

# Consideraciones sobre la estructura y cinética del cromosoma mitótico

Dr. Vicente Goyanes Villaescusa

Sección de Genética.  
Hospital Infantil "Teresa Herrera".  
La Coruña.

Los cromosomas y su contenido en ADN, son sin duda las estructuras biológicas más estudiadas en el siglo XX. Si bien conocemos cada vez más muchos de sus aspectos y funciones a nivel molecular, la organización espacial de sus niveles superiores de estructura permanece prácticamente desconocida.

Desde lo más sencillo a lo más complejo, hablamos de tres picogramos de ADN (en la especie humana) que deben integrarse en 46 cromosomas. En un primer nivel 200 pares de bases del ADN giran en torno a un octámero de histonas constituyendo el nucleosoma y dando una razón de empaquetamiento del ADN de 1 a 7. La integración de nucleosomas posiblemente en solenoides de 20-30 nanómetros de diámetro generaría fibras de aproximadamente 2 cms. de longitud. Así los 3 picogramos de ADN mostrarían ya una razón de empaquetamiento de 1 a 45-50. A partir de aquí empiezan verdaderamente las dificultades para conocer como ese solenoide o fibra de cromatina se organiza para constituir el cromosoma mitótico que conocemos a nivel de microscopía óptica o electrónica y que da una razón de empaquetamiento de 1 a 10.000.

Se han propuesto diversos modelos de organización de esta fibra. En la actualidad priman dos opciones: los que abogan por una organización que podríamos llamar superenrollamiento; es decir, varios niveles jerárquicos de enrollamiento hasta una espiral en la cromátide. El modelo más de moda, por otra parte, sugiere que existe un eje central no histónico que recorre la cromátide y del cual parten bucles de cromatina, más o menos horizontales. En un artículo de revisión en 1985, propusimos una definición de cromosoma partiendo de un concepto totalmente distinto. Concebimos el cromosoma como una estructura altamente ordenada, cambiante y perfectamente programada en el espacio y el tiempo. Su

morfología y dimensiones serían variables en el tiempo y dependientes por completo de las condiciones físico-químicas del medio ambiente celular. Es decir, un planteamiento ecológico, termodinámico en donde se cambia el concepto de estructura por el de función o sistema (1).

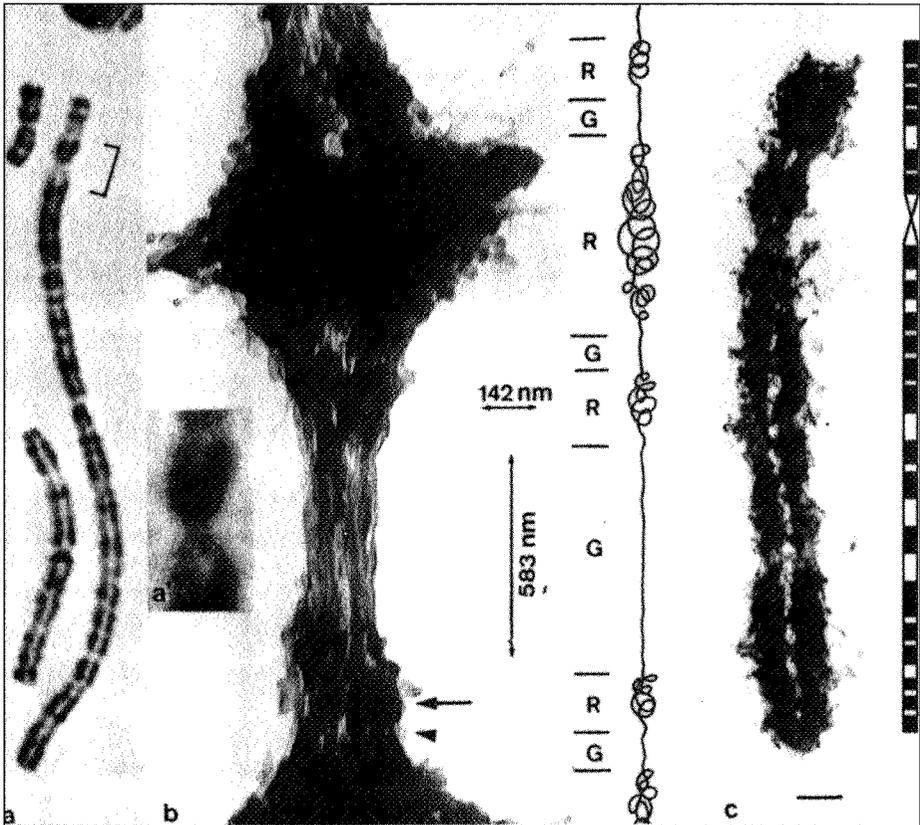
Lo que desarrollaremos a continuación es el resultado de diferentes intentos, durante las últimas dos décadas, por comprender el comportamiento cinético de la fibra de cromatina que, plegándose en el espacio, constituye cada cromátide.

En 1980, en colaboración con Sandberg y Matsui (2), tratamos cromosomas aislados de hamster chino mediante una fijación selectiva proteína-proteína por un pulso de formaldehído. La subsiguiente digestión parcial en suspensión con proteasas, permitió observar al microscopio electrónico el despliegue de la fibra y comprobar una sola unidad de fibra a lo largo del centrómero y que aparentemente empezaba y terminaba en los telómeros.

¿Qué factores generan el plegamiento de la fibra? Se ha propuesto la fosforilación de la histona H1, la conversión de grupos sulfhidrilos en disulfuros formando enlaces cruzados en la histona H3 y en proteínas no-histónicas, así como finalmente cambios iónicos de cationes divalentes. Los puentes disulfuro, una vez formados, podrían estabilizar la estructura ya condensada. También se ha propuesto la interacción de diversas proteínas no-histónicas de capacidad contráctil. Por el año 1972, colaboramos con Jaime Iglesias en un análisis del impacto de diversas sales sobre la organización de la cromatina interfásica. Toda una serie de sales generando fuerzas iónicas de 0,3 inducían una morfología similar a cromosomas metafásicos (3-4). Si bien esta influencia iónica sobre la compactación cromatínica fué posteriormente confirmada "in vitro" por otros grupos, su validez "in vivo" aun no está comprobada.

Cuando nosotros observamos al microscopio electrónico de transmisión un cromosoma profásico bien conservado, ¿cómo se organiza la cromatina? Bahr, propuso en los años 70 que la fibra se iba plegando selectivamente a determinadas alturas de la cromátide formando "cromómeros". Estos cromómeros serían simétricos en ambas cromátides y representarían la base estructural de la organización en bandas que nosotros percibimos, tras tratamientos, en los cromosomas metafásicos al microscopio óptico. Durante 1981-82 en colaboración con Josefina Méndez (5), se trataron cromosomas de hamster chino, en células vivas, con pulsos de 5-BrdU y bisbenzimidazoles 33258. Se obtuvo una inhibición de la condensación de los tramos de fibra de replicación tardía. Se indujo así un patrón de condensación en cromómeros claramente de bandas R, es decir, opuesto a la cinética fisiológica de condensación del cromosoma no tratado (Fig. 1). La conclusión principal consistió en considerar a la banda-cromómero como una unidad independiente de condensación a lo largo de la cromátide. Es decir, un tramo de fibra se comportaría cinéticamente de un modo independiente con respecto a los tramos anterior y siguiente al mismo.

En el mismo proyecto de colaboración anterior se exploró la razón del paralelismo de las cromátides hermanas durante las primeras fases de la mitosis. ¿Por



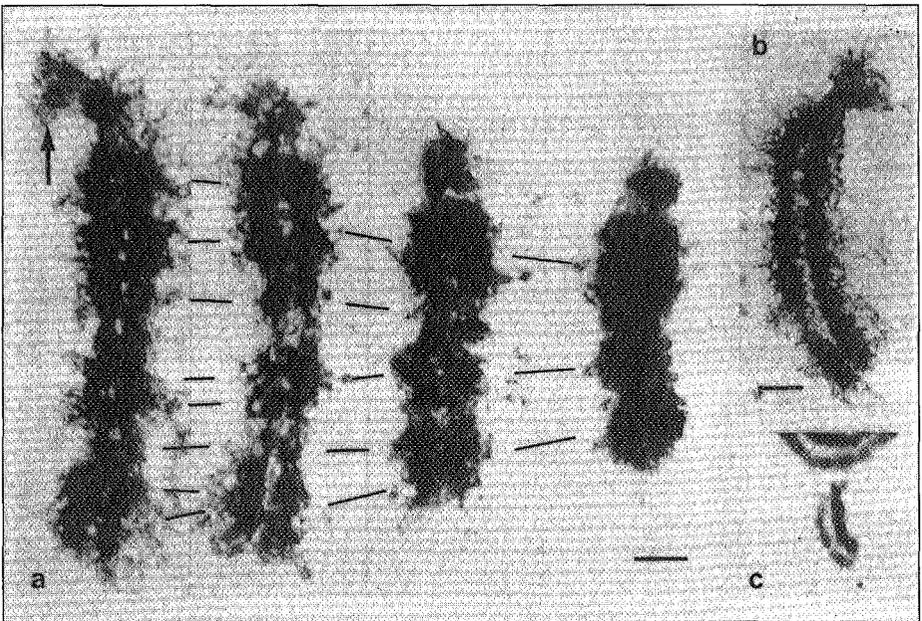
**Figura 1: Inhibición de la condensación en zonas de cromatina conteniendo ADN de replicación tardía. La banda-cromómero se comporta como un tramo de fibra de cromatina independiente y autónomo en su condensación con respecto a los tramos de fibra anterior y siguiente. (Tomado de cita bibliográfica n° 5).**

qué las cromátides se mantienen paralelas hasta mediada la metafase? Diseñamos un sistema inhibiendo diferencialmente la condensación de las dos cromátides de un cromosoma, permitiendo una velocidad diferencial de condensación (6). Así, si ambas cromátides permaneciesen libres de conexiones entre ellas, la cromátide rápida más corta y gruesa permanecería recta lo mismo que su homóloga lenta, delgada y más larga. El resultado en todos los casos mostró cromosomas doblados y asimétricos, con ambas cromátides torcidas en la misma dirección. Parece que los cromómeros simétricos de ambas cromátides interdigitan sus bucles internos estabilizando las conexiones entre cromátides. La cromátide que se acorta más rápidamente, tirará de la lenta y producirá el doblamiento de ambas. Denominamos a estas conexiones funcionales y temporales (se van liberando en meta-anafase), “conexiones extracentroméricas”.

La realidad de estas conexiones intercromoméricas también pudo demostrarse en un análisis de diplocromosomas con Bernardo Schvatzman (7). Comprobamos la ausencia de inmadurez centromérica, presencia de dos centrómeros bien constituidos y que la estabilidad de ambos miembros del par cromosómico, tras la endoreduplicación, se debía a puentes de conexión intercromoméricos entre las cuatro cromátides del diplocromosoma.

Otro tema de interés, aún no resuelto, es el del trayecto total de la fibra recorriendo la cromátide. Tanto en la ultraestructura de intercambios de cromátides hermanas (1983)(8), como en roturas cromatídicas (José Luis Fernández, 1990), se definió el concepto de “borde de intercambio” y “borde de rotura”, respectivamente (9,10). Ambos bordes definían el trayecto interior de la fibra de cromatina. Su inclinación mostró variaciones claras en relación directa al nivel de condensación del cromosoma.

Un punto de vista que nos es muy grato, es el de “reclutamiento local de la cromatina” que expresa muy bien el carácter cinético de la fibra en el tiempo, formando o deshaciendo bandas y satélites. La confluencia de sub-bandas profásicas para formar las bandas clásicas del cariotipo metafásico, definen muy bien este comportamiento cambiante espacio-temporal (Fig. 2). En 1990, María Isabel Malheiro comprobó que los satélites cromosómicos representaban estructuras irregularmente esféricas de 0,215 micras de diámetro. Una evaluación morfométrica



*Figura 2: Reclutamiento de la fibra de cromatina. Conforme avanza la condensación, la cromatina de la interbanda va siendo integrada en las bandas. (Tomado de cita bibliográfica n° 5).*

demonstró que los brazos cortos de los cromosomas D y G carentes de constricciones secundarias, habían integrado la fibra de cromatina satélite. Incluso pudo demostrar esto mismo en cromosomas con una cromátide presentando un satélite y su constricción secundaria, y la cromátide simétrica con toda la cromatina satélite integrada en un brazo corto de mayor tamaño (11).

El plegamiento y desplegamiento de la fibra en la cromátide durante la mitosis, también genera cambios de volumen del cromosoma. Eduardo Pásaro comprobó un incremento del volumen de las cromátides, conforme se incrementa la condensación cromosómica durante la metafase. Teniendo en cuenta que el diámetro de la fibra cromatínica no varía, este aumento de volumen parece ser debido a una mayor separación de los bucles cromatínicos entre sí (12-13).

Siguiendo con este enfoque cinético testamos el comportamiento de la condensación de la eucromatina y heterocromatina en el cromosoma Y humano, inhibiendo la metilación del ADN con 5-azacitidina y distamicina A "in vitro". Laura Sánchez y Angeles Freire (1992), comprobaron ambos brazos cortos inalterados y un centrómero fuertemente empaquetado. Los brazos largos mostraron claramente una región proximal, eucromática, bien condensada y una región heterocromática, banda C positiva (14). El nivel de organización de esta zona era interfásico-profásico y la fibra de cromatina sin cambios en la densidad electrónica y diámetro. Aparte de diferencias en las secuencias de bases, podría argüirse contenidos no-histónicos algo diferentes en la fibra eucromatínica y heterocromatínica. Así comprobamos una neta diferencia argentófila de ambas zonas (15). Para terminar con la dinámica del plegamiento de la fibra en el cromosoma Y, comentaremos que en casos de traslocación de la heterocromatina a otros cromosomas como es el caso de los brazos cortos del X (en un caso clínico nuestro), el comportamiento cinético de la fibra heterocromatínica del Y permanece similar a lo comentado anteriormente.

¿Existen varios tipos de fibra heterocromatínica? ¿Está clara su localización centromérica y yuxtacentromérica? ¿Su composición es similar en bases y en proteínas no-histonas? Sabemos de la existencia de familias de secuencias satélites repetidas en Tandem y de secuencias intercaladas (16). Parece existir asimismo unos contenidos proteicos específicos que pueden generar patología por formación de anticuerpos. Determinadas técnicas ultraestructurales nos dejan observar en el interior del centrómero del cromosoma telocéntrico de ratón, una cromatina de comportamiento específico formando una especie de núcleo central banda C positivo. Asimismo, en los cromosomas humanos 1,9,15 y 16 Laura Sánchez y Paulino Martínez (1989, 1991) han podido distinguir claramente, el centrómero de la heterocromatina yuxtacentromérica (17-18). Una inhibición de la condensación de esta última, permitió medir el tamaño del centrómero, se observó que el centrómero del cromosoma 9 presenta un área de 0,555 micras cuadradas, similar al del cromosoma 15 y diferente de los cromosomas 1 y 16. No se encontraron variaciones interindividuales. Parece existir una correlación positiva entre el tamaño del cromosoma y su región centromérica.

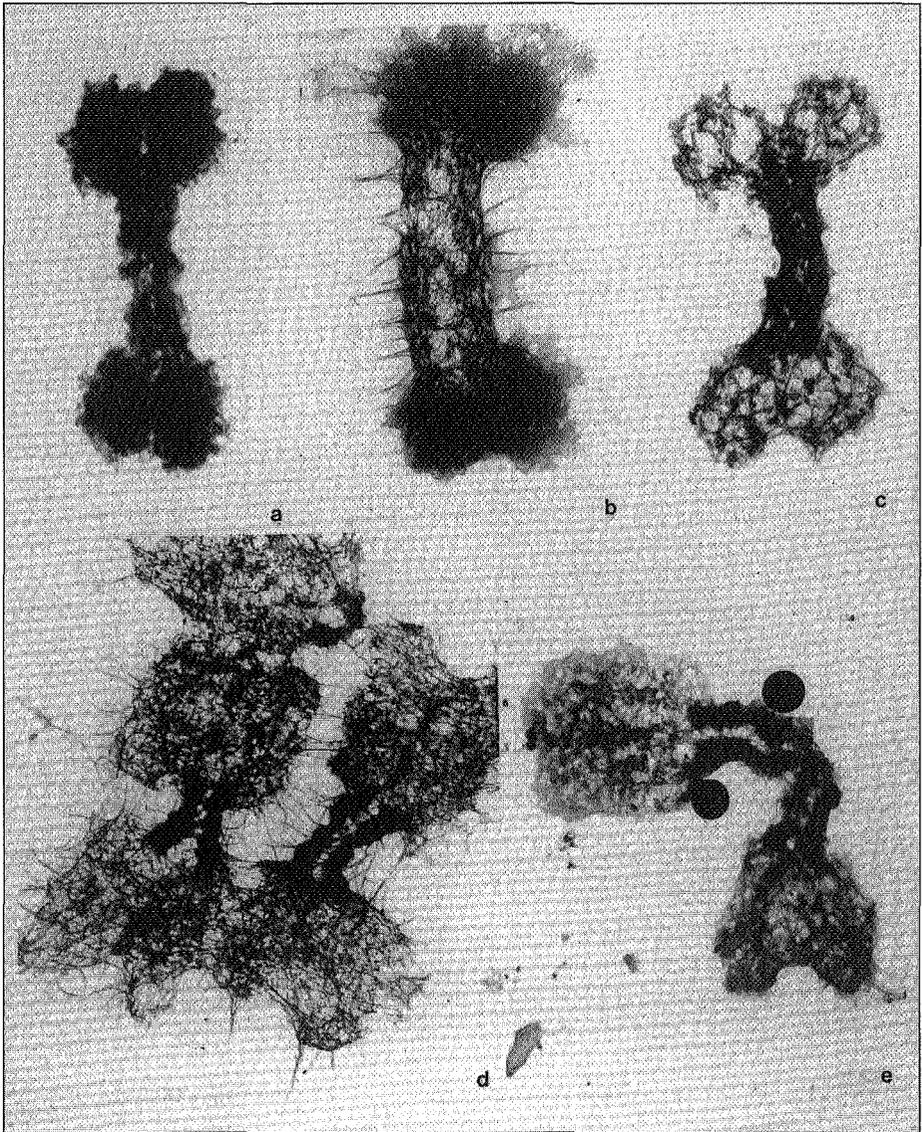
El centrómero de ratón, rico en ADN satélite, puede ser fuertemente inhibido en su condensación tras incorporar en la fibra de cromatina bisbencimida 33258. Proyectos llevados a cabo con Vicente Franch, J. Gosálvez y otros (1988, 1990), mostraron que la heterocromatina intracentromérica se organizaba en cromómeros e intercromómeros. Una digestión selectiva con la endonucleasa Alu I (cortando selectivamente la secuencia AG CT), descubre un patrón específico y repetido de bandas que se interpretó como una clase específica de ADN repetitivo intercalado. En este mismo material una digestión con Alu I muestra un bandeo C tras cortar ADN eucromático en pequeños fragmentos, reduciendo ligeramente la densidad electrónica de los centrómeros. Cuando se digiere con Hinf I, se obtienen cromátides prácticamente borradas, pero un centrómero bien conservado y más fuertemente electrondenso. Atribuimos este diferente resultado a cambios de la conformación espacial de la cromatina, que posiblemente interferirían con su accesibilidad a la molécula enzimática (19-20), (Fig. 3).

El estudio ultraestructural de cromosomas de la línea L-929 de ratón, también nos permitió valorar la inactivación de centrómeros en un cromosoma marcador con 7 centrómeros, sólo uno de ellos activo.

Un estudio multicéntrico efectuado por J. Gosálvez, R. Mezzanotte, J. L. Fernández y nosotros (1993), explora el centrómero de ratón por métodos ultraestructurales y moleculares. Tras inhibir la condensación de la cromatina centromérica, tratamos el cromosoma con las enzimas de restricción MspI, EcoRI y HaeIII. Los cortes obtenidos fueron amplificados con exonucleasa III para obtener tramos de ADN de cadena única. Se hibridaron ahí oligonucleótidos al azar, que se usaron como "primers" para resintetizar incluyendo dUTP biotinado. Este último pudo ser detectado en su posición "in situ" con estreptavidina marcada con oro coloidal. De este modo se localiza fácilmente a nivel de fibra de cromatina los puntos de corte de la enzima. Así, se pudo cualificar una diferente sensibilidad a la digestión por las referidas enzimas. HaeIII mostró atacar más los brazos cromosómicos que el centrómero, ofreciendo un bandeo C, con respecto a MspI. En ambos casos se produce un marcado de oro al azar y particularmente homogéneo en todo el centrómero, es decir, las enzimas cortaron ADN en todo el cromosoma. Parece así, que el corte de ADN es un proceso no necesariamente relacionado con la extracción de fragmentos de cromatina. Por otra parte EcoRI no cortó el ADN centromérico al azar. Las regiones periféricas, próximas a los brazos de eucromatina, parecen contener el "major satellite DNA", atacable por la enzima, mientras que en su extremo parece alojarse una zona de fibra cromatínica conteniendo el "minor satellite DNA" no digerible por la enzima (21).

La heterocromatina del cromosoma 9 representa un hecho estructural muy significativo traducido en una constricción secundaria que permitía una identificación rápida de este cromosoma.

Actualmente se está consiguiendo un conocimiento integrado de las diferentes familias de ADN que están formando parte de la cromatina de esta región. José Luis Fernández y otros (1994), indujeron una inhibición selectiva de la con-



**Figura 3: Diferentes comportamientos de la cromatina en cromosomas de ratón atacados con Allu I (b), Hae III (c), Hpa II (d) y Hinf I (e). Cromosoma control sin digerir (a).**

densación de la heterocromatina yuxtacentromérica en cromosomas humanos tratados con 5 azacitidina. Una correlación óptico-electrónico, permitió demostrar, tras hibridación “in situ”, que el ADN alfoide se aloja en el interior de la cromatina centromérica. Siguiendo el mismo patrón experimental, observamos que el

ADN satélite III (satélite clásico), aparece en la zona yuxtacentromérica inhibida en su condensación. Las familias alfoide y beta aparecerían alojadas constituyendo el centrómero (22-23). Considerando éste y otros resultados, cabe decir que la variación polimórfica descrita para la heterocromatina del 9, sería principalmente a costa de cromatina conteniendo el ADN satélite III. Por el contrario las secuencias centroméricas parecerían soportar muy escasas variaciones de su número de repetición, sugiriendo una interrelación estrecha entre la estructura y su capacidad funcional. De hecho el ADN alfoide liga específicamente una proteína no histónica centromérica CENP-B. ¿Representaría este ADN un factor importante en la cinética y segregación centromérica?

Enlazando con el principio, cabe considerar que por ahora no existe una buena interrelación a nivel estructural global entre los datos experimentales y los modelos de estructura cromosómica. Así, con respecto al muy actual Proyecto Genoma, se está haciendo un gran esfuerzo por precisar lo más posible las localizaciones génicas. A este respecto todo el mundo conviene que el cromosoma aparece como una estructura estática, bidimensional y con bandas perpendiculares; cuando en realidad se trata de una organización fibrosa, temporalmente cambiante y tridimensional. Una localización genómica, atribuida a una banda, podría en realidad encontrarse en la parte anterior, media o posterior del cromómero, es más, tratamos de ubicar un gen que representa 5-10 nucleosomas en una estructura, el cromómero, que puede tener 5-10 megabases, alojadas en varios milímetros de fibra de cromatina.

Retomando el concepto de los modelos, es obvio que no se observa superenrollamiento en el cromosoma mitótico al microscopio electrónico, ni en cromosomas enteros ni en cortes. Con respecto a la posibilidad de un eje central, ni los cortes seriados, ni tinciones de plata parecen evidenciarlo. Además, si rompemos el ADN en interfase por radiación, el cromosoma mitótico subsiguiente mostrará pérdida de un fragmento. De haber un eje central, este fragmento no debería haberse separado del resto del cuerpo cromosómico.

De nuevo abogamos por un enfoque funcional (1) en donde se deshecha el planteamiento estructural, estático, rígido y se sustituye por el concepto de sistema, en donde se ofrece una interrelación estructura-función fluyente, cambiante en el tiempo, resultado de una interacción dinámica con el medio.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1.-GOYANES, V.J. (1985). Review article: Electron microscopy of chromosomes: towards an ultrastructural cytogenetics?. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 15, 349-367.
- 2.-GOYANES, V.J., MATSUI, S. & SANDBERG, A. (1980). The basis of chromatin fiber assembly within chromosomes studied by histone-DNA crosslinking followed by trypsin digestion. *Chromosoma* 78, 123-135.
- 3.-GOYANES, V.J. & IGLESIAS, J. (1972). Interphase chromosome contraction in bone marrow cells exposed to ionic solutions of high dissociation. XIV International Congress of Hematology, Sao Paulo, Brasil.
- 4.-GOYANES, V.J. & IGLESIAS, J. (1972). Different response from normal and leukemic myeloid cells treated by ionic solutions of high dissociation. XIV International Congress of Hematology, Sao Paulo, Brasil.
- 5.-GOYANES, V.J. & MÉNDEZ, J. (1981). Karyotyping chromosomes by electron microscopy. Condensation-inhibition of G-bands in human and chinese hamster chromosomes by a BrdU-Hoechst 33258 treatment. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 4, 45-51.
- 6.-GOYANES, V.J. & MÉNDEZ, J. (1982). Extracentromeric connections between sister chromatids demonstrated in human chromosomes induced to condense asymmetrically. *Human Genet.* 62, 324-326.
- 7.-GOYANES, V.J. & SCHVARTZMAN, J.B. (1981). Insight on diplochromosome structure and behaviour. *Chromosoma* 83, 93-102.
- 8.-GOYANES, V.J. & SCHVARTZMAN, J.B. (1983). Electron microscopy of sister chromatid exchanges. *Cytogenet. Cell Genet.* 36, 612-616.
- 9.-FERNANDEZ, J.L., COSTAS, E. & GOYANES, V.J. (1990). Chromosome structure and condensation in relation to DNA integrity. *Cytobios* 63, 193-204.
- 10.-FERNANDEZ, J.L., CAMPOS, A., CAJIGAL, D. & GOYANES, V.J. (1990). Ultrastructural analysis of radiation induced chromosome breaks and rearrangements. *Cytologia* 55, 595-600.
- 11.-MALHEIRO, I., PORTO, B. & GOYANES, V.J. (1990). Morphometric analysis of human chromosome satellites and NOR asymmetries by transmission electron microscopy. *Cytobios* 61, 31-40.
- 12.-PASANTES, J.J., PASARO, E., MÉNDEZ, J. & GOYANES, V.J. (1987). Morphological parameter variations between sister chromatids by electron microscopy. *Cytobios* 49, 99-102.
- 13.-PASARO, E., MÉNDEZ, J., PASANTES, J.J. & GOYANES, V.J. (1992). Influence of chromosome condensation and preparative chromosome methods on chromatid volume. *Cytobios* 70, 171-177.

- 14.-FREIRE, M.A., GOYANES, V. & SÁNCHEZ, L. (1992). Analysis of human Y heterochromatin using 5-Azacytidine and Distamycin A by transmission electron microscopy. *Chromatin 1*, 111-116.
- 15.-GOYANES, V.J. (1980). Sequential staining of euchromatic and heterochromatic regions of the human Y chromosome. *Journal of Medical Genetics 17*, 468-471.
- 16.-TYLER-SMITH, C. & WILLARD, H.F. (1993). Mammalian chromosome structure. *Current Opinion in Genetics and Development 3*, 390-397.
- 17.-SÁNCHEZ, L. & GOYANES, V.J. (1989). High resolution techniques for study of human centromeric heterochromatin. *Stain Technology 64*: 4, 169-174.
- 18.-SÁNCHEZ, L., MARTÍNEZ, P. & GOYANES, V.J. (1991). Analysis of centromere size in human chromosomes 1, 9, 15 and 16 by electron microscopy. *Genome 34*: 5, 710-713.
- 19.-GOSALVEZ, J. & GOYANES, V.J. (1988). Selective digestion of mouse chromosomes with restriction endonucleases. I. Scaffold-like structures and bands by electron microscopy. *Cytogenet. Cell Genet. 48*, 198-200.
- 20.-GOSALVEZ, J., SUMMER, A.T., LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C. ROSSINO, R., GOYANES, V.J. & MEZZANOTTE, R. (1990). Electron microscopy and biochemical analysis of mouse metaphase chromosomes after digestion with restriction endonucleases. *Chromosoma (Berl)* 99, 36-43.
- 21.-GOSALVEZ, J., LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C., De La VEGA, C.G., MEZZANOTTE, R., FERNÁNDEZ, J.L. & GOYANES, V.J. (1993). Selective digestion of mouse chromosomes with restriction endonucleases. Oligonucleotide priming of single-stranded DNA produced with exonuclease III. *Genome 36*, 230-234.
- 22.-FERNÁNDEZ, J.L., GOYANES, V.J., LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C. & GOSALVEZ, J. (1994). Human a-satellite DNAs are not susceptible to undercondensation after 5-Azacytidine treatment. *Cytogenet. Cell Genet. 65*, 92-94.
- 23.-FERNÁNDEZ, J.L., GOYANES, V.J., PEREIRA, S., LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C. & GOSALVEZ, J. (1994). 5-Azacytidine produces differential undercondensation of alpha, beta and classical human satellite DNAs. *Chromosome Research 2*, 3-8.