

Instituto Español de Fisiología y Bioquímica  
Sección de Fisiología y Bioquímica de Valladolid  
(Prof. Dr. E. Romo Aldama)

## Significado funcional de las diferencias de tamaño entre cromosomas homólogos

por

E. Romo, A. Guerra y B. Herreros \*

(Recibido para publicar el 14 de octubre de 1966)

Hoy día se admite generalmente la idea de que entre las múltiples posibilidades de control y modulación de la actividad celular, una de las más importantes radica en los mecanismos de control y modulación de la actividad de los propios genes. El problema que realmente se plantea es el de aclarar cuál sea la naturaleza íntima de tales mecanismos, especialmente en las células más avanzadas de las plantas y animales superiores.

Por lo que a estos organismos se refiere, la hipótesis de JACOB y MONOD (22) por ahora no es más que una fascinante posibilidad. Pero aún admitiendo la existencia de idénticos sistemas de regulación de los genes a un nivel molecular en todos los seres vivos, hay indicios de que en los complejos cromosomas de animales y plantas operan mecanismos adicionales para la modulación del genoma, que no parecen existir en las bacterias y virus. A este respecto, dos hechos probablemente relacionados han sido establecidos con relativa certeza.

En primer lugar, que las histonas y otros tipos de proteínas nucleares pueden ejercer una acción represora del DNA (1, 4, 21), y en segundo lugar que la conformación estérica de los cromosomas tiene también implicaciones funcionales, el estado condensado de la cromatina significando inactividad de los genes, y el estado desespiralizado o distendido actividad de los mismos (7, 10, 11, 19). La posible relación entre ambos hechos estriba en que las variaciones de la conformación estérica de los cromosomas deben estar condicionadas por modificaciones en el contenido, la disposición o la naturaleza de las proteínas asociadas al DNA.

En las hembras de los mamíferos, incluida la especie humana, uno de los dos cromosomas X de cada célula se encuentra en estado muy condensado en el núcleo en interfase (28, 29, 30), constituyendo la llamada «cromatina sexual» o cuerpo de BARR (2). Se ha demostra-

\* Becario de Protección Escolar.

do que los genes transportados en este cromosoma no se expresan en el fenotipo de la célula, es decir, son inactivos (3, 6, 14, 24, 33), y puesto que la inactivación de uno u otro de los dos X parece realizarse al azar en las distintas células, el fenotipo de las hembras heterocigóticas es en realidad un mosaico para los caracteres ligados al sexo (3, 6, 24, 33). Por otra parte, el X heterocromático reduplica su DNA en las fases finales del período S (26, 36), lo cual es considerado como otra característica funcional del estado condensado de la cromatina (37).

Cuando un segmento de autosoma es translocado a un X heterocromático, adquiere las mismas características que éste en cuanto a condensación e inactividad genética (34). Esto indica que este tipo de inactivación de los genes no es privativo de la cromatina sexual, y por añadidura que el mecanismo de regulación implicado actúa en función del cromosoma más que en función de las características específicas de los genes. Pero suponiendo que en el curso de la evolución grupos de genes relacionados han llegado a estar distribuidos en un mismo cromosoma o en segmentos específicos de éste, la actuación también para los autosomas de un mecanismo de regulación de tal naturaleza podría ser ventajoso en células que, por causa del proceso de diferenciación, deben mantener inactivas extensas zonas de su genoma.

Efectivamente, en los núcleos en interfase se observan otras muchas masas de cromatina condensada distintas de la cromatina sexual, las cuales, obviamente, deben corresponder a segmentos de autosomas. Su inactividad genética ha sido inferida de su pobre actividad en cuanto a la síntesis de RNA (10), e igualmente se ha visto que la reduplicación tardía del DNA tampoco es privativa del X heterocromático, sino que aparece también en múltiples segmentos de los demás cromosomas no sexuales (véanse (25) y (35) con respecto a los cromosomas humanos). Por consiguiente, es muy probable que la condensación e inactivación de uno de los cromosomas X no sea sino el ejemplo más llamativo de un fenómeno general que afecta también a los autosomas (14, 37).

Durante la mitosis, todos los cromosomas de una célula experimentan un proceso de condensación que alcanza su

grado máximo en la anafase, para progresar en sentido inverso («despirilización») desde la telofase hasta el nuevo período de interfase. En cada estadio, la longitud de un determinado cromosoma está en relación inversa con el grado general de condensación. Los dos cromosomas homólogos de cada par, portadores teóricamente de un mismo número de genes, deberían tener idéntica longitud en cualquiera de los estadios del ciclo. Sin embargo, con los métodos citogenéticos usuales, pueden observarse diferencias de tamaño entre homólogos en profase y metafase. Se ha sugerido (17) que tales diferencias podrían tener un significado funcional en relación con la diferenciación celular, siendo debidas a una asincronía en el ciclo de condensación de segmentos equivalentes de ambos homólogos, reflejo a su vez de la existencia de un distinto grado de condensación, y por consiguiente de actividad, entre tales segmentos en el núcleo en interfase.

En consecuencia con tal hipótesis, las diferencias de tamaño entre homólogos deberían variar de unas células a otras en relación con el distinto estado funcional del genoma en las mismas. Nosotros presentamos aquí los resultados de un estudio comparativo, a este respecto, entre cultivos de linfocitos humanos estimulados específicamente (con Tuberculina) e inespecíficamente (con Fito-hemaglutinina), así como en cultivos de células tetraploides. Al mismo tiempo se ha estudiado la frecuencia y distribución de constricciones secundarias en los mismos cromosomas, una característica morfológica en la que suelen diferir también los homólogos.

### Material y métodos

Los cultivos de linfocitos fueron preparados con sangre de donadores varones normales, Mantoux positivos, en las

siguientes condiciones: los linfocitos fueron separados por sedimentación de la sangre heparinizada a la temperatura de la habitación. Porciones de 2 ml de plasma sobrenadante se mezclaron en frascos de 30 ml con 1 ml de plasma autólogo sin células y 6 ml de medio TC-199. A unos frascos se añadió 0,2 miligramos de una dilución 1:30 a 1:50 de Tuberculina AT Concentrada Iby, y a otros 0,2 ml de Phytohaemagglutinin Wellcome, incubándoles después durante 6 y 3 días, respectivamente. En las dos últimas horas de incubación se añadió a ambos 1 gamma por ml de Colcemid (Ciba), para acumular células en metafase. El choque hipotónico se realizó con medio TC-199 y agua destilada (1:3), la fijación con ácido acético-etanol (1:3), y las extensiones, secadas al aire, fueron teñidas con Giemsa. Para obtener cultivos de células tetraploides se utilizó una modificación de esta técnica, que ha sido descrita en otro lugar (15).

La medición de los homólogos en las células en metafase se realizó directamente al microscopio, colocando cada cromosoma en el centro del campo óptico y usando un ocular micrométrico con el que se podían apreciar variaciones de 0,25 micras, aproximadamente. Se procuró que este valor fuera siempre inferior al 5 % de la longitud del cromosoma medido. Las metafases con cromosomas muy contraídos o con marcada incurvación de los mismos fueron desechadas.

En cada célula solamente se midieron los tres primeros pares de homólogos, los cuales, aparte de ser los más largos, son los únicos que, junto con el par 16, pueden ser identificados con certeza por sus caracteres morfológicos. Para poder comparar células con distinto grado de contracción, las diferencias de tamaño dentro de cada par se expresaron en forma de tantos por ciento de la

media aritmética de la longitud de los dos homólogos.

Se han medido 133 células procedentes de 5 cultivos estimulados con Tuberculina y otras 133 de los 5 correspondientes estimulados con Fitoheماغلuti-nina, todas ellas seleccionadas al azar entre las que eran técnicamente mejores, pero escogiendo igual número de las mismas en cada uno de los dos cultivos realizados con la misma muestra de sangre. Además se han estudiado otras 62 células procedentes de cultivos estimulados con Fitoheماغلuti-nina que, habiendo sido realizados en nuestro laboratorio en época anterior, sirven como control, y 14 células tetraploides.

## Resultados

Hemos observado que la mayor parte de las células presentan diferencias de tamaño en uno, dos o los tres pares de homólogos medidos, y que estas diferencias cubren un amplio margen de variación, pues van desde menos del 5 % de la longitud media del par en unos casos, hasta más del 20 % en otros. Esta variabilidad en la magnitud de las diferencias, con una gradación continua entre los dos extremos, constituye un problema a la hora de clasificarlas. Para salvar esta dificultad, no disponiendo *a priori* de ningún criterio para poder decir cuándo una determinada diferencia puede tener o no significado, hemos clasificado los datos dos veces: una, considerando significativas las diferencias del 5 % o mayores, es decir, considerando «iguales» aquellos homólogos que difieren en menos del 5 % de la longitud media del par, y otra, considerando significativas solamente las diferencias del 10 % o las superiores a esta cifra.

Con estos dos criterios, en la tabla I se indican las frecuencias con que aparecen diferencias de tamaño en cada uno

TABLA I

Frecuencias de las diferencias de tamaño en las tres primeras parejas de homólogos de 133 células estimuladas con Tuberculina (T), y de otras 133 con Fitohemaglutinina (F).

Límite de significación *	5 %		10 %	
	T	F	T	F
1. <sup>a</sup> Pareja	63 (47 %)	87 (65 %)	29 (21 %)	45 (33 %)
2. <sup>a</sup> Pareja	54 (40 %)	77 (57 %)	17 (12 %)	37 (27 %)
3. <sup>a</sup> Pareja	61 (45 %)	107 (80 %)	21 (15 %)	40 (30 %)

\* Explicación en el texto.

de los tres pares de homólogos de 133 células estimulantes con Tuberculina y de otras tantas estimuladas con Fitohe-maglutina. En ella se observa que dichas frecuencias no son iguales en los dos tipos de cultivos, sino que son notablemente más bajas en los estimulados con Tuberculina, siendo estos resultados estadísticamente significativos. Por otra parte, dentro de un mismo tipo de cultivo las tres parejas de homólogos presentan diferencias de tamaño con una frecuencia muy similar, con la sola excepción de la alta proporción de pequeñas diferencias en la tercera pareja de las células estimulantes con Fitohe-maglutinina.

Si las células son clasificadas en grupos según la magnitud y la distribución de las diferencias de tamaño en los tres pares de homólogos medidos, se observan también llamativas discrepancias entre los dos tipos de cultivos. Por ejemplo, en la tabla II se muestra el número

TABLA II

Células sin diferencias de tamaño significativas en las tres primeras parejas de homólogos, de un total de 133 de cada tipo de cultivo.

Límite de significación	5 %	10 %
Fitohemaglut.	29 (21 %)	78 (58 %)
Tuberculina	9 (6 %)	46 (34 %)

de células con los tres pares de homólogos iguales, es decir, sin diferencias de tamaño significativas de acuerdo con los dos criterios de significación antes mencionados. En ella se ve que en los cultivos estimulados con Tuberculina estas células constituyen un grupo notablemente más numeroso (21 y 58 %) que en los estimulados con Fitohe-maglutinina (6 y 34 %).

Los resultados obtenidos en el grupo control de 62 células procedentes de una serie distinta de cultivos estimulados con Fitohe-maglutinina, son totalmente concordantes con los anteriores.

**CÉLULAS TETRAPLOIDES.** Con la técnica previamente descrita (15) hemos logrado cultivos de linfocitos con gran abundancia de células tetraploides. En estas células cada homólogo está representado cuatro veces, es decir, en lugar de pares hay tétradas de cromosomas homólogos. La medición de los cromosomas en 28 de estas tétradas, pertenecientes a 14 células distintas, dio los siguientes resultados: 24 tétradas presentaban diferencias de tamaño significativas (criterio del 5 %), pero en 20 de éstas los cromosomas aparecían iguales de dos en dos, es decir, los cuatro homólogos de una tétrada podían ser agrupados en dos parejas de cromosomas iguales entre sí, pero distintos los de una pareja a los de la otra. Realmente, esto es lo que cabría esperar si la lon-

gitud de un cromosoma es, en efecto, una característica morfofuncional del mismo que se transmite en la reduplicación.

**CONSTRICCIONES SECUNDARIAS.** En la tabla III se indican las frecuencias de ~~aparición de~~ constricciones secundarias en las tres primeras parejas de homólogos de las 328 células donde estos homólogos han sido medidos (excluidas las tetraploides). Tales frecuencias son sensiblemente inferiores a las publicadas por otros autores (31, 38), lo cual puede ser debido en parte a que nosotros sólo hemos apuntado las constricciones claramente definidas como zonas más estrechas y de pobre tinción, y no las más dudosas. Sin embargo, nuestras observaciones coinciden con las de aquéllos al demostrar que las constricciones secundarias se presentan con más frecuencia en uno sólo de los dos homólogos de cada par. Además, nosotros hemos visto que si los homólogos muestran diferencias de tamaño, las constricciones suelen estar en el más largo.

TABLA III

Constricciones secundarias en las tres primeras parejas de homólogos de 328 células.

Pareja de homólogos	Número de células con constricciones	
	En un homólogo	En ambos homólogos
1. <sup>a</sup>	22 (6,7 %)	2 (0,6 %)
2. <sup>a</sup>	6 (1,8 %)	—
3. <sup>a</sup>	5 (1,5 %)	—

No hemos encontrado diferencias con respecto a las constricciones entre los cultivos estimulados con Tuberculina o con Fitohemaglutinina.

### Discusión

El principal objetivo de nuestro trabajo era ver si las diferencias de tamaño entre cromosomas homólogos variaban de unas células a otras, en relación con

el distinto estado funcional del genoma en las mismas. Para ello hemos comparado cultivos de linfocitos estimulados específicamente (con Tuberculina) e inespecíficamente (con Fitohemaglutinina), los que suponemos constituidos por poblaciones celulares funcionalmente distintas. Señalaremos en primer lugar cuáles son las bases en que ésta suposición se fundamenta.

Existen, en efecto, diferencias fundamentales entre la respuesta linfocitaria *in vitro* a los antígenos específicos y a la Fitohemaglutinina. Con la adición de un determinado antígeno al cultivo, solamente responden con transformación blástica y mitosis del 5 al 30 % de los linfocitos, y esto ocurre únicamente si el donador de las células estaba previamente sensibilizado a dicho antígeno (8, 18, 32). La Fitohemaglutinina, por el contrario, se comporta como un estimulante universal, al cual responden de manera masiva (95 al 100 %) los linfocitos de todos los individuos normales.

Pero recientemente se han obtenido pruebas más concretas de que las células activas en ambos tipos de cultivos tienen características funcionales distintas. Así, FORBES (9) ha visto que en los cultivos estimulados con un antígeno específico se produce solamente gamaglobulina con características de anticuerpo específico contra dicho antígeno, mientras que en los estimulados con Fitohemaglutinina aparecen, junto al anticuerpo específico, cantidades adicionales de gamaglobulina inespecífica. Por otro lado, COOPER y RUBIN (5) han demostrado que la mayor parte del RNA sintetizado por los linfocitos *in vitro* en respuesta a un antígeno específico es de naturaleza distinta al sintetizado en respuesta a la Fitohemaglutinina, siendo en el primer caso RNA ribosomal, fundamentalmente, y en el segundo RNA no ribosomal. Naturalmente, estas diferencias en el metabolismo del RNA son

una clara indicación de la existencia de otras diferencias en la actividad celular, y por supuesto, de la distinta actividad del genoma en las células de ambos tipos de cultivos.

Hay que considerar también la posibilidad de que las diferencias de tamaño entre cromosomas homólogos observados en metafase no sean sino artefactos técnicos introducidos en el curso de la preparación. No cabe duda de que tales artefactos pueden ser producidos. Por ejemplo, se ha visto que con el método habitual de secado al aire de las extensiones, los cromosomas que quedan en la periferia de la célula tienden a ser más largos que sus homólogos en posición central. Sin embargo, nuestras observaciones en las células tetraploides, y sobre todo en las células con endoreduplicación (16), muestran que las diferencias del tamaño persisten al reduplicarse los cromosomas, es decir, se transmiten de una generación de homólogos a la siguiente, lo que sugiere que no pueden ser sólo artefactos técnicos, sino que deben tener una equivalencia en los cromosomas *in vivo*.

Las variaciones en la frecuencia y la distribución de las diferencias de tamaño observadas al comparar los dos tipos de cultivos estudiados por nosotros, constituyen otro argumento más en contra de que aquéllas sean solamente artefactos técnicos. Por el contrario, nuestros resultados sugieren que tales variaciones pueden estar en relación con la distinta actividad del genoma en las células de ambos tipos de cultivos, de acuerdo con la interpretación funcional propuesta para las diferencias de tamaño entre cromosomas homólogos (17).

Si esta interpretación es correcta, es decir, si los cromosomas homólogos son desiguales porque poseen uno o más segmentos con distinto grado de condensación, cabría esperar que con la técnica autorradiográfica apareciesen también

llamativas asincronías en la reduplicación del DNA de ambos homólogos, ya que, como hemos mencionado previamente, la reduplicación tardía del DNA parece ser una propiedad más del estado condensado de la cromatina. Tales asincronías han sido, en efecto, señaladas por varios autores (12, 20, 23) en diversos pares de autosomas, pero no ha sido puesto en relación este fenómeno con las diferencias de tamaño. No obstante, en el ejemplo más característico de asincronía entre homólogos, el de los dos cromosomas X de las hembras de los mamíferos, si se ha observado que aquel que reduplica su DNA en último lugar y permanece muy condensado en interfase, suele ser también más corto que su homólogo en metafase (13).

Evidentemente, mientras no dispongamos de más datos al respecto, serían posibles otras interpretaciones de las diferencias de tamaño entre homólogos. Por ejemplo, MULDAL y OCKEY (27) han sostenido que podrían deberse a que los dos cromosomas del mismo par, uno procedente del padre y otro de la madre, serían portadores de un distinto número de genes. Pero nosotros creemos que esta interpretación no es correcta, ya que las diferencias de tamaño no son constantes, sino que varían de unas células a otras dentro del mismo individuo.

Finalmente, nuestras observaciones en relación con las constricciones secundarias, en concordancia con las que habían hecho previamente otros autores (31, 38), ponen de manifiesto que los cromosomas homólogos difieren también frecuentemente con respecto a esta característica morfológica, la cual debe tener también sus correspondientes implicaciones funcionales.

## Resumen

Comparando cultivos de linfocitos humanos estimulados con Tuberculina y con Fitohemaglutinina, se ha observado que la frecuencia

Las diferencias de tamaño y la distribución de las homólogos varían significativamente entre los dos tipos de cultivos. Para la observación, junto con las realizadas en células tetraploides y con endoreduplicación, permite afirmar que las diferencias de tamaño entre homólogos no pueden explicarse solamente como artefactos técnicos, sino que deben tener un significado funcional. Los autores sugieren que tales diferencias pueden ser debidas a la existencia de segmentos con distinto estado de condensación, y por consiguiente de actividad, en ambas cromosomas homólogos, variando de unas células a otras en relación con el estado funcional de genoma en las mismas.

### Summary

#### Functional significance of the differences in size between homologous chromosomes

In comparing cultures of human lymphocytes stimulated with Tuberculin and with phytohemagglutinin, it has been observed that the frequency and distribution of the differences in size between homologous chromosomes vary significantly between the two types of culture. This observation, together with those carried out on tetraploid cells and with endoreduplication, permits us to assert that the differences in size between homologues cannot be explained solely as technical contrivances, but must have a functional significance. The authors suggest that such differences may be due to the existence of segments with distinct states of condensation, and consequently of activity, in the two homologous chromosomes, varying between some cells and others in relation to the functional state of the genoma in the same.

### Bibliografía

1. ALLFREY, V. G., LITTAU, V. C., y MIRSKY, A. E. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **49**, 414, 1963.
2. BARR, M. L., y BERTRAM, E. G. : *Nature*, **163**, 676, 1949.
3. BEUTLER, E., YEH, M., y FAIRBANKS, U. F. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **48**, 9, 1962.
4. BUSCH, H., STARBUCK, W. C., SING, E. J., y RO, T. S. : En *The Role of Chromosomes in Development*. Ed. por M. Locke. Academic Press, Nueva York. **51**, 1964.
5. COOPER, H. L., y RUBIN, A. D. : *Lancet*, **2**, 723, 1965.
6. DAVIDSON, R. G., NITOWSKY, H. M., y CHILDS, B. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **50**, 481, 1963.
7. EDSTROM, J. E., y BEERMANN, W. : *J. Cell Biol.*, **14**, 371, 1962.
8. ELVES, M. W., ROATH, S., e ISRAËLS, M.C.G. : *Lancet*, **1**, 866, 1963.
9. FORBES, I. J. : *Lancet*, **1**, 198, 1965.
10. FRENSTER, J. H., ALLFREY, V. G., y MIRSKY, A. E. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **50**, 1026, 1963.
11. GALL, J. C., y CALLAN, H. G. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **48**, 662, 1962.
12. GERMAN, J. : En *Cytogenetics of Cells in Culture*. Ed. por R.J.C. Harris. Academic Press, Nueva York, 191, 1964.
13. GILBERT, C. W., MULDAL, S., LATJHA, L. G., y ROWLEY, J. : *Nature*, **195**, 869, 1962.
14. GRUMBACH, M. M., MARKS, P. A., y MORISHIMA, A. : *Lancet*, **2**, 1330, 1962.
15. HERREROS, B., GUERRO, A., y ROMO, E. : *Lancet*, **2**, 500, 1966.
16. HERREROS, B., GUERRO, A., y ROMO, E. : En preparación.
17. HERREROS, B., ORTIZ, O., BAÑUELOS, J., VELASCO, R., y BOSQUE, P. G. : *Lancet*, **1**, 557, 1964.
18. HIRSCHHORN, K., BACH, F., KOLODNY, R. L., FIRSCHEIN, I. L., y HASHEM, N. : *Science*, **142**, 1185, 1963.
19. HSU, T. C. : *Exptl. Cell Res.*, **27**, 332, 1962.
20. HSU, T. C., SCHMID, W., y STUBBLEFIELD, E. : En *The Role of Chromosomes in Development*. Ed. por M. Locke. Academic Press, Nueva York. **83**, 1964.
21. HUANG, R. C., y BONNER, J. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **48**, 1216, 1962.
22. JACOB, F., y MONOD, J. : *J. Mol. Biol.*, **3**, 318, 1961.
23. LIMA-DE-FARIA, A., REITALU, J., y BERGMAN, S. : *Hereditas*, **47**, 695, 1961.
24. LYON, M. : *Nature*, **190**, 372, 1961.

25. MOORHEAD, P. S., y DEFENDI, V. : *J. Cell Biol.*, **16**, 202, 1963.
26. MORISHIMA, A., GRUMBACH, M. M., y TAYLOR, J. H. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **48**, 756, 1962.
27. MULDAL, S., y OCKEY, C. H. : *Lancet*, **2**, 462, 1961.
28. OHNO, S., y HAUSCHKA, T. S. : *Cancer Res*, **20**, 541, 1960.
29. OHNO, S., y MAKINO, S. : *Lancet*, **1**, 78, 1961.
30. OHNO, S., KAPLAN, W. D., y KINOSITA, R. : *Exptl. Cell Res.*, **18**, 415, 1959.
31. PALMER, C. G., y BERBEUCK, S. S. : *Lancet*, **1**, 987, 1964.
32. PERMAIN, G., LYCETTE, R. R., FITZGERALD, P. H. : *Lancet*, **1**, 637, 1963.
33. RUSSELL, L. B. : *Science*, **133**, 1795, 1961.
34. RUSSELL, L. B. : *Science*, **140**, 976, 1963.
35. SCHMID, W. : *Cytogenetics*, **2**, 175, 1963.
36. TAYLOR, J. H. : *J. Biochem. Cytol.*, **7**, 455, 1960.
37. TAYLOR, J. H. : *En Cytogenetics of Cells in Culture*. Ed. por R.J.C. Harris. Academic Press, Nueva York. 175, 1964.
38. WALD, N., y TURNER, I. H. : *Lancet*, **1**, 169, 1964.