromosómico y son enormemente útiles en la identificación individual de los cromosomas y en la construcción de cariotipos.

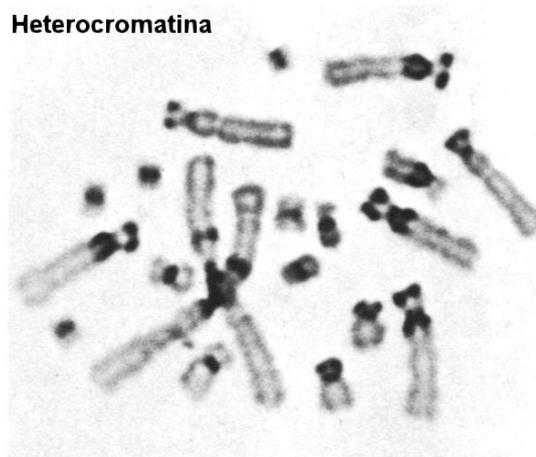
La eucromatina y la heterocromatina son ADN pero presentan algunas diferencias:

- **Diferencias genéticas:** Los experimentos de construcción de mapas demuestran que la mayor parte de los genes activos se localizan en la eucromatina. En los núcleos interfásicos, la eucromatina se tiñe menos densamente debido al menor grado de empaquetamiento, en general se acepta que este es el estado más compatible con la actividad génica y la transcripción. La heterocromatina se encuentra en muchos organismos flanqueando las regiones centroméricas, algunas veces también se encuentra en regiones teloméricas, e incluso se ha observado en algunos casos la existencia de cromosomas completos heterocromáticos, por ejemplo, el cromosoma Y de *Drosophila melanogaster*. La función de la heterocromatina no es aún conocida, se han detectado muy pocos genes activos en la heterocromatina, en *Drosophila* existen mutaciones letales en genes que se localizan en regiones heterocromáticas, por tanto, estos genes deben poseer alguna actividad. En cualquier caso, el porcentaje de genes activos localizados en regiones heterocromáticas es muy bajo comparado con el de genes activos situados en la eucromatina. La principal diferencia entre la eucromatina y la heterocromatina radica por tanto en la actividad de estos dos tipos de cromatina.
- **Diferencias citológicas:** A nivel estructural, en los núcleos interfásicos, existe un mayor grado de enrollamiento o empaquetamiento en la heterocromatina que en la eucromatina. La forma en la que se mantiene esta diferencia aun no es conocida.

Alociclia: la heterocromatina sigue un ciclo de condensación y descondensación distinto a la eucromatina. La heterocromatina puede aparecer más intensamente teñida que la eucromatina o menos intensamente teñida dependiendo del estado celular (alociclia). La alociclia a su vez está relacionada con la replicación del ADN. La heterocromatina se replica más tarde que la eucromatina.

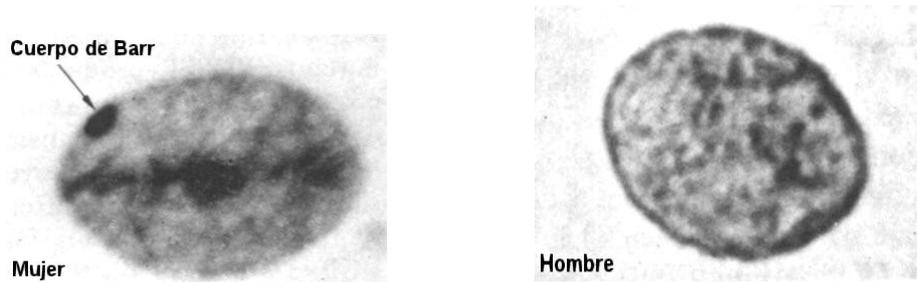
A su vez es posible distinguir dos clases de heterocromatina:

- **Heterocromatina constitutiva:** cromatina que aparece siempre más intensamente teñida que la eucromatina (heteropicnosis positiva), o menos intensamente teñida que la eucromatina (heteropicnosis negativa), independientemente del estado de desarrollo o fisiológico. Un ejemplo es el ADN satélite de las regiones centroméricas.



Heterocromatina constitutiva: regiones cercanas a los centrómeros

- - **Heterocromatina facultativa:** cromatina que aparece más intensamente teñida que la eucromatina, o menos intensamente teñida que la eucromatina dependiendo del estado fisiológico o del momento de desarrollo.



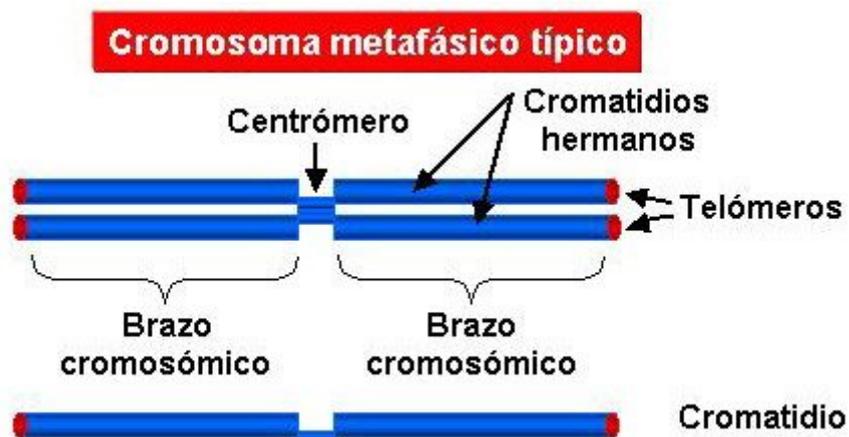
Interfase: Cromatina sexual, X inactivo en la mujer (cuerpo de Barr)

En la especie humana, todos los cromosomas X que están en exceso de uno aparecen más intensamente teñido que el resto de los cromosomas (heteropincosis positiva) en los núcleos de células en interfase. Por tanto, las mujeres normales que tienen dos cromosomas X, tienen un cromosoma X que aparece más intensamente teñido y que está inactivado. Sin embargo, durante las primeras etapas del desarrollo embrionario (durante los 16 primeros días de gestación en la especie humana) ambos cromosomas X son activos.

ESTRUCTURA EXTERNA DE LOS CROMOSOMAS: FORMA, TAMAÑO Y NÚMERO

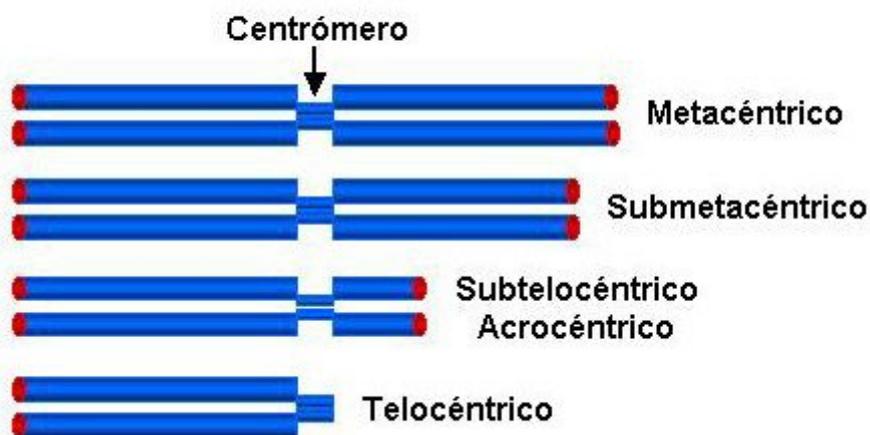
El estudio de la estructura externa de los cromosomas de cualquier especie eucariótica consiste en analizar la forma tamaño y número de los cromosomas que posee. El mejor momento para llevar a cabo dicho estudio suele ser aquel en el que los cromosomas han alcanzado su máximo grado de contracción y tienen sus bordes perfectamente definidos. Dicho momento suele ser la metafase mitótica. El estudio de la estructura externa de los cromosomas culmina con la obtención del cariotipo.

Forma: En metafase mitótica los cromosomas ya han pasado por un periodo de síntesis de ADN y están constituidos por dos **cromatidios o cromátidas** idénticas en grosor y longitud. Los cromosomas en estado de dos cromatidios han alcanzado su máximo grado de contracción y están en el centro de la célula, en la placa ecuatorial. La forma de los cromosomas viene determinada por la posición del **centrómero o constricción primaria**, región por la que los cromatidios interaccionan con las fibras del huso acromático para separarse a polos distintos. El centrómero aparece menos teñido que el resto del cromosoma. La mayoría de los cromosoma de las especies eucarióticas tienen el centrómero localizado en una región concreta.



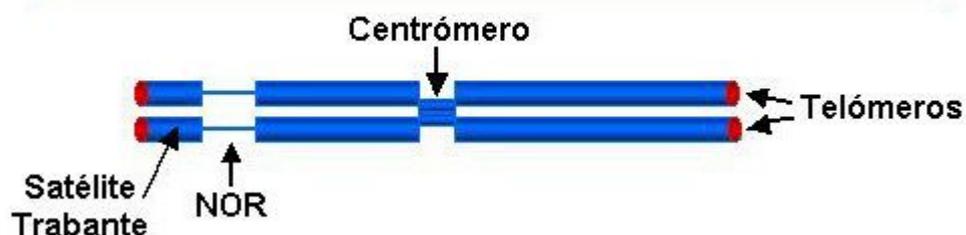
Existen cromosomas **Metacéntricos**, con el centrómero en el centro que divide al cromosoma en dos brazos iguales, existen cromosomas **Submetacéntricos**, con el centrómero desplazado hacia un lado que lo divide al cromosoma en dos brazos, uno un poco más largo que el otro; hay cromosomas **Subtelocéntricos** o **Acrocéntricos** que tienen el centrómero situado hacia el extremo dividiendo al cromosoma en dos brazos muy desiguales, uno bastante largo y el otro muy corto, y por último hay cromosomas **Telocéntricos** que tienen el centrómero en un extremo y, por consiguiente poseen un solo brazo. Un cromosoma metafásico típico está constituido por dos cromatidios hermanos idénticos (en grosor, longitud y con igual información genética), dichos cromatidios contienen un centrómero y telómeros en el extremo. Los extremos de los cromatidios poseen una estructura característica denominada Telómero, un cromosoma metacéntrico presenta telómeros al final de los dos brazos (en ambos extremos), mientras que un cromosoma telocéntrico tiene telómeros al final de su único brazo (en un extremo), por el otro extremo se encuentra el centrómero. Existen especies que tienen cromosomas con el centrómero difuso, situado a todo lo largo del cromosoma, sin localizar en un solo punto concreto.

Clasificación de los cromosomas por su forma



Algunos cromosomas eucarióticos, además de la constricción primaria o centrómero, poseen constricciones secundarias, la más importante es la Región Organizadora del Nucleolo (abreviadamente NOR), dicha zona contiene la información para producir el ARN-ribosómico y aparece menos teñida que el resto del cromosoma. Los cromosomas con NOR en muchos casos tienen después de la región NOR, entre esta y el telómero un segmento más o menos grande que se denomina Satélite o Trabante (no confundir con el ADN satélite).

Cromosoma metafásico con Organizador Nucleolar



Tamaño: Los cromosomas sufren grandes variaciones en su tamaño a lo largo del ciclo celular, pasando de estar muy poco compactados (interfase) a estar muy compactados (metafase), por tal motivo, los estudios sobre el tamaño suelen realizarse en metafase mitótica. Además, es necesario tener en cuenta que los tratamientos para teñir los cromosomas y para obtener las metafases mitóticas influyen de manera muy importante en el tamaño de los cromosomas. En cualquier caso, en general es posible decir que hay especies eucarióticas con cromosomas grandes y especies con cromosomas pequeños. Las monocotiledóneas (vegetales) y los anfibios y ortópteros (animales) poseen cromosomas muy largos (10 a 20 micras). Las dicotiledóneas, las algas, los hongos y la mayoría de las especies animales poseen cromosomas pequeños (longitud inferior a 5 micras). Naturalmente, existen algunas excepciones en los ejemplos citados. El cromosoma 1 humano tiene 0,235 pg de ADN, que equivalen a una longitud total de ADN doble hélice 7,3 cm y en metafase mitótica presenta una longitud aproximada de 0,001 cm.

Número: Las células somáticas de la mayoría de las especies eucarióticas tienen dos juegos de cromosomas, se trata de especies diploides, con un juego de cromosomas materno y otro paterno. El número de cromosomas se denomina **número diploide** y se representa como $2n$. El número de cromosomas de un juego cromosómico y que se corresponde con el número de cromosomas de un gameto de la especie se le denomina **número haploide** y se representa como n . Todos los cromosomas de las células somáticas aparecen por parejas de cromosomas homólogos (uno procedente del padre y otro de la madre) existiendo por tanto n parejas de homólogos. Los dos cromosomas homólogos tienen información para los mismos tipos de genes, aunque no poseen idéntica secuencia de bases nitrogenadas, ya que en un posición determinada o locus puede encontrarse la información que determina el color azul de ojos mientras que en el homólogo puede existir información para el color marrón. Sin embargo, los dos cromatidios hermanos de un mismo cromosoma poseen exactamente la misma información genética (la misma secuencia de bases nitrogenadas). El número de cromosomas $2n$ varía mucho de unas especies a otras y no existe relación entre el número de cromosomas, existen especies vegetales con pocos cromosomas como *Haplopappus gracilis* ($2n=4$), *Crepis capillaris* ($2n=6$) y *Secale cereale* ($2n=14$), especies vegetales con bastantes cromosomas como *Triticum aestivum* ($2n=42$) y especies vegetales con muchos cromosomas como *Ophioglossum petiolatum* ($n > 500$). En animales sucede algo semejante, hay especies con pocos cromosomas como la hormiga australiana *Myrmecia pilosula* cuyos machos tienen un cromosoma ($2N=1$) y las hembras dos cromosomas ($2n=2$), especies con bastantes cromosomas como la humana *Homo sapiens* ($2n=46$) y especies con muchos cromosomas como el lepidoptero *Lysandra atlantica* ($2n=434-466$). No existe ninguna relación entre el número de cromosomas $2n$ y la complejidad evolutiva, ni entre el número de cromosomas y la cantidad de ADN. Un ejemplo claro de esta situación es el de los ciervos del género *Muntiacus* en el que hay especies muy similares (denominadas especies gemelas) una con $2n=6$ (*M. muntjak*) y otra con $2n=46$ (*M. reevesi*).