

# ESTRUCTURAS MOLECULARES A NIVEL CROMOSOMICO

Goyanes Villaescusa, V(\*). Pásaro Méndez, E.  
Sección de Genética. Hospital "Teresa Herrera". La Coruña  
Departamento de Psicología. Area Psicobiología.  
Universidad de La Coruña.

Clásicamente se ha venido estudiando el material genético mediante técnicas morfológicas que parten preferentemente de principios de siglo, constituyendo la citogenética vegetal y animal. En los últimos 30 años este campo sufrió un desarrollo notable con la aplicación de técnicas de cultivos celulares al estudio de los cromosomas humanos y su aplicación a la patología humana de tipo genético. Actualmente se inicia de nuevo un despegue con la asimilación de técnicas derivadas de la genética molecular. Por hibridación "in situ" y otras técnicas, empezamos a estar en disponibilidad de localizar genes de secuencia múltiple, identificar la posición de pequeños fragmentos cromosómicos translocados de su locus de origen a posiciones aberrantes, etc.

Un segundo punto de vista para abordar nuestro tema lo aporta lo "puramente molecular", entendiendo por tal todo el ámbito de la genética molecular, ingeniería genética y en general la actualmente denominada biotecnología. Este campo, preferentemente constituido por técnicas asimiladas de la bioquímica y de la biología celular, viene cobrando una entidad creciente desde los años 60-70. Su planteamiento, que va "in crescendo" constituye sin duda una tecnología aplicable a múltiples campos, mediante la cual se aísla, se mide, se corta, se incorpora, se modifica el ADN y se le hace funcionar "in vitro" o "in vivo" en diversas condiciones. Las aplicaciones que de estas técnicas utiliza la industria farmacológica, fundamentalmente con bacterias, no ha hecho más que empezar, pero lógicamente parece difícil ponerle un fin determinado.

Desde hace más de 18 años optamos en nuestro laboratorio del Hospital "Teresa Herrera" de La Coruña, en colaboración con otros laboratorios de la actual Universidad de La Coruña, procedente de la Universidad de Santiago y de otros Centros de Investigación de España, por cubrir ese espacio de nadie que quedaba entre la citogenética microscópica, en donde el material genético aparece como la eucromatina y heterocromatina del núcleo interfásico, o los cromosomas aparentemente macizos de la mitosis; y el reino de lo molecular. Tenemos conocimiento relativamente exacto del empaquetamiento del ADN por proteínas constituyendo la fibra de cromatina. Pero ¿cómo se organiza dicha fibra en interfase y en mitosis?. Teniendo

en cuenta que el nivel de empaquetamiento de la información genética en un cromosoma metafásico puede alcanzar factores desde hasta 10.000 veces por unidad de longitud, cabe suponer existen mecanismos complejos que modulan la compactación y descompactación de los aproximadamente 2 metros de ADN albergado en cada núcleo de nuestras células. Dichos sistemas además deben regular la interacción de este material con diferentes moléculas a lo largo de la vida celular, permitiendo la expresión precisa y cuantificada de tramos de dicha información, que bajo la denominación de cistrones y genes, dirigen el desarrollo embrionario y la fisiología de los órganos a lo largo de las diferentes etapas de la vida de un individuo.

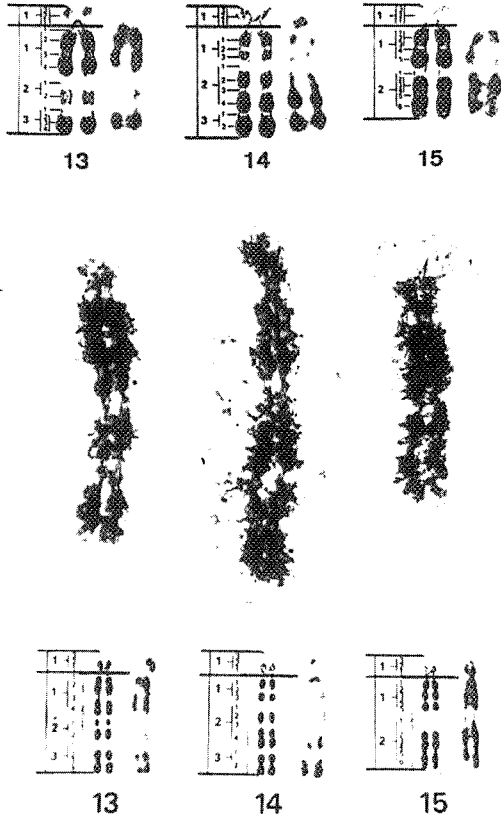


Foto 1.- Cromosomas humanos 13, 14 y 15, teñidos con bandas R y vistos al M.E

Se da aquí un doble juego en donde la organización estructural del ADN condiciona su función y viceversa. Un tramo de ADN, para expresarse o replicarse, deberá cambiar su relación con las proteínas histónicas y no histónicas. Así, cada cromosoma puede ser considerado como una entidad funcional y estructuralmente cambiante en el tiempo. En una revisión que realizamos hace ya 8 años (1), propu-

simos una definición de cromosoma en este sentido, según la cual se trataría de la “representación siempre cambiante, perfectamente programada en el espacio y en el tiempo, del material genético empaquetado en una forma tal que se asegure y facilite la segregación divisional del mismo”.

De cualquier forma que se entienda, el cromosoma mitótico constituye la representación de un tramo de cromatina que se pliega múltiples veces en el espacio. Al igual que para el ADN, aquí la función condiciona a la estructura y a la inversa. Estos criterios, universalmente aceptados, dieron pie a toda una serie de explicaciones sobre como dicha fibra de 20-30 nm de diámetro, organiza su plegamiento. Estos modelos de estructura cromosómica, algunos ya propuestos a mediados de este siglo, empezaron a proliferar a partir de la presunta organización en “fibra plegada” propuesta por Du Praw en 1970 (2). Que el tema no está cerrado, lo afirma el hecho de que tan recientemente como en 1990 se sigan ofreciendo explicaciones divergentes. J Filipski y cols. (3) nos proponen 5 niveles de enrollamiento: desde los nucleosomas a la cromatina, siguiendo por el enrollamiento múltiple de ésta hasta las estructuras de 300 nm de diámetro que constituyen la cromátide cromosómica. Según estos autores la cromatina se organizará en bucles sucesivos, cada uno constituido por un fragmento de ADN de 50 kb de longitud (3<sup>er</sup> nivel). El cuarto nivel sería la contracción de 6 de estos bucles formando una estructura en roseta, retorcida. Treinta rosetas organizadas en espiral constituirían un rodillo. Una sucesión de rodillos (5<sup>o</sup> nivel), que ya son visibles al microscopio electrónico, formarían la cromátide.

Por su parte Laemmli (4) sigue insistiendo en que la arquitectura cromosómica se sustenta en una estructura central que recorre longitudinalmente el eje de cada cromátide. Los bucles de cromatina cuelgan perpendicularmente a dicho eje. Este andamio central puede estar enrollado formando una hélice longitudinal demostrable mediante inmunofluorescencia con anticuerpos específicos para la topoisomerasa II. El número de giros es proporcional a la longitud cromosómica y su dirección inversa para cada una de las cromátides hermanas (4).

Curiosamente en estos modelos se omite toda la característica distribución de estructuras regionales, habitual ya de la citogenética rutinaria en nuestros laboratorios. En los últimos 20 años, se han venido aplicando técnicas que permiten identificar regiones del cromosoma independizables de las vecinas por su característica composición diferencial del ADN que las compone (secuencias muy repetidas, en heterocromatina), contenidos no histónicos determinados, organización espacial propia, secuencias nucleotídicas específicas (telómeros, centrómeros), etc. Asimismo aparecen en el cromosoma mitótico zonas de organización espacial muy definida, como los satélites y sus tramos de conexión a los brazos cortos de los autosomas acrocéntricos humanos, y puntos de reciente transcripción como los genes organizadores nucleolares.

Los dos modelos arriba descritos, ejemplifican las dos corrientes de opinión más difundidas para explicar como la información genética acaba configurándose

en un cromosoma mitótico. Asimismo en algunos casos se trata de explicar la configuración de las regiones, de particularidades bioquímicas y funcionales específicas de las que hablamos en el párrafo anterior. Según algunos modelos de supraorganización de la fibra de cromatina, como el de Yunis y Bahr (1979) dicha fibra seguiría patrones alternantes de bucles y segmentos de fibra extendida (5). De la misma manera, Okada y Comings (1979) sugieren que los bucles de ADN giran formando rosetas intercalados con tramos lisos, sucesivamente jerarquizándose a niveles intermediarios de compactación (6). Se trata aquí de una organización en anillos helicoidales sucesivos. Bak y cols. (1977) suponen que cada cromátide viene constituida por el plegamiento helicoidal de una fibra unidad de 400 nm, consecuencia de un nivel inferior de espiralización de la fibra de 20-30 nm (7).

Por otra parte existe una corriente de opinión cuyo último ejemplo sería el de Laemmli (4) y cuyos inicios parten de Stubblefield y Wray (1971) que propusieron la existencia de un eje longitudinal para cada cromátide, del que partirían las fibras de cromatina (8). Dichos autores explican dicho eje como el resultado de una trenza de dos fibras protéicas. Los modelos de eje central cobran entidad con la propuesta por Paulson y Laemmly (1977) de un andamio central (9). Dicha opinión es el resultado de imágenes al microscopio electrónico de cromosomas en los que se indujo una extracción selectiva de histonas mediante tratamientos con polianiones o NaCl 2M. De este resto estructural partían fibras de cromatina en sentido perpendicular al eje de la cromátide (9). Mirkovitch y cols., en (1988) proponen secuencias SAR de ADN ricas en pares adenina-timina, filogenéticamente conservadas y constituyendo la raíz del bucle en su conexión con el eje proteico (10). Parece que la topoisomerasa II interactuaría en la supuesta raíz de dichos bucles. Por último Rattner y Lin, en (1985) sugieren que la organización seguiría un patrón mixto a ambos tipos de modelos (11).

En cualquier caso, diversos sistemas de desnaturalización más o menos cuidadosa del cromosoma, seguidos de tinciones específicas con sales de plata, sugieren que los elementos residuales parecen constituir una organización similar al eje de la cromátide. Pero por otra parte los estudios sistemáticos realizados mediante técnicas muy conservadoras como la fijación, inclusión y cortes ultrafinos y estudios al microscopio electrónico de dichos cortes con técnicas de reconstrucción tridimensional, en ningún caso demuestran que exista un eje protéico, como es el caso de los complejos en los cromosomas meióticos.

Me gustaría ahora discutir diversos hallazgos propios y de otros equipos empleando microscopía electrónica de cromosomas enteros, en un intento de explicar la estructura cromatínica de las distintas regiones del cromosoma. Partiendo de que el cromosoma mitótico es el resultado del plegamiento en el espacio de la fibra de cromatina, y de que zonas de esa larga fibra presentan especificidades bioquímicas y ultraestructurales, la cromátide de cada cromosoma profásico muestra una organización consecutiva en cromómeros e intercromómeros (12). En el cromómero la fibra de cromatina se enrolla en estructuras irregularmente esféricas

y al salir de las mismas realiza recorridos longitudinales alcanzando al siguiente cromómero. Cada cromómero viene correspondiendo a una banda G de la microscopía de la luz, siendo las regiones intercromoméricas el equivalente a las bandas R. La progresiva condensación del cromosoma durante la mitosis, es el resultado de la coalescencia de los cromómeros, según un fenómeno que denominaríamos reclutamiento de la cromatina intercromomérica. El resultado es un ensanchamiento y acortamiento de todo el cromosoma. A la distribución macromolecular descrita corresponderían familias de genes de diferentes niveles de repetición, y con desiguales contenidos en pares de bases adenina-timina. Actualmente las técnicas de hibridación "in situ" acopladas a microscopía óptica permiten reconocer algunas de estas secuencias génicas como los protooncogenes. Estos genes, comprometidos en la regulación de la diferenciación y proliferación celulares, han cobrado particular interés por su implicación en la carcinogénesis. Modificaciones en las secuencias de bases, pérdidas de bases, relocalización en otras posiciones cromosómicas,... etc., son mecanismos que los transforman, impidiendo o modificando su expresión, y dando por resultado desregulaciones de su capacidad moduladora del ciclo celular. La aplicabilidad diagnóstica de los métodos de hibridación "in situ" en un futuro no lejano, los hace particularmente atractivos en el campo de la epidemiología y localización de familias de alto riesgo genético. Así, la localización precisa de los loci génicos mutados, nos facilita una mejor comprensión de los mecanismos de la cancerización celular en procesos como la leucemia mieloide crónica, entendiendo en parte la interrelación neoplasia-translocación 22-9 y el cromosoma Philadelphia. Pronto estará a punto un sistema de marcado de oncogenes en esta entidad, trabajando sobre núcleos interfásicos (13).

La microscopía electrónica sugiere que las roturas cromosómicas y los reordenamientos (como en la leucemia mieloide crónica), se producen preferentemente en las zonas limítrofes cromómero-intercromómero. Coincidentemente algunos de estos puntos "calientes" de localización oncogénica, coinciden espacialmente con "puntos frágiles", el más conocido de los cuales es la localización frágil del cromosoma X humano. Esta alteración estructural del brazo largo del cromosoma X, aparece como la organización cromatínica esférica de los satélites. En el punto de fragilidad se reconoce una región inestable del ADN (14) rica en secuencias trinucleotídicas repetidas  $p(\text{CCG})_n$  (15); parece producirse aquí una metilación anormal de la citosina (16).

Los extremos cromosómicos, denominados telómeros, presentan una organización cromatínica en semicasquete esférico. La preservación de esta zona redondeada parece crucial para conservar la individualidad cromosómica. Se han podido reconocer secuencias específicas de ADN según el orden AGGGTT, repetidas miles de veces y comunes para el hombre y otros vertebrados (17). Se ha especulado que el acortamiento del telómero cromosómico durante el envejecimiento celular, podría generar tumores (18). Algunos de estos problemas podrían solucionarse por intervención de determinadas telomerasas (19).

Otra región cuya estructura resulta particularmente intrigante, es el centrómero. Aquí ambas cromátides aparecen físicamente conectadas por un mecanismo aún no esclarecido. La microscopía electrónica permite identificar claramente los dos subcentrómicos del cromosoma, cada uno correspondiente a una cromátide del mismo. A este nivel, en especímenes bien preservados, la cromatina aparece fuertemente empaquetada, mostrando una superficie cóncava y lisa que contrasta con la del resto de la cromátide. También aquí se han localizado secuencias específicas de ADN. Paralelamente y a ambos lados de los subcentrómicos, encontramos los cinetocoros; elementos polimerizantes de los túbulos del huso mitótico y fundamentales en la cinética de la segregación anafásica de los cromosomas. Parece que es un lugar en donde se genera parte de la actividad motil de dicha segregación. Estas regiones pueden ser claramente identificables mediante reacción con anticuerpos específicos, obtenibles de pacientes con el Síndrome de Crest. Esta estrategia es particularmente útil si tratamos de discriminar microcromosomas y fragmentos acéntricos (20).

Durante años hemos venido utilizando una serie de trampas moleculares, basándonos en la estrategia siguiente: Si el cromosoma es una larga fibra de cromatina plegada en el espacio y tramos de esta fibra presentan diferencias de composición y funcionamiento, podremos inducir modificaciones de algunos tramos específicos alterando su composición molecular. Una vez inducida la modificación esperamos saber en la mitosis si la misma repercute en la organización espacial del cromosoma en alguna de sus regiones. Siguiendo esta táctica, Sánchez (21) individualizó estructuralmente el centrómero humano de los cromosomas 1, 9 y 16, comprobando que presentaban diferentes áreas y obteniendo una correlación positiva entre los tamaños del centrómero y del cromosoma. En este mismo material se pudo estudiar en detalle la organización submicroscópica de la heterocromatina, demostrando que en humanos, dicho material es yuxtacentromérico. Pásaro (22), en 1986 y Pasantes, J., Pásaro, E., Méndez, J., y Goyanes, V. (23), en 1987 calcularon el volumen de los cromosomas humanos enteros 1 y 2, en relación a su estado de condensación, comprobando que a medida que el proceso de condensación aumentaba durante el ciclo mitótico el volumen también lo hacía en todos los cromosomas (Tabla I). Cortes transversales de dichos cromosomas mostraron uniformidad en cuanto al empaquetamiento de la cromatina. Los cromosomas enteros presentan diferentes grados de condensación; en estado de baja condensación, los cromómeros se muestran como acúmulos locales de bucles de fibras y la presencia de fibras longitudinales a través de la cromátide. Se observan las dos cromátides, así como la región centromérica, claramente diferenciadas, correspondiendo las zonas más electrodensas a cromómeros que ocupan una posición de bandas G positivas; las zonas menos densas o intercromómeros, discurren longitudinalmente y son fácilmente identificables. En estado de condensación media las zonas intercromoméricas son casi inapreciables, con una intensa conexión entre las cromátides. En estado de condensación alta las cromátides se diferencian claramente sin apreciarse las zonas intercromoméricas y haciéndose más patente la separación entre las mismas. El diámetro de la fibra no varía a lo largo del proceso, manteniéndose entre 22-27 nm.

**TABLA I**  
**VOLUMENES(\*) DE TODAS LAS CROMATIDES DE LOS CROMOSOMAS HUMANOS**

CROMATIDE	COND. BAJA.	COND. MEDIA	COND. ALTA
1	0.3412	0.4123	0.5874
2	0.3042	0.3761	0.5427
3	0.2527	0.3173	0.4550
4	0.2255	0.2759	0.3951
5	0.2255	0.2759	0.3951
6	0.2148	0.2628	0.3764
7	0.1942	0.2376	0.3403
8	0.1824	0.2232	0.3197
9	0.1776	0.2174	0.3113
10	0.1721	0.2106	0.3016
11	0.1703	0.2084	0.2984
12	0.1640	0.2007	0.2874
13	0.1339	0.1638	0.2346
14	0.1305	0.1597	0.2288
15	0.1236	0.1512	0.2165
16	0.1188	0.1453	0.2082
17	0.1158	0.1417	0.2030
18	0.1015	0.1242	0.1779
19	0.0927	0.1132	0.1624
20	0.0857	0.1048	0.1501
21	0.0673	0.0823	0.1179
22	0.0618	0.0756	0.1082
X	0.2133	0.2610	0.3738
Y	0.0721	0.0882	0.1263

\* Las unidades expresan el volumen en nm<sup>3</sup>

Partiendo de la gran riqueza en secuencias con pares de bases A-T en el centrómero del cromosoma de ratón, procedimos a modificar su organización macromolecular, introduciendo Bisbencimida H33258. Este tratamiento de las células "in vivo", generó en la mitosis un cromosoma con dos niveles de condensación. La heterocromatina centromérica prácticamente sin condensarse y el resto del cromosoma en metafase. El resultado del análisis ultraestructural fue la identificación de una secuencia de cromómeros de pequeño tamaño constituidos por bucles de cromatina que constituirían el centrómero murino interfásico (24). Se comprobó asimismo como se reflejaba la fusión Robertsoniana o fusión céntrica, un mecanismo muy utilizado para la evolución cromosómica de las especies biológicas (25). Asimismo, un tratamiento con diversas enzimas de restricción ataca selectivamente diferentes áreas del cromosoma. Alu I digiere preferentemente la eucromatina, respetando el centrómero. Una exposición a Hae III indujo bandas C y G, cortando el DNA en fragmentos largos superiores a los de Alu I. La diferente conformación ultraestructural de la cromatina podría ser la responsable de estos diferentes com-

portamientos al ataque enzimático (25). También se pudo comprobar una cierta organización hacia el centro de la cromátide con imágenes similares a las del eje central de Laemmli (26).

La introducción de 5-BrdU durante la segunda fase de la síntesis de DNA, seguido de un tratamiento con Bisbencimida H33258, genera una anomalía en la que el cromosoma invierte su patrón fisiológico de condensación de la cromatina en la mitosis. Se obtiene así una organización cromomérica inversa a la descrita por Bahr y cols (12). Una modificación de este proceder, permitió a J. Méndez (27) inducir cromosomas asimétricos, en donde una cromátide permanecía más larga que la otra. Este fenómeno, debido a una diferencia en la velocidad de condensación de cada cromátide, demostró la estabilidad y cinética de fibras de conexión extracentroméricas que partiendo de los cromómeros simétricos de ambas cromátides, mantenían estabilizado el paralelismo de los brazos cromosómicos (27).

Por último, también intentamos averiguar si la integridad estructural de la molécula de DNA era un pre-requisito para la estructura del cromosoma mitótico (28). Fernández y cols. comprobaron que una rotura de cadena simple del DNA produce una clara dispersión del material cromatínico, permaneciendo preferentemente fibras de cromatina de trayecto longitudinal. El grado de alteración de la estructura se mostró directamente proporcional a los niveles de ataque de la molécula, alcanzándose incluso la pulverización cromosómica.



Foto 2.- Cromosoma de ratón al M.E., previa digestión con endonucleasas de restricción.



Cuando el cromosoma fue atacado después de alcanzar sus niveles máximos de condensación, el efecto de la rotura del DNA mostró ser de mucha menor importancia, sugiriendo que la integridad molecular del DNA puede ser un factor importante para una buena organización espacial durante los procesos de condensación de la cromatina (28).

Volviendo al principio y recordando la definición de cromosoma mitótico como un mecanismo de empaquetamiento del material genético programado en el espacio y en el tiempo, debemos considerar que en ningún caso estas estructuras existen independientes del medio que les es propio. Así, las condiciones físico-químicas del medio intracelular, condicionan la estructura macromolecular de la fibra, y cuando extraemos al cromosoma de su medio natural inducimos probablemente algunas modificaciones. Esta es, pues, una crítica global al método científico empleado, considerando que debemos ser sumamente prudentes a la hora de extrapolar datos y obtener conclusiones globales.

## BIBLIOGRAFIA

- 1). Goyanes, V. (1985). Electron Microscopy of Chromosomes: Toward an ultrastructural cytogenetics?. *Cancer Genetics and Cytogenetics* **15**:349-367.
- 2). Du Praw E.J. (1970). *DNA and Chromosomes*. Holt, Rinehart and Winston, New York.
- 3). Filipski J, Leblanc J., Youdale T, Sikorska M, Walker P.R. (1990). Periodicity of DNA folding in higher order chromatin structures. *E.M.B.O. J.* **9**:1319-1327.
- 4). Boy de la Tour E. and Laemmli U.K. (1988). The metaphase scaffold is helically folded: Sister Chromatids have predominantly opposite helical handedness. *Cell.* **55**:937-944.
- 5). Yunis J.J., Bahr G.F. (1979). Chromatin fiber organization of human interphase and prophase chromosomes. *Exp. Cell. Res.* **122**:63-72.
- 6). Okada T.A., Comings D.E. (1979). Higher order structure of chromosomes. *Chromosoma.* **72**:1-14.
- 7). Bak A.L., Zeuthen J., Crick F. (1977). Higher-order structure of human mitotic chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:1595-1599.
- 8). Stubblefield E., Wray W. (1971). Architecture of the chinese hamster metaphase chromosome. *Chromosoma.* **32**:262-294.
- 9). Paulson J.R., Laemmli U.K. (1977). The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell.* **12**:817-828.
- 10). Mirkovitch J, Gasser S.M., Laemmli U.K. (1988). Scaffold attachment of DNA loops in metaphase chromosomes. *J. Mol. Biol.* **200**:101-109.
- 11). Rattner J.B., Lin C.C. (1985). Radial loops and helical coils coexist in metaphase chromosomes. *Cell.* **42**:291-296.
- 12). Bahr G.F., Mikel V., Engler W.F. (1973). Correlates of chromosomal banding at the level of ultrastructure. *Chromosome identification*. Caspersson T, Zech L (eds) Novel Symposia. Academic Press, New York, **23**:280-284.
- 13). Arnoldus E.P., Wiegant J., Noordermeer I.A., Wessels J.W., Beverstock G.C., Grosveld G.C., Ploeg M. and Raap A.K. (1990). Detection of the Philadelphia chromosome in interphase nuclei. *Cytogenet Cell Genet.* **54**:108-111.
- 14). Yu, S., Pritchard M., Kremer E., Lynch M., Nancarrow J., Baker E., Holman K., Mulley J.C., Warren S.T., Schlessinger D., Sutherland G.R. and Richards R.I. (1991). Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science.* **252**:1179-1181.

15). Kremer E.J., Pritchard M., Lynch M., Yu S., Holman K., Baker E., Warren S.T., Schlessinger D., Sutherland G.R. and Richards R.I. (1991). Mapping of DNA instability at the fragile-X to a trinucleotide repeat sequence p (CCG)n. *Science*. **252**:1711-1714.

16). Oberlé I., Rousseau F., Heitz D., Kretz C., Devys D., Hanauer A., Boué J., Bertheas M.F. and Mandel J.L. (1991). Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X-Syndrome. *Science*. **252**:1097-1102.

17). Blackburn E.H. (1991). Structure and function of telomeres. *Nature*. **350**:569-573.

18). Jankovic G.M., Colovic M.D. and Petrovic M.D. (1991). Telomere loss and cancer. *Nature*. **350**:197.

19). Harrington L.A. and Greider C.W. (1991). Telomerase primer specificity and chromosome healing. *Nature*. **353**:451-456.

20). Weissenborn, U. and Streffer, C. (1991). Micronuclei with kinetochores in human melanoma cells and rectal carcinomas. *Int. J. Radiat. Biol.* **59**:373-383.

21). Sánchez, L., Martínez, P., Goyanes, V. (1991). Analysis of centromere size in human chromosomes 1, 9, 15 and 16 by electron microscopy. *Genome*. **34**:710-713.

22) Pásaro, E. (1986). El volumen de los cromosomas humanos. Su determinación mediante el microscopio electrónico. Serie: monografías. *Servicio de Publicaciones de la Universidad de Santiago*. ISBN: **84-398-7079-5**. pp:1-32.

23). Pasantes, J., Pásaro, E., Méndez, J. and Goyanes, V. (1987). Morphological parameter variations between sister chromatids by electron microscopy. *Cytobios*. **49**:99-102.

24). Torre, J., Goyanes, V. and Gosálvez, J. (1990). Discontinuous undercondensation of centromeric heterochromatin in mouse chromosomes: Evidence in Hoechst 33258-treated cells. *Cytogenet. Cell. Genet.* **54**:55-57.

25). Gosálvez, J., Summer, A.T., López-Fernández, C., Rossino, R., Goyanes, V. and Mezzanotte, R. (1990). Electron microscopy and biochemical analysis of mouse metaphase chromosomes after digestion with restriction endonucleases. *Chromosoma (Berl)* **99**:36-43.

26). García de la Vega, C., López-Fernández, C., Esponda, P., Campos, A., Goyanes, V. and Gosálvez, J. (1990). Scaffold-like structures in mouse chromosomes revealed by restriction endonuclease digestion and electron microscopy. *Biol. Cell*. **68**:101-104.

27). Goyanes, V., and Méndez, J. (1982). Extracentromeric connections between sister chromatids demonstrated in human chromosomes induced to condense asymmetrically. *Human. Genet.* **62**:324-326.

28). Fernández, J.L., Costas, E. and Goyanes, V. (1990). Chromosome structure and condensation in relation to DNA integrity. *Cytobios*. **63**:193-204.