

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE BIOLOGIA
SECRETARIA

28 DEC 1984

ENTRADA N.º _____

R.4472



INTERCAMBIOS ENTRE CROMATIDAS HERMANAS:
FRECUENCIA, LOCALIZACION Y APORTACION AL
ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA DEL CROMOSOMA.

Tesis para optar al grado de Doctor en Biología, presentada por:

Pablo Escalza Ruiz

Sevilla, 23 de Diciembre, 1984.

TD:99

D. José Luis López-Campos, Catedrático Numerario y Jefe del Departamento de Citología e Histología Animal y Vegetal, certifica que

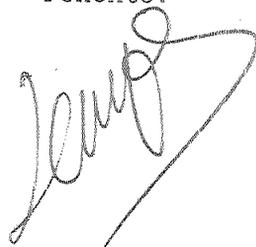
El trabajo realizado para optar al grado de Doctor por el Licenciado D. Pablo Escalza Ruiz bajo el título: "Intercambios entre cromátidas hermanas: frecuencia, localización y aportación al estudio de la estructura del cromosoma", ha sido realizado en este Departamento bajo la dirección de D. Felipe Cortés Benavides y actuando como ponente el Director de este Departamento.

Director:



Dr. Felipe Cortés Benavides

Ponente:



Prof. Dr. J.L. López-Campos.

Sevilla, 23 de Diciembre de 1984.

AGRADECIMIENTOS.

El presente trabajo ha sido realizado bajo la dirección del Dr. Felipe Cortés Benavides, Prof. Adjunto Numerario, a quien deseo expresar mi agradecimiento, tanto por la formación científica recibida, como por el apoyo y amistad mostrada.

Al Prof. Dr. D. José Luis López-Campos, Director de este Departamento, quien puso a nuestra disposición los elementos materiales y humanos necesarios.

Al Dr. D. Joaquin Muñoz-García por sus asesoramientos en cuanto a los tratamientos estadísticos realizados.

A M^a Victoria Hurtado de Mendoza por su colaboración en la redacción mecanográfica de esta Tesis Doctoral.

A Daniel.

ABREVIATURAS.

- BrdUrd : 5-Bromo-2'-desoxiuridina.
dT : Timidina.
Urd : Uridina.
FdU : Fluorodesoxiuridina.
ICH : Intercambios entre cromátidas hermanas.
NOR : Región organizadora nucleolar.
FPG : Fluorescencia más Giemsa.
SRT : Segmentos de replicación tardía.
ID : Intercambios discontinuos.
³H-dT : Timidina tritiada.
IdUrd : Iododesoxiuridina.
CldU : Clorodesoxiuridina.
U.V. : Ultravioleta.
L.V. : luz visible.
MMC : mitomicina C.
MMS : Metilmetanosulfonato.
DMBA : Dimetilbenzantraceno.
TMBA : Trimetilbenzantraceno.
HM : Hidrazida maleica.
EA : Alcohol etílico.
IM : Índice mitótico.
5-AU : 5-aminouracilo.
EE : Error estandar.
dUMP : Acido desoxiuridílico.
dTMP : Acido timidílico.
dC : Desoxicitidina
dTTP : Timidina trifosfato.
dCDP : Desoxicitidinadifosfato.
UrdMP : Acido Uridílico.
FU : Fluorouracilo.

INDICE.

1.- RESUMEN.....	1
2.- INTRODUCCION.....	4
1. Algunos datos básicos acerca de los intercambios entre cromátidas.	
. El problema de la isomarcación.	
. Reunión restringida de los segmentos cromosómicos intercambiados.	
. Naturaleza espontánea de los ICH _s . Papel de la bromodesoxiuridina.	
. Intercambios inducidos.	
. Agentes químicos.	
. Localización de los ICH _s en los cromosomas.	
2. Estructura de la cromatina.....	22
3.- MATERIAL Y METODOS.....	28
1. Material utilizado.....	28
2. Condiciones generales de cultivo.....	28
3. Tratamientos.....	29
3.1. Tratamientos con bromodesoxiuridina (BrdUrd).	
3.2. Tratamiento con timidina (dT).	
3.3. Tratamiento con uridina (Urd).	
3.4. Tratamiento con fluorodesoxiuridina (FdU).	

3.5. Tratamiento con 5-aminouracilo (5-AU).	
3.6. Tratamiento con cafeína.	
3.7. Tratamiento con colchicina.	
3.8. Tratamiento con 8-oxiquinoleína.	
4. Fijaciones.....	32
5. Preparación de los portaobjetos.....	33
6. Maceración. Técnica de la pectinasa.....	33
7. Aplastamientos.....	34
8. Desprendimiento de los cubreobjetos.....	34
9. Técnicas de tinción.....	35
9.1. Técnicas para la tinción diferencial del ADN bromosustituído.	
9.2. Tinción con orceína acético-clorhídrico.	
9.3. Técnica para la detección de bandas C.	
9.4. Técnica para la detección de bandas N.	
9.5. Técnica de bandeado C-modificado.	
10. Cálculo del número de ICH _s por cromosoma.....	39
11. Cálculo del índice mitótico.....	40
12. Tratamientos estadísticos.....	40
13. Micrografías.....	40
4.- RESULTADOS.....	41
1. Contribución de la timidina, uridina y Fluorodesoxiuridina a la producción de intercambios cromátidas.....	41
1.1. Timidina.	
1.2. Uridina.	
1.3. Fluorodesoxiuridina.	
2. Frecuencia y localización de los ICH _s	54
2.1. Heterocromatina constitutiva en A. cepa.	
2.2. Detección de ADN de replicación tardía	

2.3. Diseño experimental.	
2.4. Frecuencia de ICH _s .	
2.5. Patrón de distribución de los ICH _s a lo largo del cromosoma satelizado.	
a) Regiones organizadoras nucleolares.	
b) Regiones ricas en ADN de replicación tardía, no detectables como heterocromáticas.	
c) Heterocromatina constitutiva.	
d) Otras regiones cromosómicas.	
3. Intercambios entre cromátidas hermanas y estructura del cromosoma.....	65
5.- DISCUSION.....	69
1. Acerca del papel de la timidina, uridina y fluorodesoxiuridina en la producción de intercambios entre cromátidas hermanas.	69
2. Distribución inter e intracromosómica de los intercambios.....	79
3. Acerca de la estructura del cromosoma metafásico.....	86
6.- CONCLUSIONES.....	95
9.- BIBLIOGRAFIA.....	99

RESUMEN.

RESUMEN.

En el presente trabajo hemos estudiado algunos aspectos relacionados con el fenómeno de los intercambios entre cromátidas hermanas (ICH) en células somáticas, con objeto, entre otras cuestiones, de aportar nuevos datos acerca del posible origen y mecanismo por el cual tiene lugar dicho fenómeno y contribuir, en nuestra medida, al mejor conocimiento de la estructura y fisiología del cromosoma eucariótico.

En primer lugar nos propusimos estudiar la influencia que sobre la frecuencia de intercambios podían tener determinados compuestos que, junto con la 5-bromo-desoxiuridina (BrdUrd), se han venido empleando clásicamente, en los tratamientos para obtener tinción diferencial en los cromosomas. Con este objeto fueron examinados los efectos de la timidina (dT), uridina (Urd) y 5-fluoro-desoxiuridina (FdU) sobre la frecuencia de ICH en células meristemáticas radicales de *Allium cepa*, que crecían en condiciones standard. La dT fué incapaz de elevar la frecuencia de ICH_s a ninguna de las concentraciones ensayadas; la uridina ha provocado una moderada, aunque estadísticamente significativa, disminución de la tasa de intercambios, con respecto al control, mientras que la FdU, por el contrario, ha mostrado una notable capacidad de inducir ICH_s en nuestro sistema. Cuando las células crecen en presencia de FdU durante dos ciclos de replicación consecutivos, la frecuencia de intercambios obtenida en la segunda mitosis fué tres veces mayor que la observada en células no tratadas con este nucleósido. Por otra parte, cuando el tratamiento con FdU se realizaba sólo durante el primer ciclo celular la potenciación de los ICH_s observados en la segunda mitosis era notablemente superior que cuando el tratamiento tiene lugar sólo durante el segundo. Para confirmar este efecto, analizamos cromosomas de la tercera mitosis que habían sido tratados con FdU durante el segundo ciclo celular de replicación. Los resultados obtenidos fueron también consistentes con

la hipótesis de que la mayoría de los ICH_s inducidos por el FdU se producen como consecuencia de un alto nivel de incorporación de BrdUrd en los cromosomas y que la mayoría de esos intercambios se forman cuando un ADN bromosustituído se usa como molde para una nueva síntesis de ADN.

En segundo lugar estudiamos la frecuencia y localización de los ICH_s , tanto espontáneos como inducidos, en el cromosoma subtelo-céntrico satelizado de *A. cepa* (portador de la región organizadora nucleolar) la frecuencia de intercambios espontáneos en el cromosoma satelizado fué la que podía esperarse, de acuerdo con su longitud relativa. Del mismo modo, cuando la frecuencia de ICH_s fué experimentalmente incrementada mediante iluminación con luz visible o por tratamiento con Hidrazida maleica, la frecuencia de intercambios detectada en estos cromosomas se ajustaba bastante bien a los valores esperados según una distribución aleatoria de los ICH_s entre el conjunto de cromosomas del cariotipo.

Posteriormente, subdividimos el cromosoma satelizado en distintos segmentos, según su carácter heterocromático, eucromático o de ADN de replicación tardía, en orden a estudiar la incidencia de ICH_s en cada una de las mencionadas regiones especiales del cromosoma. Los patrones de distribución de los intercambios espontáneos e inducidos coincidieron en gran medida, lo cual está en concordancia con lo publicado por otros autores en células animales y vegetales. En cuanto a una posible distribución preferencial de los ICH_s , hemos encontrado que en las regiones heterocromáticas los intercambios se dan con una frecuencia menor de la que se esperaría si los intercambios se distribuyeran por igual a lo largo del cromosoma. Una notable excepción la constituye la región organizadora nucleolar (NOR) que, a pesar de su carácter heterocromático, se ha manifestado como una zona altamente sensible para la producción de ICH en *A. cepa*. También se discute la situación observada en las restantes regiones en cada uno de los diseños experimentales planteados.

Finalmente, la alta resolución ofrecida por la técnica FPG nos ha permitido visualizar tres características importantes en cromosomas bromosustituídos: (1) segmentos intercambiados de pequeño tamaño, que no alcanzan la anchura total de la cromátida, detectados después de una ó dos rondas de replicación en presencia de BrdUrd; (2) segmentos de replicación tardía (SRT) de propiedades semejantes a los anteriores y (3) intercambios de características especiales, a los que hemos denominado intercambios discontinuos ó ID.

El análisis morfológico de los intercambios puntuales y de los SRT parece evidenciar una organización regular de la cromatina en metafase. Dado que en ninguno de los casos hemos apreciado variaciones en las dimensiones longitudinales de estos intercambios, se puede descartar que las fibras de cromatina, de un diámetro detectable al microscopio óptico, se dispongan para formar la cromátida siguiendo un modelo longitudinal. El espesor constante característico de estos intercambios es de aproximadamente 0.5μ , lo cual coincide con lo obtenido por diferentes autores que han propuesto el cromonema como nivel de organización. Nuestras observaciones parecen indicar que la fibra de nucleoproteínas se dispone de una manera helicoidal para constituir el cromosoma metafásico. Por otra parte, el análisis de las características morfológicas mostradas por los ID_s a lo largo de una cromátida o en ambas cromátidas hermanas nos ha permitido hacer ciertas puntualizaciones acerca de la dirección de los hipotéticos giros.

INTRODUCCION.

El fenómeno de los intercambios entre cromátidas hermanas (ICH) puede considerarse el resultado de un intercambio entre las moléculas de ADN, en locis homólogos, que ocurren durante la replicación de cromosomas de células somáticas.

En 1938, B. McClintock (115), realizando un amplio estudio sobre los cromosomas en anillo del maíz observó que, con una determinada frecuencia, aparecían anillos dicéntricos de doble tamaño que uno normal y cromosomas en anillo en los que sus cromátidas se encontraban entrelazadas de manera que se impedía su libre migración en anafase. Si bien entonces fué difícil dar una interpretación fundada sobre el mecanismo de formación de estos anillos dobles y entrelazados, debido a la falta de conocimientos acerca de la estructura de la cromátida, se propuso que este fenómeno podía ser el resultado de la ocurrencia espontánea de uno o varios intercambios entre las cromátidas que forman los anillos simples. Sin embargo, la primera visualización inequívoca de los ICH fué realizada por J.H. Taylor y col. en 1957 (182), mediante el marcaje de las células con timidina tritiada (^3H -dT) y el empleo de técnicas autorradiográficas. Los citados investigadores usa-

ron células de los meristemos radicales de *Vicia faba* ($2n=12$), ya que recientemente Howard y Pelc habían establecido la duración del ciclo celular y la de todas sus fases (G_1 , S, G_2 , y mitosis) en esta especie (71). Así establecida la duración de la fase de síntesis de ADN (fase S) en 8 horas, un tratamiento durante éste periodo de tiempo con $^3\text{H-dT}$ aseguraba que muchos núcleos habían incorporado el isótopo radioactivo en su ADN. Permitiendo que las células marcadas desarrollasen otro periodo S en un medio libre de isótopos era posible observar, después del revelado en la autorradiografía, que los cromosomas en la segunda mitosis estaban constituidos por cromátidas físicamente diferentes, de manera que una de ellas aparecía marcada en toda su longitud mientras que la otra no lo estaba, como era de esperar si hubiese tenido lugar una segregación semiconservativa de las unidades replicadas en los cromosomas. Ocasionalmente Taylor y colaboradores observaron que se producían cambios en la marcación, a un mismo nivel en las dos cromátidas del cromosoma, constituyendo esto la primera evidencia directa de la existencia del fenómeno de intercambios entre cromátidas hermanas. Inmediatamente este fenómeno llamó la atención de muchos citogenetistas y se plantearon cuestiones acerca de su naturaleza.

Los sucesivos estudios sobre los ICH en cromosomas marcados aportaron datos muy valiosos referentes a la replicación del cromosoma y a su estructura. Sin embargo, los esfuerzos encaminados a obtener una clara respuesta a los problemas planteados se vieron limitados en parte por el escaso poder de resolución que ofrecía la técnica autorradiográfica convencional.

El desarrollo de nuevos métodos para diferenciar citológicamente las cromátidas hermanas de los cromosomas metafásicos sin usar timidina tritiada se iniciaron con los trabajos de Zakharov y Egolina (1972) (200). Estos autores utilizaron el nucleósido halogenado 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdUrd), análogo a la timidina, cuya incorporación en el ADN resultó en la descordensación de la cromatina en los cromosomas de Hamster chino. Cuando las células eran expuestas a 25-

- 400 μ gr/ml de BrdUrd, los cromosomas que lo habían incorporado durante dos ciclos de replicación sucesivos mostraban una cromátida más descondensada y que se teñía más debilmente con Giemsa que su cromátida hermana. En un trabajo posterior Zakharov y otros (Baranovskaya y col., 1972; Zakharov y col., 1974) (8) (201) usaron un pulso terminal de 200 μ gr/ml de BrdUrd para descondensar selectivamente el cromosoma X heterocromático de linfocitos humanos, el cual replica al final el periodo S. Ikushima y Wolff confirmaron que cuando el ADN cromosómico ha incorporado BrdUrd ó 5-Iodo-deoxi-Uridina (IdUrd) durante dos periodos de replicación celular, las cromátidas que contenían BrdUrd (76). (ó IdUrd) en ambas cadenas de ADN se tiñen menos intensamente que su cromátida hermana, en la cuál sólo una de las cadenas había sido sustituida con el análogo halogenado. Aunque mediante estas técnicas se logró una detección de las ICH_s más exacta que la obtenida por el método de marcaje con tritio, la resolución conseguida no era aún totalmente satisfactoria.

En 1973, Latt(98) publicó un método que permitía distinguir claramente entre sí las cromátidas hermanas. Consistía en teñir los cromosomas bromo-sustituídos con el fluorocromo Hoechst 33258 y observarlos al microscopio de fluorescencia. La sustitución de la timidina normal por bromouracilo en el ADN cromosómico tenía como consecuencia una reducción en la fluorescencia del fluorocromo, de manera que una cromátida bisustituída con el análogo (cromátida BFS) fluorecía menos luminosamente que la otra en la que sólo una de las dos cadenas de ADN de la cromátida había sido bromo-sustituída (cromátida UFS), pudiéndose distinguir claramente los ICH producidos, incluso los segmentos intercambiados de escaso tamaño. Sin embargo, el inconveniente que ofrece esta técnica es que la fluorescencia se extingue con rapidez y la imagen diferencial se pierde con el tiempo. El uso de otros colorantes fluorescentes (Dutrillaux y col., 1973; Franceschini, 1974; Kato 1974a; Perry y Wolff, 1974) (42) (49) (81) (137), especialmente el naranja de acridina, resolvía este problema, hasta cierto punto. La fluorescencia

cia del naranja de acridina se extinguía más lentamente y además la velocidad de extinción era diferente en cromátidas BFS y UFS. De todas formas, aunque las preparaciones teñidas con este colorante podían ser mantenidas durante cierto tiempo, eran todavía temporales.

Con objeto de superar este inconveniente, Perry y Wolff(1974) (137), desarrollaron un método modificado al que denominaron Fluorescence plus Giemsa o técnica FPG. Consistía en teñir las preparaciones con Hoechst 33258 y exponerlas a la luz durante 24 horas, incubarlas en una solución salina a 60°C y después teñirlas con Giemsa. Los cromosomas teñidos diferencialmente de esta manera, además de ofrecer una óptima resolución podían ser conservados de forma permanente. Independientemente de Perry y Wolff, otros autores propusieron diferentes métodos para obtener similares resultados (Kim, 1974; Korenberg y Freedlender, 1974) (93) (96).

La tinción diferencial de los cromosomas era generalmente llevada a cabo exponiendo las células durante dos rondas consecutivas a la presencia de BrdUrd, resultando cromátidas BFS frente a cromátidas UFS, pero también era posible obtenerla entre cromátidas UFS y otra no sustituida, situación que se obtiene cuando las células crecen en BrdUrd sólo durante una ronda de replicación seguida de otra en ausencia de BrdUrd en el medio (Kato, 1974a; Kihlman y Kronborg, 1975) (81) (91).

El mecanismo por el cual se obtiene la diferenciación de las cromátidas hermanas mediante la incorporación de BrdUrd en el ADN y tinción con Giemsa es todavía poco claro. Algunos resultados indican que es la pérdida preferencial por fotosensibilización, del ADN bromo-sustituido lo que contribuye a la tinción diferencial. Por otro lado, el hecho de que varios procedimientos de bandeado G, como el tratamiento con una solución salina (Korenberg y Freedlender, 1974) (96) o el tratamiento con tripsina (Pathak y col., 1975) (133) facilitan la tinción diferencial con Giemsa, parece indicar que existe alguna interacción entre el colorante y la arquitectura molecular del ADN bromosustituido.

Poco después del descubrimiento de Perry y Wolff en células de mamíferos, la técnica de FPG fué pronto aplicada a células vegetales, en primer lugar a *Vicia faba* (Kihlman y Kronborg, 1975) (91), después a *Allium cepa* (Schvartzman y Cortés, 1977) (157), *Secale cereale* (Friebe, 1978) (51) y *Hordeum vulgare* (Schubert y col., 1980) (155). Antes de obtener resultados satisfactorios en plantas hubieron de ser superados algunos problemas, como la resistencia al aplastamiento de las células vegetales debido al contenido de celulosa y pectina en sus paredes y la escasa incorporación de BrdUrd en el ADN de estas células en comparación con la que tiene lugar en células animales. Para conseguir la incorporación de una cantidad suficiente de BrdUrd que permitiese obtener posteriormente una buena tinción diferencial de las cromátidas, se trataba el meristemo, simultáneamente, con BrdUrd y con el análogo de la Uridina, 5-Fluorodeoxiuridina (FdUrd), el cual impide la síntesis "de novo" de ácido timidílico. Después de la fosforilación del ácido 5-fluorodeoxiuridílico, el FdUrd inhibe específicamente la enzima timidilato sintetasa (Cohen y col., 1958; Heidelberger 1961) (25) (68), la cual cataliza la metilación del ácido uridílico a ácido timidílico. Para evitar el posible efecto adverso que el FdUrd pudiera tener sobre la síntesis de ARN, se añadía también Uridina (Urd) a concentraciones de 10^{-6} ó 5.10^{-6} M.

Aunque actualmente la mayoría de los estudios relacionados con el fenómeno de los ICH₃ se realizan sobre células animales, hay aspectos que pueden ser estudiados con más detalle en células vegetales debido, en parte al gran contenido en ADN y el tamaño de los cromosomas.

ALGUNOS DATOS BASICOS ACERCA DE LOS INTERCAMBIOS ENTRE CROMATIDAS.

El problema de la isomarcación.

En autorradiografías de cromosomas de *Bellevaria romana* en la segunda mitosis después de un pulso de marcaje con timidina tritizada, Taylor (1958) (183) observó cambios en la marcación que eran alternativos y recíprocos en ambas cromátidas del cromosoma. No obstante, con una determinada frecuencia, hallaba cromosomas en los que ambas cromátidas aparecían marcadas aparentemente a un mismo nivel. Este fenómeno fue denominado por Peacock, Isolabelling ó isomarcación.

El fenómeno de la isomarcación podía ser interpretado como un intercambio entre dos o más dobles hélices de ADN que constituyesen cada cromátida (Peacock, 1963, 1965) (135) (136), siendo esto por tanto, un argumento en favor de la estructura polinémica del cromosoma. En los trabajos de Gibson y Prescott (1972) (56), estos autores llegaron a concluir que la isomarcación detectada en cromosomas de rata canguro podía ser entendido como el resultado de varios intercambios ocurridos muy próximos unos de otros, resultando ello en una imagen esparcida en la escasamente resolutive técnica autorradiográfica. Efectivamente, los resultados de los estudios empleando el método de marcaje con BrdUrd están a favor de ésta última interpretación, ya que en ningún caso se ha llegado a detectar un patrón de marcación equivalente a la isomarcación de la técnica autorradiográfica (Kato, 1974 b, Korenberg y Freedlender, 1974, Wolff y Perry, 1974, 1975) (82) (96) (196) (197).

Estos datos representan, pues, un fuerte apoyo a la idea de que cada cromátida en los cromosomas de organismos superiores está constituida por una sola molécula de ADN que la recorre en toda su longitud.

Otra cuestión fundamental para entender el mecanismo de formación de los ICH y su significado biológico era saber si los intercambios entre comátidas hermanas eran intercambios de cadenas sencillas de ADN o de cadenas dobles. Si un intercambio involucra sólo a una hebra de cada duplex de ADN de una cromátida, en la primera mitosis después del marcaje con $^3\text{H-TdR}$, aparecerían cromosomas con segmentos sin marcar en una de las cromátidas hermanas (Taylor, 1958) (183) y como consecuencia en la segunda mitosis, isomarcación en esas regiones. Dicho autor no encontró semejante heteromarcación en *Bellevaria*, mientras que Wolff y Perry (1975) (197) usando la técnica FPG tampoco encontraron heteromarcación en la primera mitosis ni isomarcación en la segunda en cromosomas de Hamster chino. Tampoco Kato (1975) (85) ni Kihlman y Kronborg (1975) (91) en *Vicia faba* pudieron encontrarla ni aún aumentando la frecuencia de ICH mediante el tratamiento con mitomicina C 6 con luz UV.

Estos resultados indican que en la formación de un ICH están involucradas las cuatro cadenas polinucleotídicas de los cromosomas.

Reunión restringida de los segmentos cromosómicos intercambiados.

En sus clásicos experimentos Taylor (1958, 1959) (183) (184) observó dos clases de intercambios en células tetraploides (inducidas por un tratamiento prolongado con colchicina). Los ICH que se forman durante el primer ciclo de replicación en un cromosoma dado, segregan de tal manera que en la segunda mitosis aparecen al mismo nivel en ambos cromosomas hermanos de la célula tetraploide, mientras que los originados en el segundo ciclo sólo aparecen en uno de ellos. Estos intercambios se denominaron "gemelos" y "simples" respectivamente. De acuerdo con el razonamiento de Taylor si la reunión de las cadenas polinucleotídicas rotas para formar un ICH se realiza al azar, la razón de intercambios gemelos a simples que cabría esperar sería de 1:10.

Si la reunión de las subunidades tuviera lugar exclusivamente entre aquellas que exhibiesen la misma polaridad la razón sería de 1:2. Los resultados demostraron inequívocamente que la restricción debida a la polaridad de las cadenas polinucleotídicas existe, además de representar un nuevo apoyo a la hipótesis de la naturaleza uninémica del cromosoma eucariótico.

Experimentos realizados años más tarde, utilizando las nuevas técnicas de marcaje del ADN confirmaron una vez más las primeras conclusiones obtenidas por Taylor (Tice y col., 1975; Wolff y Perry, 1975) (186) (197).

Naturaleza espontánea de los ICH. Papel de la Bromodesoxiuridina.

Un aspecto de singular importancia es ver con que frecuencia se producen los ICH en la naturaleza, si es que estos realmente ocurren.

Brewen y Peacock (1969) en cromosomas humanos y Gibson y Prescott en células de rata canguro (1972) postularon que la frecuencia de intercambios observados después de la incorporación de la timidina tritiada, probablemente se veían afectadas por la propia radiación endógena del tritio. Por tanto no se puede excluir la posibilidad de que una parte o incluso la totalidad de los ICH observados sean inducidos por la radiación. (18) (56)

La técnica FPG parece ser, en principio, igualmente inapropiada para resolver este tipo de problema, ya que la sustancia utilizada (BrdUrd) para poder detectar los intercambios, al igual que la timidina tritiada, origina aberraciones cromosómicas (Hsu y Somers, 1961), mutaciones (72) y también intercambios entre cromátidas. De hecho, la incidencia de ICH se vió que podía ser potenciada aumentando la concentración de BrdUrd en el medio (Kato, 1974a; Latt, 1974b; Wolff y Perry, 1974) (81) (100) (196). Sin embargo, a las bajas concentraciones de BrdUrd, que oscilaban entre 0.1 y 2.5 µg/ml, la frecuencia de intercambios en cromosomas de Hamster chino tendía a mante-

tenerse alrededor de un valor constante. En cromosomas humanos la frecuencia de intercambios también tendía a nivelarse, a bajas concentraciones de BrdUrd (Latt, 1974b) (100). Estos resultados sugieren que existen al menos una fracción de los ICH que ocurren independientemente del BrdUrd utilizado para detectarlos.

La cuestión fundamental ahora era saber si la alta frecuencia de ICH alcanzada era debida a la cantidad de BrdUrd incorporada en el ADN o si era la concentración de BrdUrd en el medio la responsable. Mazrimas y Stetka (1978) (114), demostraron que la frecuencia de intercambios estaba relacionada directamente con la cantidad de BrdUrd incorporado en el ADN. Posteriormente se propuso que la inducción de ICH en células de Hamster era independiente, hasta cierto punto, del contenido en BrdUrd del ADN (Davidson y col., 1980) (35). Cuando los autores utilizaban concentraciones de BrdUrd que iban desde 12 a 300 μM la media de ICH por célula aumentaba casi cuatro veces pero la mitad de ese incremento ocurría a niveles de bromosustitución muy semejantes.

La tinción diferencial de cromátidas puede obtenerse bien haciendo que se incorpore el análogo halogenado sólo durante una ronda de replicación del ADN o bien durante dos ciclos de replicación consecutivos. En el primer caso se obtiene, en la segunda mitosis, cromosomas en los que únicamente 1 de las 4 cadenas de ADN están sustituidas con BrdUrd (TB-TT); mientras que en el segundo son 3 las cadenas polirribonucleotídicas bromosustituidas (TB-BB). El material vegetal era especialmente apropiado para este tipo de estudios y la frecuencia de intercambios se ha investigado en *Vicia faba* (Kihlman y Kronborg, 1975) (91), (Schvartzman y Cortés, 1977) (157), *Secale cereale* (Friebe, 1978) (51) y en un cariotipo reconstruido de *Hordeum vulgare* (Schubert y col., 1980) (155). Del análisis de la frecuencia en cromosomas TT-TB y TB-BB, se desprende que hay una relación entre la frecuencia de ocurrencia de intercambios y el número de ciclos celulares en los que las células han crecido en presencia de BrdUrd, ya que los cromosomas de constitución TB-BB mostraban mayor cantidad de intercambios que los de constitución TT-TB.

Un experimento realizado por Schwartzman y col. (1979) (161), estaba específicamente diseñado para ver si, efectivamente, existía una relación entre el número de cadenas bromosustituidas y la frecuencia de ICH. Estos autores utilizaron meristemas radicales de A. cepa que habían sido tratados con BrdUrd uno, dos o tres ciclos de replicación. Los cromosomas de la mitosis 3ª presentaban tanto intercambios "no recíprocos" (ocurridos durante el 1º ó el 2º ciclo) como "recíprocos" (ocurridos durante el 3^{er} ciclo de replicación). Del análisis de las proporciones de uno y otro tipos de intercambios obtenidos en los diferentes experimentos planteados pudieron llegar a concluir claramente que muchos de los ICH detectados, mediante la técnica FPG, eran inducidos por el BrdUrd. Más recientemente Gutiérrez y Calvo (1981) (62) han llegado a determinar matemáticamente el porcentaje presumible de intercambios que ocurren espontáneamente en este mismo material. En conclusión, si bien la mayoría de los intercambios parecen ser inducidos por el BrdUrd, no se descarta la existencia de intercambios espontáneos.

Intercambios inducidos.

Un gran número de investigadores han encontrado que la frecuencia de ICH podía ser incrementada por la acción de mutágenos químicos, incluso a concentraciones más bajas que las necesarias para que dichos mutágenos causen aberraciones cromosómicas, tanto en células animales (Latt, 1974b; Kato y Shimada, 1975; Solomon y Bobrow, 1975) (100) (89) (168), como en las plantas (Kihlman, 1975) (90).

En células del ovario de Hamster chino, Perry y Evans (138) investigaron la capacidad de inducir ICH de 14 sustancias de reconocida eficacia como mutágenos químicos. A dosis bajas todos los mutágenos, excepto la ciclofosfamida y la hidrazida maleica, duplicaban la frecuencia de intercambios, aunque tenían una incidencia mínima sobre la producción de aberraciones cromosómicas. A dosis más elevadas los in-

tercambios se veían multiplicados por 10 y las aberraciones, aunque incrementadas, se mantenían a unos niveles bajos. Esto llevó a Perry y Evans a postular que el análisis de las frecuencias de ICH inducidos por un agente químico es una forma sencilla y muy sensible para detectar agentes que causen un daño en el ADN. (138)

En principio los agentes químicos sometidos a test eran sustancias que, sobre otros sistemas, habían sido catalogadas como sustancias que interactuaban directamente con el ADN. Sin embargo, hoy día se sabe que no es estrictamente necesario que un compuesto reaccione con el ADN para que sea capaz de inducir ICH.

Aunque no es conocido el mecanismo molecular exacto por el cual se producen los ICH, las células necesitan pasar por un período de síntesis de ADN para que los intercambios se produzcan (Wolff y col., 1974) (198). Kato (1974c) (83), igualmente afirma que la formación de ICH_s está limitada a las porciones de ADN que se encuentran replicando ó que acaban de completar la replicación. Así, una acción indirecta de un agente químico sobre el ADN, por ejemplo, sobre la síntesis de ADN, puede también contribuir a la formación de ICH.

Agentes físicos.

El primer intento de inducir ICH experimentalmente fué realizado por Marin y Prescott en 1964 (113). Irradiaron células de Hamster chino con rayos x, a distintas dosis, inmediatamente después de dar el pulso con ³H-TdR, encontraron un incremento de 1,5 veces en la frecuencia de intercambios, con respecto al control. Más tarde, Perry y Evans (1975) (138) también encontraron un incremento de ICH, dependiente de la dosis empleada, en células irradiadas con rayos x. Sin embargo, el incremento sufrido era mínimo en comparación con el de las aberraciones cromosómicas provocadas por la radiación. Mientras que para dosis de 400R sólo se duplicaba la frecuencia de ICH, la cantidad de aberraciones producidas era 20 veces mayor que en células controles no irradiadas.

La radiación gamma también causa un incremento significativo en la frecuencia de intercambios, pero al igual que los rayos X, este aumento es pequeño (Solomon y Bobrow, 1975) (168). Por el contrario, la luz UV se comporta de un modo diferente a las radiaciones ionizantes; es decir, aunque es causa de relativamente pocas aberraciones cromosómicas, es capaz de provocar una drástica elevación del número de ICH (Kato, 1972; Rommelaere y col., 1973) (79) (147). Este incremento es sólo detectable si las células irradiadas pasan por una fase S (Kato, 1973; Wolff y col., 1974) (80) (198).

En experimentos con *Xenopus*, que posee un enzima fotorreactivante, capaz de monomerizar los dímeros de pirimidinas provocados en el ADN por la radiación UV; Griggs y Bender (1973) (61) demostraron que por fotorreactivación es posible eliminar las lesiones responsables de las aberraciones cromosómicas inducidas.

Para el caso de los ICH, sin embargo, los resultados son contradictorios, de manera que hoy en día existe una gran discrepancia entre los distintos autores en cuanto si hay o no una relación directa entre el número de dímeros de pirimidina inducidos por la luz UV y la inducción de ICH por este agente (Wolff, 1982) (194). Aunque existen evidencias circunstanciales que indican que hay alguna relación entre la producción de ICH por la luz UV y el proceso de reparación postreplicacional (Kato, 1977) (86) el mecanismo molecular permanece aún lejos de ser entendido.

Cuando los cromosomas bromo- o iodo-sustituídos son expuestos a la luz visible, la frecuencia de los ICH se vé también incrementada de una forma proporcional a la intensidad de la iluminación (Ikushima y Wolff, 1974; Kato, 1974c). Este incremento es detectable sólo cuando las células que reciben la luz se encuentran en la fase S del ciclo celular, mientras que una exposición en G_2 no tiene efecto sobre la producción de ICH (Kato, 1974c) (83). Wolff y Perry (1974) (196) demostraron que la frecuencia de intercambios en células que crecían y eran manipuladas en total oscuridad, era apreciablemente más baja que cuando se empleaba algún tipo de iluminación.

En meristemas radicales de A. cepa, Schwartzman y col., (1979) (161) han analizado los ICH producidos por la luz visible en cromosomas con ADN bromosustituido, llegando a demostrar claramente que la inducción de ICH por la luz visible depende de la presencia de BrdUrd en el ADN y del momento del ciclo celular en el que se realice la iluminación.

El hecho de que la producción de intercambios por la luz visible es un proceso S-dependiente ya había sido demostrado previamente en células de mamíferos (Wolff, 1977) (193).

Agentes químicos.

El primer investigador que observó la inducción de ICH por mitomicina C (MMC) fué Latt (1974b) (100). El tratamiento de linfocitos humanos con 100ng/ml de MMC, rendía una frecuencia de ICH por célula de 62 a 112, lo cual representaba un incremento muy considerable sobre el control (12 ICH/célula). Sin embargo, el número de aberraciones cromosómicas (roturas cromosómicas o cromatídicas) se mantenían, a las concentraciones utilizadas a niveles muy bajos (alrededor de 0.07). Esto llevó a Latt a afirmar que la sensibilidad del test de los ICH era casi 100 veces mayor que la de los test clásicos de recuento de aberraciones cromosómicas como índice de daños en el ADN.

Actualmente, sin embargo, hay datos suficientes que indican que el mecanismo de formación de los ICH es diferente del de producción de aberraciones cromosómicas. Existen ciertos compuestos que pueden inducir ICH pero no aberraciones; mientras que otros que no inducen intercambios son potentes productores de aberraciones cromosómicas. La anilida hidroc্লórica puede ser una sustancia del primer grupo (Abe y Sasaki, 1977) (1) y la 8-etoxicafeina un ejemplo del segundo (Strobel y col., 1979; Kihlman, 1975) (176) (90).

Kato (1977b)(82) agrupó a los agentes químicos dentro de tres categorías, según su eficacia en inducir ICH o aberraciones cromosómicas. El 1^{er} grupo era denominado agentes tipo rayos X, es decir incluía

este grupo a todos los agentes con escasa capacidad de producir ICH, pero muy eficientes en la inducción de aberraciones. Kato incluyó a la cafeína, 8-etoxicafeína y al antibiótico bleomicina en este grupo. Los agentes que pertenecen al segundo grupo, agentes tipo luz UV, son capaces de inducir ICH muy eficientemente y de una manera moderada aberraciones cromosómicas. En este grupo se incluyen agentes intercalantes como la proflavina y el naranja de acridina y muchos agentes alquilantes como la MMC, mostaza nitrogenada, clorambucil, etc. Los agentes del tercer grupo son inhibidores metabólicos, tales como la 5-fluorodesoxiuridina, hidroxiaurea, timidina y cicloheximida. Estos últimos agentes ejercerían su acción sobre la producción de ICH de una manera indirecta.

El mecanismo molecular por el cual tiene lugar la formación de ICH inducidos por agentes químicos esta todavía poco claro.

Localización de los ICH en los cromosomas.

Si bien parece claro que la frecuencia de ICH en un cromosoma está relacionado directamente con su longitud en metafase (ó con su contenido en ADN) (Taylor, 1958; Latt, 1974a) (183) (99), el problema de la localización de dichos intercambios en los cromosomas es objeto de numerosas controversias.

La distribución inter- e intracromosómica de los ICH ha sido estudiada por muchos autores, tanto mediante técnicas autorradigráficas como por métodos de marcaje con BrdUrd. Contamos con datos relativos a la distribución de los intercambios espontáneos en alrededor de 20 especies. El problema de la localización de los ICH inducidos, también ha sido abordado en diversas especies animales y vegetales. Los mutágenos más comunmente utilizados para inducirlos han sido metilmetanosulfato (MMS), dimetilbenzantraceno (DMBA), trimetilbenzantraceno (TMBA), mitomicina C, hidrazida maleica (HM), alcohol etílico (EA) y la propia 5-Bromodeoxiuridina.

De acuerdo con Schubert y Rieger (1981) (156), las principales cuestiones a tener en cuenta son las siguientes: (1) los intercambios, ¿se distribuyen al azar, proporcionalmente a la longitud del cromosoma o hay una localización preferencial en algunas regiones determinadas?. (2) ¿ Es posible encontrar alguna correlación, positiva o negativa, entre la frecuencia de intercambios y la heterocromatina constitutiva?. (3) ¿ Existe coincidencia entre la distribución de los intercambios espontáneos e inducidos?.

Del análisis de los datos referentes a los modelos de distribución de los ICH espontáneos disponibles hasta ahora, no se puede reconocer ningún patrón general de distribución de los ICH en el cromosoma. Los resultados de distintas fuentes son, frecuentemente, contradictorios. Esto es así no sólo para los datos referentes a distintas especies, sino también, para los resultados obtenidos por diferentes autores en una especie en particular, sobre todo en cromosomas humanos.

Desde que Pardue y Gall (1970) (132), lograron teñir preferentemente con Giemsa ciertas zonas cromosómicas, que posteriormente fueron identificadas como zonas heterocromáticas, se vienen empleando los distintos métodos de bandeo cromosómico para poner de manifiesto la heterocromatina constitutiva en cromosomas metafásicos de distintas especies. Por heterocromatina constitutiva se entiende aquellas secuencias de ADN que permanecen condensadas, durante todo el ciclo celular, y no constienen genes estructurales, en contraposición con la eucromatina, que tiene la propiedad de condensarse en mitosis y descondensarse en interfase. El resultado típico de aplicar la técnica de bandeo C a cromosomas de mamíferos es la tinción preferencial con Giemsa de las constricciones primarias de todos los autosomas. En vegetales, sin embargo, es más frecuente que se detecten las bandas C en las regiones teloméricas de los cromosomas ó en una porción intersticial.

Aunque la conclusión de algunos investigadores es que no

existe relación alguna entre ICH y heterocromatina, es decir que no hay ni más ni menos intercambios que los que corresponden según la amplitud de las regiones heterocromáticas de los cromosomas (Vosa, 1976; Schubert y col., 1979 ; 1980; Ockey, 1980) (190) (154) (155) (124), la opinión de otros muchos es que los ICH no se localizan en el cromosoma de una manera aleatoria, sino que la incidencia es diferente según se trate de regiones heterocromáticas o eucromáticas.

Mientras que en cromosomas humanos (Schnedl y col., 1976) (151), *Mus musculus* (Lin y Alfi, 1976) (106) y de *Microtus agrestis* (Natarajan y Klásterská, 1975) (121) se ha propuesto que los intercambios ocurren preferentemente en la heterocromatina, una frecuencia más baja de la esperada, de acuerdo con su amplitud, ha sido observada en las regiones heterocromáticas de los cromosomas de *Indian muntjac* (Carrano y Wolff, 1975) (22), de rata canguro (Bostock y Christie, 1976) (15) Hamster chino y *Microtus montanus* (Hsu y Pathak, 1976) (73), *Allium cepa* (Schvartzman y Cortés, 1977) (157) y en otras especies, animales y vegetales.

Por otra parte, se ha descrito frecuentemente una alta producción de ICH en las zonas de unión entre eucromatina y heterocromatina (Carrano y Wolff, 1975; Bostock y Christie, 1976; Crossen y col., 1977; Dolfini, 1978; Friebe, 1978; Gatti y col., 1979; Kato, 1979; Cortés, 1980) (22) (14) (33) (39) (51) (54) (88) (29).

Finalmente, también han sido propuestas las regiones organizadoras nucleolares (NOR_s) como "puntos calientes" en la ocurrencia de ICH en *Vicia faba* (Schweizer, 1973; Schubert y col., 1979) (163) (154) y en Hamster chino (Ockey, 1980) (124).

Como regla general, las aberraciones cromosómicas inducidas por mutágenos no se distribuyen aleatoriamente en el cromosoma, sino que se dan más frecuentemente en algunas regiones del mismo. Especialmente el tratamiento con mutágenos de acción retardada (debido a que su actividad clastogénica es dependiente de la fase S del ciclo celular) resulta en una marcada agrupación de las aberraciones en determinadas regiones cromosómicas (Schubert y Rieger, 1977) (152).

Del conocimiento de los modelos de distribución de los ICH inducidos por mutágenos pueden derivarse resultados interesantes al compararlos con los de los espontáneos. Del mismo modo, dicha comparación establecida para las aberraciones cromosómicas en relación con los intercambios inducidos por los mismos agentes, podrían establecer diferencias o semejanzas en la naturaleza de ambos tipos de fenómenos (aberraciones e ICH).

Schubert y col. (1979) (154) encontraron, en meristemas radiculares de *Vicia faba* tratados con EA, HM o MMC que las aberraciones cromosómicas producidas por ellas se localizaban muy preferencialmente en las porciones del cromosoma que contenían heterocromatina. Los ICH inducidos por los mismos agentes se distribuían de la misma manera que lo hacían los intercambios espontáneos en este material, es decir, indistintamente a lo largo del cromosoma, excepto en la región NOR_s, donde se observaba un aumento significativo en la incidencia de ICH. La única diferencia con la distribución de los intercambios espontáneos fue una menor tendencia de las regiones NOR_s a mostrarse como sitios de localización preferencial de ICH, conforme aumentaba la frecuencia de intercambios por célula.

Los mismos autores utilizaron la luz UV de larga longitud de onda como agente potenciador de las aberraciones y de los intercambios, y pudieron estimar que las aberraciones cromatídicas inducidas por la luz UV se agrupaban en regiones de carácter heterocromático, mientras que los ICH observados después de la irradiación se distribuían de un modo similar a como lo hacían los inducidos por EA, HM o MMC; es decir, sólo se daban con mayor frecuencia de la esperada en las regiones NOR_s de los cromosomas que las poseen.

Los resultados en *Vicia faba* se pueden resumir diciendo que la localización de las aberraciones producidas por mutágenos no coinciden con la de los ICH inducidos por los mismos agentes químicos. Sin embargo, existe un alto grado de coincidencia entre los intercambios espontáneos e inducidos.

Ockey en 1980 (124) comparó la distribución de los intercambios espontáneos e inducidos por MMS en cromosomas de Hamster chino. Aunque en las células tratadas con MMS se triplicaba la frecuencia de ICH, su distribución era similar a la de los intercambios espontáneos. Resultados comparables en cuanto al modelo de distribución de los intercambios espontáneos e inducidos por MMS fueron encontrados también por Haglund y Zech (1979) (66) en linfocitos humanos. Por su parte, Latt (1974 a) (99) y Shiraishi y Sandberg (1978) (164), tampoco pudieron encontrar diferencias entre la distribución intracromosómica de los intercambios espontáneos e inducidos por MMS en linfocitos humanos, a pesar de que la frecuencia de ICH_s inducidos, fue casi 6 veces más alta que en los controles.

En base a estos datos, se puede hablar de que independientemente del mutágeno empleado y de las diferencias en la localización de los ICH_s de especie a especie, la distribución intercromosómica de los intercambios espontáneos e inducidos parece coincidir en gran medida.

Basándonos fundamentalmente en las diferencias observadas en cuanto a los modelos de distribución de los ICH inducidos y las aberraciones cromosómicas, resultantes de los experimentos en Vicia faba y empleando otros sistemas vegetales y animales, parece factible afirmar que las aberraciones cromosómicas y los intercambios se originan por mecanismos, al menos parcialmente, diferentes (Schubert y col., 1979) (154), si bien no se descarta totalmente que una pequeña porción de aquellas pudieran originarse como consecuencia de un intercambio incompleto, como ha sido postulado por Schubert y Meister (1979) (153).

ESTRUCTURA DE LA CROMATINA.

Debido fundamentalmente a la influencia de la citogenética de dípteros la idea de la naturaleza multifibrilar de la cromátida fue aceptada durante mucho tiempo. Este concepto de que una cromátida está compuesta por dos o más subcromátidas, podía ser útil para explicar algunas evidencias experimentales, por ejemplo el fenómeno de la "isomarcación". Sin embargo, Taylor y col. (1957) (158) ya suministraron la primera evidencia clara de que cada cromátida de cromosomas de organismos superiores está constituida por una y sólo una molécula de ADN (concepto unifibrilar). Esta idea y los hechos experimentales que la sustentan obtuvieron una amplia aceptación en años posteriores (Prescott, 1970; Comings y Okada, 1969) (142) (27). Muchos resultados obtenidos de experimentos sobre ICH_s son explicados más fácilmente considerando una cromátida como una larga doble hélice de ADN ininterrumpida (Latt, 1973) (98).

El cromosoma eucariótico está compuesto por ADN asociado con una cantidad aproximadamente igual de proteínas básicas o histonas y con una cantidad variable pero mayor de proteínas no histónicas. Tomando como ejemplo de célula diploide normal, un linfocito humano en G₂, se estima en un 15% el contenido en ADN, una proporción igual de histonas y al menos un 50% de proteínas no histónicas. El contenido restante incluye, la membrana nucleolar el nucleolo y otros ARN asociados a la cromatina aparte del nucleolar. Ha sido posible aislar e identificar 5 clases diferentes de proteínas histónicas. Hay tres grupos principales, que se establecen de acuerdo con su composición en aminoácidos: ricos en lisina, moderadamente ricos en lisina y ricos en arginina. La histona rica en lisina, denominada H1 se presenta en forma de octámero y es fácil de extraer de la cromatina. Existen dos fracciones de histonas moderadamente ricas en lisina: H2A y H2B y dos fracciones de histonas ricas en arginina: H3 y H4. Todas ellas han sufrido cambios mínimos a lo largo de la evolución. Su secuencia de aminoácidos es esencialmen-

te la misma en especies tan distintas como el guisante y la vaca (Elgin y col., 1971) (44) lo cual sugiere que la secuencia completa de estas proteínas interviene en su funcionalidad y que su función es virtualmente idéntica en todos los eucariontes. Esa función común en especies tan diferentes debe de ser, probablemente, estructural (Lewin, 1975)(104)

A partir de la observación de que las histonas moderadamente ricas en lisina H2A y H2B forman oligómeros y que las histonas ricas en arginina H3 y H4 se agrupan para formar tetrámeros, y que oligómeros y tetrámeros, en presencia de ADN, se agregan para formar lo que se llamó nucleosomas, Kornberg en 1974(95) sugirió que el nucleosoma era la unidad básica y repetitiva en la organización de la cromatina y que a cada nucleosoma le correspondían aproximadamente 200 pares de bases del ADN. A pesar de algunas diferencias en cuanto a forma y dimensiones, los experimentos realizados por diferentes autores parecen ser consistentes con la idea de que el nucleosoma es la unidad básica de la cromatina de eucariotas. Sus dimensiones aproximadas son de 70-125 Å, de forma discoidal o esférica y rodeado por casi dos vueltas de ADN, lo que representa unos 150-200 pares de bases. La porción de ADN internucleosomal tiene una longitud que varía entre 150-300 Å (Bahr, 1977)(3)

El papel aceptado para la histona H1 es el de inducir y estabilizar un nivel de organización superior al de nucleosomas para formar las fibras de cromatina. En ausencia de histonas H1, se puede observar los nucleosomas mediante el microscopio electrónico como cuentas de rosario ensartadas mediante filamentos de ADN (Oudet y col., 1975)(129)

En cuanto a las proteínas no histónicas, una parte importante de ellas esta formada por proteínas contráctiles. Proteínas tales como miosina, actina y tubulina constituyen el 38% de la fracción de proteínas no histónicas (Douvas y col., 1975) (40). Esto implica que los diversos movimientos de la cromatina, tales como la emigración hacia la membrana nucleolar o hacia el nucleolo, la condensación de los cromosomas y sus movimientos en mitosis y en meiosis, pueden ser, de algún modo, dependientes de la presencia de estas proteínas contráctiles. Muchas de las proteínas de la maquinaria enzimática nuclear pue-

den también pertenecer a esta fracción.

Actualmente, muchos autores consideran que las cromátidas de cromosomas mitóticos están constituidas, en último término, por una gruesa fibra de nucleoproteínas que, presumiblemente, adoptan una arquitectura helicoidal alrededor de un eje imaginario que recorre la cromátida de extremo a extremo. Esta fibra es denominada generalmente "cromonema", y tiene un diámetro aproximado de 0,5 μm . El principal problema que se plantea es saber cómo la doble hélice de ADN (20 Å de grosor) se organiza en el cromosoma eucariótico hasta llegar al nivel de organización de cromonema (5000 Å).

Tomando como ejemplo un fibroblasto de Hamster en G_2 , este contiene alrededor de 15pgr de ADN (Stubblefield y col., 1967) (178), que representa una doble hélice de Watson y Crick de una longitud de unos 4,5 metros. De los 22 cromosomas del complemento diploide, el mayor de ellos contiene un 10% del ADN total, lo cual quiere decir que en dicho cromosoma se hallan empaquetados 45 cm de doble hélice de ADN. Aunque existen varias observaciones citológicas al microscopio óptico acerca de la estructura del cromosoma, tanto en células vegetales como animales, así como estudios detallados de su estructura fina, a nivel molecular, existe aún hoy día un gran desconocimiento en cuanto a como relacionar estructuralmente al cromosoma con sus componentes moleculares y como cada cromosoma de una especie dada, adopta repetidamente su configuración particular en metafase, de generación en generación.

Como ya hemos indicado, cuando la cromatina se prepara en un medio tamponado de moderada fuerza iónica y se observa al microscopio electrónico, se muestra como una hebra de nucleosomas o nucleofilamentos que tienen un diámetro aproximado de 100 Å (Ris y Kubai, 1970; Finch y Klug, 1976) (146) (46). Cuando se incrementa la fuerza iónica del medio o cuando se observan cromosomas en metafase, las fibras adquieren un diámetro que oscila entre 200-300 Å (Pooley y col., 1974; Oudet y col., 1975; Finch y Klug, 1976) (141) (129) (46). Finch y Klug (1976) (46) observaron, en preparaciones obtenidas por tinción negati-

va, fibras de 300 Å que, cuando se sombreaban en la dirección adecuada, mostraban unas estriaciones que son típicas de una estructura helicoidal. También ellos, basándose en estudios sobre difracción de rayos X (Pardon y col., 1974) (131) y en estudios al microscopio electrónico del material fragmentado realizados por Davis y Haynes (1975) (36), propusieron el modelo del solenoide, en el cual la cadena de nucleosomas se condensa para formar una hélice compacta de 300 Å de diámetro exterior. Estudios realizados posteriormente mediante técnicas de difracción de neutrones (Carpenter y col., 1976) (21) y de dispersión de rayos láser en soluciones de cromatina (Campbell y col., 1978)(20) representaron nuevos soportes experimentales al modelo del solenoide de Finch y Klug. No obstante, ninguno de los datos que apoyan el modelo del solenoide es totalmente concluyente. Los resultados de Finch y Klug, basados en sus observaciones al microscopio electrónico, eran diferentes según que la histona H1 estuviese presente o cuando la misma era previamente extraída. En contraste, los patrones de difracción de rayos X no cambiaban significativamente cuando la histona H1 era extraída de la cromatina (Bradbury y col., 1972; Skidmore y col., 1973) (17) (166).

Renz y col. (1977) (144) demostraron que la unión de la histona H1 al ADN, hacía que los nucleofilamentos se plegasen en estructuras de orden más complejo. A alta fuerza iónica, Renz y colaboradores observaron objetos de 200 Å de diámetro, espaciados unos de otros a lo largo de la fibra de cromatina. A estas estructuras las denominaron "superbeads". Stratling, Müller y Zentgraf (1978) (175) también llegaron a conclusiones que sugieren que la cromatina se compone más bien de partículas globulares que de largas hélices o solenoides. Bajo condiciones cercanas a las fisiológicas, ellos observaron partículas de 230 Å de diámetro. Cuando usaron nucleasas para digerir parcialmente la cromatina y separaron el material en gradientes de sacarosa, la sedimentación resultante mostraba que los productos de la digestión eran partículas discretas, de tamaño constante, y que abarcaban el 75% del ADN nuclear.

de la cromatina de células de hígado de rata. El número medio de nucleosomas por "partícula" fue estimado en 16. También ellos describieron que la histona H1 estaba asociada con esas partículas, y pensaban que debían de ser un componente esencial en el mantenimiento de su estructura.

En resumen, parece que existe una organización regular en la cromatina, aunque su naturaleza no sea conocida, ya que no hay observaciones directas que lo confirmen. Liley y Pardon (1979) (105) comentan que la no visualización de regiones amplias de cromatina con una estructura regular, puede bien reflejar la ignorancia que se posee sobre cuál es la forma más adecuada de preparar la cromatina, sin alterar su estructura o, por el contrario, bien pudiera ser el resultado de la ausencia de una estructura ordenada en el núcleo.

Bak, Zeuthen y Crick (1977) (5) han examinado cromosomas mitóticos de ratón, humanos y de *Drosophila*, los cuales parecían estar constituidos por estructuras tubulares de 4000 Å de diámetro externo. Las paredes que forman el tubo, tenían un grosor de 300 Å, lo cual coincide con el grosor esperado del solenoide de Finch y Klung.

Otra de las formas propuestas de la organización de la cromatina dentro del cromosoma interfásico es la formación de lazos o bucles de ADN a partir de un núcleo compacto central. Igo-Kemenes y Zachau (1978) (75), usando nucleasas de restricción, llegaron a fijar el tamaño medio del bucle en células de hígado de rata en 34000 pares de nucleótidos, estando los más grandes formados por 75000 pares de nucleótidos. Benyajati y Worcel (1976) (13) lo habían estimado en 85000 pares de nucleótidos como tamaño medio en *Drosophila* y Pinon y Salts (1977) habían descubierto estructuras similares en cromosomas de levaduras. (140)

Adolph, Cheng y Laemmli (1977) (2) mediante procedimientos bioquímicos y Paulson y Laemmli a través de observaciones al microscopio electrónico, llegaron a la conclusión de que las proteínas no histónicas deben de jugar un papel importante en el proceso de plegamiento

to de la fibra fundamental (ADN-histonas), para formar estructuras de orden superior. Sus resultados demuestran la presencia de un "scaffold" o armazón de proteínas no histónicas dentro del cromosoma metafásico, que hace que se mantenga, en cierto modo, la morfología del cromosoma después de extraer las proteínas histónicas. Alrededor de este "scaffold" existiría un halo de ADN, el cual se visualiza, mediante microscopía electrónica, constituido por numerosos lazos o bucles de ADN anclados sobre éste centro proteico. Sin embargo, actualmente se pone en duda la existencia de un "scaffold" proteico en el cromosoma y se ha descrito posteriormente como un artefacto, resultante de la dispersión incompleta de la cromatina central y agregación de las proteínas no histónicas con los cromosomas privados de histonas (Okada y Comings, 1980) (125).

En resumen, los estudios realizados hasta ahora sobre la estructura íntima de la cromatina por los distintos autores, únicamente han podido revelar de una manera inequívoca que el cromosoma está constituido por fibras elementales de 200-300 Å de grosor, compuestas por ADN e histonas. La organización de éstas fibras para constituir una estructura de orden superior en el cromosoma eucariótico no es ni regular ni periódica.

MATERIAL Y METODOS.

1.- Material utilizado.

Como material de trabajo se han empleado meristemas radicales de *Allium cepa* L. de la variedad denominada "francesa" ($2n=16$). Se emplearon siempre bulbos de tamaño semejante con un peso aproximado de 20-40 gramos cada uno.

2.- Condiciones generales de cultivo.

Con objeto de eliminar al máximo las variables ambientales que pudiesen influir en el desarrollo de las células meristemáticas (tales como temperatura, aireación, luz, etc...), los bulbos se cultivaron en tubos de vidrio cilíndricos, con una capacidad aproximada de 70 cc., con agua corriente filtrada mediante un depurador de agua Braun y renovada cada 24 horas.

El nivel de oxígeno en el agua se mantuvo mediante un burbu-

jeo continuo de aire a razón de 10-20 cc., por minuto, utilizando para ello una bomba de acuario Rena Super. El aire era previamente saturado de humedad, haciéndolo pasar por un frasco lavador de gases conteniendo agua destilada.

Todo el sistema de cultivo se mantuvo en la oscuridad en el interior de una cabina Refritherm Struers regulada a 25°C, con una variación aproximada de $\pm 0.5^\circ\text{C}$.

Los bulbos se colocaron de manera que sólo sus bases permanecían sumergidas en el agua.

3.- TRATAMIENTOS:

Todos los tratamientos efectuados empezaron una vez que las raíces habían alcanzado una longitud de 15-25 mm. en los recipientes de cultivo. Los bulbos eran entonces trasladados a otros recipientes que contenían las drogas disueltas a las concentraciones específicas en cada caso.

Las condiciones ambientales en las que se realizaron los experimentos fueron las mismas que habían sido mantenidas durante el crecimiento de las raíces.

3.1.- Tratamientos con Bromodesoxiuridina (BrdUrd):

Con objeto de conseguir la incorporación de la 5-bromodesoxiuridina en el ADN en el lugar de la timidina endógena, los bulbos fueron tratados, durante sólo uno, dos ó tres ciclos celulares consecutivos, con 10^{-4}M de 5-bromo-2'-deoxiurina (Sigma) en agua filtrada. En algunos casos, la incorporación de BrdUrd en el ADN fué facilitada, por la inhibición de la síntesis endógena de ácido timidílico, adicionado a la solución anterior 10^{-7}M de 5-Fluorodeoxiuridina (Serva). Cuando el tratamiento con BrdUrd se efectuó durante más de un ciclo de replicación, la solución que contenía BrdUrd fué renovada en cada uno.

En todos los tratamientos en los que se empleó BrdUrd, los tubos de vidrio que contenían las soluciones, así como los bulbos, fueron cubiertos con papel de aluminio con objeto de evitar la exposición de las raíces a la luz y la consiguiente fotólisis del ADN-bromosustituído.

3.2.- Tratamiento con Timidina (dT):

En aquellos experimentos en los que interesaba que el ADN de las células meristemáticas efectuasen una ronda de replicación en presencia de timidina normal, después de realizar una ronda anterior en presencia de BrdUrd, se preparó la timidina a una concentración de 10^{-4} M en agua filtrada.

Por otra parte, cuando el objeto era probar el efecto de la timidina en sí misma, sobre la frecuencia de intercambios, ésta fue preparada a diferentes concentraciones, bien disueltas en la misma solución que contenía 10^{-4} M de BrdUrd, bien en agua filtrada, según el propósito del experimento.

En todos los casos, los tubos de vidrio que contenían las distintas soluciones y los bulbos permanecieron cubiertos con papel de aluminio durante el tiempo previsto para que las células desarrollasen un ciclo de replicación en presencia de timidina.

3.3.- Tratamiento con Uridina (Urd):

Para ver si la frecuencia de intercambios entre cromátidas hermanas podía verse alterada por un tratamiento con Uridina (Sigma) se suministró ésta junto con bromodeoxiuridina durante dos ciclos de replicación consecutivos, en agua filtrada.

Las concentraciones de uridina utilizadas fueron 10^{-5} M, 10^{-4} M y 10^{-3} M.

3.4.- Tratamiento con Fluorodesoxiuridina (FdU):

En los experimentos en los que interesaba variar las concentraciones de fluorodesoxiuridina, ésta fué preparada y suministrada a los bulbos junto con TdR, BrdUrd ó sólo en agua filtrada, según el experimento diseñado. Las concentraciones de FdU utilizadas variaban entre 10^{-8} M y 10^{-6} M. La duración mínima del tratamiento con FdU fué, a cada concentración, el tiempo necesario para que transcurriese un ciclo celular completo. Cuando el tratamiento se deseaba prolongar a más de un ciclo de replicación, la solución que contenía FdU fué renovada periódicamente.

Del mismo modo que hemos descrito anteriormente, en los experimentos en los que se utilizó FdU los bulbos y las raicillas fueron cuidadosamente protegidos de la luz.

3.5.- Tratamiento con 5-Aminouracilo (5-AU):

Se empleó 5-AU (Sigma) a concentraciones de 0.5 mM, preparado con agua filtrada en el momento de ser utilizado. La duración del tratamiento fué de 18 horas. En todos los casos en que se utilizó 5-AU se hizo conjuntamente con BrdUrd. Las raíces se lavaron en 5-AU mediante dos cambios de agua espaciados entre sí al menos 5 minutos.

3.6.- Tratamiento con Cafeína:

Con objeto de marcar una población de células meristemáticas espontáneamente sincrónicas como células binucleadas, se empleó un tratamiento con cafeína (Serva) a una concentración de 5 mM, durante 1 hora.

3.7.- Tratamiento con Colchicina:

Para lograr acumular células meristemáticas en C-metafase y poder individualizar los diferentes cromosomas, se empleó colchicina (Sigma) como agente inhibidor de la anafase. El tratamiento con esta droga se realizó durante 3 horas a una concentración de 0.05% en agua filtrada, y manteniendo la aireación constante.

Durante el tratamiento con colchicina los tubos de vidrio permanecieron protegidos de la luz.

3.8.- Tratamiento con 8-Oxiquinoleina:

Esta droga se utilizó con el mismo objetivo que la anterior pero para obtener cromosomas metafásicos con un menor grado de contracción.

Este tratamiento se efectuó durante 4 horas, a una concentración de 2mM y sin aireación.

4.- Fijaciones:

Las fijaciones se realizaron sacando los bulbos de los recipientes de cultivo y cortando, con la ayuda de unas pinzas de puntas curvas, un número determinado de raíces a 30-40 mm. del ápice. Las raíces eran entonces inmediatamente trasladadas a tubos de fijación debidamente etiquetados conteniendo la solución de fijador. Se empleó como fijador la mezcla de Carnoy I: etanol absoluto-ácido acético glacial en una proporción de 3:1. El tiempo de fijación fué de al menos 12 horas a una temperatura de 4°C.

Se procuró elegir siempre raíces de tamaño medio y sin anomalías morfológicas visibles.

5.- Preparación de los portaobjetos:

Los portaobjetos a utilizar en nuestro estudio debían ser gelatinados, para lo cual es imprescindible que estén limpios y exentos de grasa.

Para limpiar perfectamente los portaobjetos es necesario sumergirlos en una solución preparada del siguiente modo:

$\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2$100 gr.
 SO_4H_2100 cc.
 H_2O800 cc.

En primer lugar el $\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2$ debe disolverse en agua, añadiendo luego el SO_4H_2 lentamente a la solución fría y agitando constantemente. A continuación se enjuagan los portaobjetos en agua destilada durante varias horas. Una vez secos se sumergen durante 1 minuto y a 20-22°C en una solución de la siguiente composición:

Gelatina (Merck).....5.0 gr.
Alumbre de cromo.....0.5 gr.
Agua destilada.....1000 cc.

Para acelerar la disolución de la gelatina es recomendable realizarla a una temperatura de 40-50°C. Finalmente los portaobjetos gelatinados se dejan secar al aire.

6.- Maceración. Técnica de la pectinasa:

Con objeto de someter a una digestión enzimática las paredes celulares de las células vegetales, las raíces previamente fijadas se colocaron en recipientes de 25 cc. de capacidad conteniendo una solución de pectinasa (Sigma, de *Aspergillus niger*) disuelta a una concentración del 0.5% en tampón cítrico-citrato (ácido cítrico al 4.2% y citrato sódico al 5.9%) ajustado a un pH de 4.2 (61 cc. de la solución de ácido cítrico y 39 cc. de la solución de citrato sódico). La macera-

ción se levó a cabo durante 45-60 minutos a 37°C.

7.- Aplastamientos:

Se trasladaron las raíces previamente fijadas a un vidrio de reloj con ácido acético glacial 45% para posteriormente llevar a cabo el aplastamiento sobre portaobjetos gelatinados. Para ello se tomaron las raíces enteras del vidrio de reloj y se depositan en los portaobjetos, que a su vez están situados sobre una superficie oscura. Mediante una lanceta se separa la zona correspondiente al meristemo apical, desechando el resto de la raíz. Seguidamente se coloca sobre el ápice una gota de ácido acético al 45% y se cubre con el cubreobjetos de 22 X 22 mm. Con la punta afilada de un lápiz se golpea entonces sucesivamente sobre el cubreobjetos describiendo con los golpes una espiral desde el centro a la periferia procurando obtener un buen extendido de todo el material. A continuación se coloca sobre el cubreobjetos una tira de papel de filtro absorbente y se presiona sobre el mismo con el dedo pulgar, procurando que la fuerza aplicada sea normal a la superficie, para evitar desplazamientos laterales del cubreobjetos sobre el portaobjetos. De esta manera se consigue que todas las células del meristemo queden distribuidas en un sólo plano, lo que permitirá un buen enfoque incluso a grandes aumentos.

8.- Desprendimiento de los cubreobjetos:

Para desprender los cubreobjetos de los portaobjetos se utiliza la técnica de Conger y Fairchild(1953) (28).

Se colocan las preparaciones sobre nieve carbónica extendida y prensada en una caja de tergapore para evitar una sublimación rápida. Los portaobjetos se colocan, con la preparación en la parte superior durante 5 minutos aproximadamente. Una vez congelados, se separa el cubreobjetos del portaobjetos con la ayuda de una hoja de un bisturí.

De esta forma se consigue que el material quede adherido a la superficie del portaobjetos.

9.- TECNICAS DE TINCION

9.1.- Técnicas para tinción diferencial del ADN bromosustituído.

Para conseguir la tinción diferencial del ADN bromosustituído se empleó la técnica de tinción FPG ("fluorescencia plus Giemsa") (Perry y Wolff, 1974) (137), modificada para nuestro material de trabajo por Schwartzman y Cortés (1977) (157) y por González-Gil y Navarrete (1982) (58).

Con las raíces fijadas se procedió del siguiente modo:

1.- Las raíces se lavan en tampón cítrico-citrato ajustado a pH 4,2.

El tampón se preparó del siguiente modo:

Solución A.....Acido cítrico al 4.2% en agua destilada.

Solución B.....Citrato sódico al 5.9% en agua destilada.

Para obtener un pH de 4.2 se mezclan 61 cc. de la solución A y 39 cc. de la solución B.

2.- Seguidamente se procede a realizar la maceración de las raíces en pectinasa, disuelta al 0.5% en el mismo tampón, en vasos de precipitado de 25 cc., colocándolos en una estufa a 37°C durante 1 hora.

3.- A continuación se realiza el aplastamiento de las raíces en una solución de ácido acético al 45% sobre los portaobjetos gelatinados.

4.- Una vez aplastado el material, se procede a levantar los cubreobjetos, para lo cual se emplea la técnica de Conger y Fairchild, descrita anteriormente. A continuación se hidratan los extendidos pasándolos por una serie de vasos Coplin conteniendo etanol a concentraciones decrecientes (100%; 96%; 70% 50%; 30% y agua destilada).

5.- Seguidamente se colocan sobre las preparaciones una gota de una

solución de Ribonucleasa A (Sigma, de páncreas bovino), se coloca encima un cubreobjetos y se incuban a 25°C durante 2 horas, manteniéndolos en cámara húmeda.

La solución de Ribonucleasa A se preparó disolviendo 1 mg de ésta en 10 cc. de SSC X 0.5.

La solución salina citrato (SSC) se prepara a una concentración 10 X del siguiente modo:

Cloruro sódico.....8.7675 gr.

Citrato sódico..... 5.3567 gr.

Agua destilada.....100 cc.

6.- A continuación se retiran los cubreobjetos y se lavan las preparaciones durante unos minutos en SSC X 0.5.

7.- El siguiente paso consiste en tratar las preparaciones con el fluorocromo Hoechst 33258 (Riedel-De Haenag Seelze-Hannover) a temperatura ambiente (20-21°C) durante 20-30 minutos.

La solución de Hoechst 33258 se prepara disolviendo 1 mgr. del producto puro en 1 cc. de alcohol etílico, agitando constantemente. Luego se mezclan 0.2 cc. de esta solución con 100 cc. de SSC X 0.5.

8.- Luego se lavan las preparaciones en SSC X 0.5 y se sumergen en un baño de esta misma solución. En estas condiciones se exponen los preparados durante 1 hora a una irradiación procedente de una lámpara Westinghouse Fs20 emitiendo en 280-313 nm. de longitud de onda, colocada a una distancia de 10 cm.

9.- A continuación se incuban los preparados en SSC X 0.5 a 55°C durante una hora.

10.- Terminada esta incubación se lavan las preparaciones en tampón de fosfato "Sörensen" ajustado a un pH de 6.8 y se tiñen con Giemsa (Merck, Darmstadt) disuelto al 3% en el mismo tampón durante 7-10 minutos.

El tampón de fosfato "Sörensen" se preparó del siguiente modo:

Solución A : Fosfato monopotásico.....9.08 gr./l.

Solución B : Fosfato disódico.....11.88 gr./l.

Para un ajuste del pH al 6.8 se toman 50.8 cc. de la solución A y 49.2 cc. de la solución B, por cada 100 cc.

11.- Después de efectuar un lavado rápido en el mismo tampón a pH 6.8, se dejan secar las preparaciones. Entonces, después de pasarlas por xileno, se les pone una gota de resina DPX y se les cubre con un cubreobjetos, dejándolas secar durante 24 horas a temperatura ambiente.

La principal innovación introducida a la técnica por González-Gil y Navarrete (1982) (58) consiste en sustituir la degradación enzimática del ARN mediante Ribonucleasa por una digestión química con ácido clorhídrico. Dicha digestión es efectuada después del periodo de incubación en SSC X 0.5 e inmediatamente antes de teñir con Giemsa. La concentración de ClH utilizada es de 5N y la duración del tratamiento 15 minutos a 20°C. Es necesario lavar muy bien las preparaciones mediante dos o tres pasos por agua destilada antes de teñir con Giemsa.

9.2.- Tinción con orceína acético-clorhídrico:

La solución de orceína acético clorhídrico se preparó de la siguiente manera: para 100 cc. de colorante, se añaden 45 cc. de ácido acético glacial a 2 gr. de orceína (Merck Darmstadt) en un destilador a reflujo y se lleva a ebullición, estado en el cual permanece 10 minutos. A continuación se deja enfriar a temperatura ambiente y se añade agua destilada hasta completar de nuevo 100 cc. De esta forma la solución de orceína queda preparada a una concentración del 2%. La solución de trabajo se obtiene filtrando ésta solución madre y añadiendo por cada 9 partes de la misma una parte de ácido clorhídrico 1N.

El aplastamiento y tinción simultánea se realizó de la siguiente manera: Las raíces previamente fijadas, se colocan en un vi-

drio de reloj con una solución de orceína acético-clorhídrico, de tal forma que queden totalmente cubiertos por el colorante. A continuación se calienta el vidrio de reloj a la llama de un mechero de alcohol sujetándolo con unas pinzas espatuladas y girándolo suavemente alrededor de la llama hasta alcanzar una temperatura de unos 50°C aproximadamente. El control de la temperatura se lleva a cabo normalmente apoyando el vidrio de reloj sobre el dorso de la mano.

Luego se deja en reposo hasta que se enfríe y se repite esta operación 2 veces más. Finalmente se deja enfriar en reposo a temperatura ambiente durante 15 ó 20 minutos antes de realizar el aplastamiento sobre portaobjetos tal como se describió anteriormente.

Una vez obtenidas las preparaciones y levantados los cubreobjetos mediante nieve carbónica se procede a su deshidratación mediante pasos sucesivos por alcoholes de concentraciones crecientes.

Por último las preparaciones son puestas en definitivo.

9.3.- Técnica para la detección de bandas C :

Los bulbos que crecían en agua filtrada en la cámara de cultivo fueron tratados con colchicina ó con 8-oxiquinoleína para obtener cromosomas c-mitóticos. Una vez fijadas las raíces se procedió a su aplastamiento sobre portaobjetos gelatinados, después los cubreobjetos utilizados en el aplastamiento fueron levantados y los preparados hidratados haciéndolos pasar por una serie de alcoholes de concentraciones decrecientes (absoluto, 96°C, 70°C, 50°C, 30°C y agua destilada). Las preparaciones obtenidas de este modo fueron sometidas a una breve digestión en ácido clorhídrico 1N (7-10 minutos) a temperatura ambiente. Una vez lavadas se trataron con hidróxido bórico al 5% a 50°C durante otros 10 minutos. La solución de hidróxido bórico ha de ser filtrada inmediatamente antes de su uso. Después de varios lavados en agua destilada, las preparaciones fueron incubadas en solución salina citrato SSC X 2 a 50°C durante 1 hora. La solución salina citrato

se preparó a partir de una solución madre SSC X 10 obtenida como ya se ha indicado anteriormente. Finalmente las preparaciones fueron teñidas con Giemsa al 3% en tampón Sörensen a pH 6.8 durante 7-10 minutos y posteriormente puestas en definitivo.

9.4.- Técnicas para la detección de bandas N:

Las técnicas de bandeo N pone de manifiesto las regiones organizadoras nucleolares activas de los cromosomas que las poseen y consiste básicamente en tratar las preparaciones realizadas, a altas temperaturas (90-93°C), con tampón fosfato Sörensen ajustado a pH 6.8 durante 10 minutos. Posteriormente se sumergen en el mismo tampón a temperatura ambiente y se tiñen con Giemsa disuelto al 3% en el mismo tampón.

9.5.- Técnica de bandeo C-modificado:

Esta técnica consiste en incubar las preparaciones en SSC X 0.5 durante 1 hora a 50°C para después someterlas a una hidrólisis con ácido clorhídrico 5N durante 15 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se trasladan las preparaciones a un vaso coplin que contiene una solución de tampón de fosfato Sörensen a pH 6.8 y se dejan envejecer durante 24-48 horas. Transcurrido este tiempo se tiñen con Giemsa al 5% disuelto en el mismo tampón y al mismo pH, durante 25-45 minutos.

10.- Cálculo del número de ICH por cromosoma:

Dado que todos los cromosomas de *Allium cepa* son muy parecidos entre sí excepto el par de cromosomas subtelocéntricos satelizados (par 7) y que poseen un tamaño y cantidad de ADN semejantes, se ha preferido calcular el número medio de ICH por cromosoma (y no por cé-

lula) y utilizar este valor como parámetro en el análisis de los resultados.

11.- Cálculo del índice mitótico:

Se determinó el número de células que se encontraban en cualquiera de las fases de la mitosis de un total de aproximadamente 1000 células meristemáticas. Para realizar el cálculo del IM se aplicó la siguiente fórmula:

$$IM = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de células en mitosis.}}{\text{n}^{\circ} \text{ total de células}} \times 100$$

12.- Tratamientos estadísticos:

Con objeto de determinar si las diferencias observadas en las medias de los ICH por cromosoma obtenidas en distintos experimentos eran estadísticamente significativos se empleó el test estadístico Z.

En otras ocasiones la comprobación se estableció mediante una t de Student. Los resultados se expresan a un nivel de significación que se especifica en cada caso.

Asimismo, los datos referidos a las medias aritméticas en cada experimento se dan con el error estandar de la media (E.E.).

13.- Micrografías:

Los estudios microscópicos, así como las micrografías, se realizaron empleando un fotomicroscopio Reichert Jung Microstar 110 y un fotomicroscopio Zeiss AXIOMAT.

Se emplearon películas Kodak de blanco y negro de una sensibilidad de 9 ó 21 DIN, y fueron revelados con revelador Kodak H110 ó Metatenal y fijadas con fijador ultrarápido de Kodak. Las ampliaciones fueron realizadas mediante una ampliadora Dust Da 900, empleando papeles fotográficos de Negtory de Kodak suave, normal y duro.

RESULTADOS.

1. CONTRIBUCION DE LA TIMIDINA, URIDINA Y FLUORODESOXIURIDINA A LA PRODUCCION DE INTERCAMBIOS ENTRE CROMATIDAS.

La sustitución en el ADN de la timidina por su análogo halogenado 5-Bromodesoxiuridina (BrdUrd) es indispensable para obtener tinción diferencial entre las cromátidas hermanas de los cromosomas y por lo tanto para observar los ICH_s (Latt, 1973; Perry y Wolff, 1974) (99) (137). Sin embargo, es sabido que el BrdUrd por si mismo, puede inducir intercambios (Kato, 1974a; Latt, 1974b; Wolff y Perry, 1974; Mazrimas y Stetka, 1978; Schwartzman y col., 1979; Davidson y col. 1980) (81) (100) (196) (114) (161) (35). Este hecho ha llevado a cuestionar la existencia de intercambios espontáneos en la Naturaleza, y se han llevado a cabo estudios encaminados a determinar cuál es la frecuencia con la que se producen, independientemente del BrdUrd utilizado para detectarlos. No es la BrdUrd la única sustancia química empleada en los pretratamientos para obtener tinción diferencial de las cromátidas después de aplicar la metodología FPG, sino que también

otros compuestos son utilizados, solos o en combinación con la BrdUrd, con objeto de conseguir o mejorar dicha tinción diferencial. Entre ellos se encuentran nucleósidos tales como la timidina, uridina y fluorodesoxiuridina.

Cuando a una célula se le permite desarrollar dos periodos de síntesis de ADN incorporando, en lugar de la timidina normal, su análogo halogenado BrdUrd, sus cromosomas en la segunda mitosis después de la incorporación están constituidos por 3 cadenas polirribonucleótídicas sustituidas con el análogo y una cadena nativa, de acuerdo con la segregación semiconservativa del ADN cromosómico, pudiéndose establecer diferencias en cuanto a tinción entre una cromátida bisustituída (que se tiñe menos intensamente) y otra cromátida monosustituída (teñida más intensamente con Giemsa), después de aplicar la técnica FPG (cromosomas TB-BB) (Fig. 1). Sin embargo otro método alternativo de obtener los mismos resultados, consiste en permitir la incorporación de BrdUrd en el ADN sólo durante 1 periodo de síntesis de ADN, seguido de un 2º periodo en el cual tiene lugar la incorporación del nucleósido normal: la timidina. En este caso la diferenciación puede establecerse entre una cromátida monosustituída y otra cromátida no sustituída, siendo estos cromosomas de constitución TB-TT ((Fig. 2). En este caso además de poder discutir los resultados obtenidos, en cuanto a la frecuencia de ICH_s en comparación con los que se obtienen aplicando la primera metodología, dado sus diferencias cuantitativas referentes a la cantidad de BrdUrd incorporado en el ADN cromosómico, podría evaluarse el efecto de la propia timidina sobre la producción de ICH_s cuando esta se emplea, a diferentes concentraciones, durante el segundo ciclo de replicación del ADN.

Es conocido que la fluorodesoxiuridina (FdU) es un inhibidor de la timidilato sintetasa, enzima que cataliza la metilación del ácido desoxiuridílico (dUMP) a ácido timidílico (dTMP) (Santi y McHenry, 1972; Belisario y col., 1976) (149) (11), causando por ello un bloqueo en la síntesis "de novo" de ácido timidílico. Por esta razón

la FdU se ha venido utilizando en muchos casos para estimular la incorporación de BrdUrd, en lugar de la timidina, en el ADN cromosómico sobre todo en células vegetales (Kihlman y Kronborg, 1975; Schwartman y Cortés, 1977; Schubert y col., 1979) (91) (157) (154), en las que la BrdUrd no se incorpora en el ADN tan fácilmente como en células animales (Haut y Taylor, 1967) (69).

La Uridina (Urd) se ha empleado también, junto con BrdUrd y FdU con objeto de prevenir una posible inhibición en la síntesis de ARN por parte de la FdU, como fué propuesto en 1975 por Kihlman y Kronborg (91). Así por ejemplo, los cromosomas de *Vicia faba* eran tratados con 100 μM de BrdUrd en combinación con 0.1 μM de FdU y 5 μM de Urd (Kihlman y Kronborg, 1975) (91), mientras que los cromosomas de *Allium cepa* lo eran con 100 μM de BrdUrd en combinación con 0.1 μM de FdU y Uridina a una concentración de 1 μM (Schwartzman y Cortés, 1977) (157).

En la actualidad es bien sabido que los ICH pueden ser inducidos al ser tratadas las células con diferentes agentes químicos que dañan o modifican directamente el ADN (Latt y col., 1981) (101). Sin embargo, como resultado de un experimento en el que los ICH inducidos por BrdUrd eran revertidos por la administración de desoxicitidina (dC), Davison y col. (1980) (35), sugirieron que los intercambios podían ser también inducidos por una perturbación metabólica. Del mismo modo, Suzuki y Yosida (1983) (180) han manifestado que la administración de cantidades altas de desoxirribonucleótidos puede acarrear desórdenes en el metabolismo de esos desoxirribonucleótidos que sean el origen de al menos parte de los ICH inducidos.

Por todo lo anterior, nosotros consideramos interesante establecer si estas sustancias (timidina, uridina y fluorodesoxiuridina) tienen algún efecto sobre la frecuencia de ICH detectada en los cromosomas de *Allium cepa*, independientemente de la concentración de BrdUrd utilizada.

1.1 TIMIDINA

El posible papel que puede tener la Timidina sobre la frecuencia de ICH_s observada cuando este nucleosido se emplea durante la segunda ronda de replicación del ADN para obtener tinción diferencial de las cromátidas permanece actualmente sin clarificar, ya que los resultados provenientes de distintas fuentes han sido contradictorios. Mientras que algunos autores afirman no haber podido incrementar la tasa de producción de ICH_s aún utilizando concentraciones de Timidina muy altas (Davidson y col., 1980; Wilmer y Natarajan, 1981) (35) (192), otro ha observado un incremento en las frecuencias de intercambios, inducidos por dT, dependientes de la dosis utilizando un rango de concentraciones más reducido (Perry, 1983)(139)

Existen dos maneras posibles de tratar las células con dT con objeto de someter este nucleosido a test y obtener cromosomas de la segunda mitosis con tinción diferencial. La primera sería mediante un tratamiento simultáneo con la BrdUrd durante dos ciclos celulares consecutivos para obtener finalmente cromosomas TB-BB y la segunda metodología consiste en tratar con dT, a diferentes concentraciones sólo durante el segundo ciclo celular, después de la incorporación de BrdUrd durante el primero. Nosotros hemos seguido este último procedimiento, de manera que hemos estudiado los intercambios en cromosomas TB-TT, con objeto de que los resultados no se vean afectados por la presumible competencia entre los dos nucleosidos por incorporarse en el ADN y evitar así la variabilidad en los datos debido a una mayor o menor incorporación de BrdUrd al variar las concentraciones de dT.

En la Tabla 1 puede observarse que aunque la concentración de dT se elevó hasta concentraciones relativamente altas (10^{-2} M) no tuvo efecto alguno sobre la frecuencia de intercambios detectados después de dicho tratamiento, de manera que la tasa de intercambios se mantuvo a unos niveles muy semejantes a la obtenida en ausencia total del nucleosido. Hay que decir que las distintas concentraciones de

dT que figuran en la Tabla 1 se refieren a la dT adicionada al medio de cultivo en el cual estaban creciendo las células meristemáticas, mientras que en el caso en el que no se suplementó el medio con dT es de esperar que las células incorporen en el ADN la propia timidina endógena celular, ya que en ningún caso se empleó la FdU. Debido al planteamiento elegido, el tratamiento con dT tendría que ser siempre efectuado en el segundo ciclo de replicación, inmediatamente antes de inducir la acumulación de cromosomas metafásicos. Esto implicaba que un efecto retardado de la dT, es decir, a largo plazo no podría evidenciarse. Para obviar este problema sometimos raíces que habían alcanzado un crecimiento suficiente, a un pretratamiento en una solución de 10^{-2} M de dT en agua filtrada durante 30 horas, y después se permitió que incorporasen BrdUrd durante el tiempo equivalente a dos rondas de replicación. La media de ICH/cromosoma observada no fue estadísticamente diferente de la que obtuvimos en ausencia de dicho tratamiento previo, no pudiéndose demostrar tampoco ahora ningún efecto en cuanto a elevar la frecuencia de ICH, en células expuestas a concentraciones altas de Timidina.

También hemos observado una ralentización en la cinética de proliferación celular después de tratar los meristemas con altas concentraciones de dT. Los intentos por medir la duración de la interfase en presencia de 10^{-2} M de dT mediante el mercado de una subpoblación celular meristemática como células binucleadas inducidas por un tratamiento previo con cafeína resultaron infructuosos, ya que la actividad mitótica de la población binucleada decae totalmente con el tratamiento, debido probablemente, a una potenciación del efecto de 10^{-2} M de dT sobre la proliferación celular, por parte de la cafeína. Sin embargo nos es posible estimar la duración media del ciclo celular de las células meristemáticas como el tiempo mínimo necesario que han de permanecer las células creciendo en un medio con BrdUrd ó con dT para obtener la tinción diferencial de sus cromátidas. Cuando las células crecen en BrdUrd o en 10^{-4} M de dT ese tiempo estimado es de 20 horas por ciclo. El retraso de la cinética de proliferación celular causado

por 10^{-2} M de dT fue evidente, ya que fue necesario alargar la duración del segundo ciclo de replicación, en 10^{-2} M de dT, hasta un tiempo medio de aproximadamente 30 horas.

Esta lentitud en la proliferación celular no fue acompañada, sin embargo, por una mayor tasa de producción de ICH, como hemos señalado anteriormente.

1.2. URIDINA

Con objeto de analizar un posible efecto por parte de la Urd en la producción de los ICH_s, tratamos las células con concentraciones crecientes del nucleósido, simultáneamente con BrdUrd durante dos ciclos celulares consecutivos y los resultados se presentan en la Tabla 1. Como puede verse, la media de intercambios por cromosoma en ausencia de uridina fue de 3.6 y la Urd, a ninguna de las concentraciones ensayadas, fue capaz de elevar la tasa de ICH por encima de dicho valor control. Por el contrario la frecuencia de intercambios obtenida con este nucleósido fue menor que en el control en todos los experimentos. Para determinar si esta disminución de la tasa de ICH observada como resultado de tratar con Urd era significativa comparamos la media de intercambios por cromosoma obtenida en cada experimento con el valor obtenido con BrdUrd sólo, mediante una t-Student. En todos los casos la diferencia resultó ser estadísticamente significativa ($P < 0.01$).

1.3 FLUORODESOXIURIDINA

Si bien, como hemos mencionado anteriormente, la FdU facilita la incorporación de BrdUrd en el ADN, y por ello ha sido empleada por diferentes autores para asegurar un nivel de incorporación suficiente para una óptima detección de los intercambios en células vegetales; las mejoras introducidas en la técnica FPG permiten hoy día una buena tinción diferencial de cromátidas hermanas, aún sin emplear el

inhibidor.

Cuando la FdU es retirada totalmente del medio de cultivo, es decir, cuando las células meristemáticas crecen en un medio que contiene sólo BrdUrd durante dos ciclos de replicación de ADN, la frecuencia de ICH_s es entonces de sólo 3.6 intercambios por cromosoma. Dado que en este mismo material de trabajo, Schwartzman y Cortés(1977) (157) y Schwartzman y col. (1979) (162) habían observado unos valores medios de 5.2 $ICH/cromosoma$ y 3.9 $ICH/cromosoma$ para concentraciones de FdU de $10^{-7}M$ y $5.10^{-8}M$ respectivamente, consideramos de interés emplear dosis crecientes de FdU aplicadas simultáneamente con la BrdUrd durante dos rondas de replicación consecutivas en orden a estudiar detalladamente la capacidad de la FdU para inducir ICH_s . Para ello seleccionamos las concentraciones de FdU que permitiesen mantener la actividad mitótica del meristemo a unos niveles lo suficientemente altos como para llevar a cabo un análisis cuantitativo de los ICH_s , ya que se ha demostrado que la fluorodesoxiuridina a concentraciones superiores a $10^{-7}M$ tiene un marcado efecto antimitótico en *Allium cepa* (Schwartzman y Cortés, 1977) (157). A concentraciones de FdU superiores a $10^{-6}M$ la actividad mitótica del meristemo resultó ser insuficiente para el recuento de ICH_s y a concentraciones de $5.10^{-7}M$ y a $10^{-6}M$ la duración del ciclo celular sufría un retraso de al menos 10 horas, lo cual hubo de ser tenido en cuenta para, en los experimentos siguientes, asegurarse de que las células pudiesen desarrollar dos ciclos celulares completos.

Como puede verse en la figura 3, cuando la FdU es suministrada junto con BrdUrd durante dos rondas de replicación consecutivas tiene lugar una potenciación de los ICH_s , de una manera dosis-dependiente consiguiéndose el máximo efecto a una concentración de FdU de $5.10^{-7}M$. La media de ICH por cromosoma se elevó desde 3.65 en los controles a 9.18 a estas concentraciones de FdU (lo cual supone casi 147 intercambios por célula) (Fig. 4). Estos resultados indican que la FdU puede ser considerada como un potente inductor de ICH_s en nuestro sistema. Es importante señalar que tanto en estos experimentos como

en los siguientes, la concentración de BrdUrd permaneció invariable, fijada en 10^{-4} M y que en todos los casos los bulbos fueron debidamente protegidos de la luz para evitar una posible fotólisis del ADN bromosustituído. También es destacable que un aumento relativamente pequeño en la concentración de FdU, como es de 10^{-7} M a $5 \cdot 10^{-7}$ M, resultó en un incremento bastante notable en la producción de los ICH (Fig. 3). Por último mencionar el hecho de que a la concentración de FdU más alta de la utilizadas (10^{-6} M) la frecuencia de intercambios obtenida fue ligeramente inferior que a $5 \cdot 10^{-7}$ M. Pensamos que, o bien a esta última concentración se alcanzaría una saturación o bien lo que podría ocurrir es una presumible subestimación de los ICH a la concentración superior, debida a que no estarían en mitosis algunas de las células más severamente afectadas por la FdU. Por todo ello seleccionamos la concentración de FdU de $5 \cdot 10^{-7}$ M para ser empleada en una serie de experimentos posteriores cuyos resultados se exponen resumidamente en la Tabla 2.

Cuando las células meristemáticas de *A. cepa* crecieron durante dos rondas de replicación en un medio que contenía FdU a una dosis de $5 \cdot 10^{-7}$ M, la frecuencia de ICH se incrementaba claramente sobre el nivel control obtenido en ausencia del inhibidor (Tabla 2, líneas 1 y 2).

La capacidad de inducir ICH_s resultó ser diferente dependiendo del ciclo celular en el cual fuese realizado el tratamiento con FdU (Fig. 5), de manera que, cuando la FdU estaba presente en el medio únicamente durante la primera ronda de replicación, la tasa de intercambios en cromosomas en la segunda mitosis (M2) era notablemente superior que cuando el tratamiento con el inhibidor se realizaba sólo durante la segunda ronda (Tabla 2, líneas 3 y 4). Estos resultados parecen indicar que cualquiera que sea la alteración introducida por la FdU en la dinámica celular no se traduce en un aumento en la frecuencia de intercambios entre cromátidas sino hasta la siguiente ronda de replicación del ADN.

Con objeto de confirmar este extremo, analizamos en cromosomas de la tercera mitosis (M3) (3 ciclos de incorporación de BrdUrd) la frecuencia de intercambios recíprocos (ocurridos durante la tercera replicación) y la de no recíprocos (ocurridos en la primera o en la segunda replicación) (Figuras 6 y 7). Cuando el tratamiento con FdU se efectuaba durante la segunda ronda de replicación la frecuencia de intercambios recíprocos aumentaba claramente mientras que la de los no recíprocos se mantenía invariable (Tabla 2, líneas 5 y 6) (Fig. 8).

Estos resultados confirman lo anteriormente observado en cromosomas de la segunda mitosis, esto es, que la presencia de FdU junto con BrdUrd en un ciclo celular se traduce de un incremento de los ICH_S en el siguiente, ya que si el efecto del inhibidor hubiese tenido lugar durante la ronda de replicación en la que estuvo presente (segunda) hubiese aumentado la frecuencia de intercambios no recíprocos.

Diferentes autores han sugerido que el efecto de la FdU sería debido más bien a una mayor incorporación de BrdUrd en el ADN, que a un efecto causado por la FdU en sí misma (Kihlman y Kronborg, 1975; Sono y Sakaguchi, 1980) (91) (170). Por nuestra parte, para probar esta hipótesis sometimos a las células meristemáticas a unos tratamientos con soluciones acuosas compuestas por 10^{-4} M de BrdUrd, 5.10^{-7} M de FdU y dT a diferentes concentraciones con objeto de ver si, de acuerdo con la hipótesis mencionada, la frecuencia de los ICH_S en estos experimentos resultaba disminuída al estar presente la dT, según cabría esperar de una menor bromosustitución debida a la competencia entre la BrdUrd y la dT por incorporarse en el ADN. Nuestros resultados parecen estar de acuerdo con esto, ya que cuando la dT estuvo presente durante dos ciclos celulares consecutivos junto con BrdUrd y 5.10^{-7} M de FdU la frecuencia de intercambios resultó disminuída tanto más cuanto mayor fuese la concentración de dT utilizada (Tabla 2, líneas 7 y 8; comparar con la línea 2), llegándose a obtener una frecuencia de intercambios similar o incluso menor que en los experimen-

tos control cuando utilizamos dT a una concentración de 5.10^{-4} M. Por encima de esa concentración de timidina la incorporación de BrdUrd resultó insuficiente para obtener una buena tinción diferencial de cromátidas hermanas.

Estos resultados sugieren que la alta frecuencia de ICH_s observada al tratar con FdU parece ser resultado de un alto grado de incorporación de BrdUrd en el ADN más que por un efecto directo de la FdU por sí misma.

La anterior conclusión resultó apoyada por los siguientes experimentos en los cuales efectuamos un tratamiento con FdU a 5.10^{-7} M, durante 30 horas (tiempo estimado de duración de un ciclo celular completo en un medio con FdU a esa concentración), pero antes de comenzar la incorporación de BrdUrd. La FdU fue empleada sólo ó con dT (10^{-4} M) (Tabla 2, líneas 9 y 10). Los resultados muestran que cuando la BrdUrd no esta presente en el medio simultáneamente con la FdU la frecuencia de ICH_s tiende a mantenerse a unos niveles cercanos al control, no pudiéndose encontrar, pués, un efecto directo de la FdU que conduzca a una alta producción de ICH_s . Las diferencias encontradas en estos dos últimos experimentos con respecto al control (aproximadamente una unidad en la media de intercambios) puede ser probablemente atribuida a que una pequeña cantidad residual de FdU permanezca todavía en la célula cuando la BrdUrd es suministrada, estimulando un nivel de bromosustitución del ADN sólo algo superior al que tiene lugar cuando la BrdUrd se encuentra sólo en el medio.

En resumen, todos los datos obtenidos parecen indicar que al menos la mayoría de los intercambios inducidos por FdU lo son, en realidad por la alta tasa de incorporación de BrdUrd en el ADN que la FdU facilita y el hecho de que los intercambios inducidos no sean puestos de manifiesto hasta la ronda siguiente al tratamiento sugiere que la mayor parte de estos intercambios son producidos cuando un ADN altamente bromosustituído por causa de la FdU es usado como molde para la replicación.

En preparaciones de células que habían sido tratadas con esta concentración de FdU relativamente alta, nos fue también posible observar, con cierta frecuencia, aberraciones cromosómicas provocadas por dicho tratamiento. Dichas aberraciones cromosómicas eran normalmente roturas de cromátidas y aberraciones de tipo intercambio; como las mostradas en la Figura 9.

Si, como se admite hoy día, la ocurrencia de ICH_s depende, al menos hasta cierto punto, del nivel de bromosustitución del ADN, el número de intercambios que se espera que ocurran cuando las células desarrollan dos rondas consecutivas de replicación con BrdUrd sería claramente superior a los que ocurren cuando las células sólo desarrollan en presencia de BrdUrd una ronda de replicación del ADN, ya que las cadenas bromosustituídas son tres en el primer caso y sólo una en el segundo.

Los resultados publicados en este mismo material por Schwartzman y Cortés (1977) (157) apoyaban claramente esta hipótesis, ya que cuando las células meristemáticas eran expuestas a una solución compuesta por 10^{-4} M de BrdUrd, 10^{-7} M de FdU y 10^{-6} M de Urd durante dos rondas de replicación consecutivas el valor medio de intercambios por cromosoma era notablemente superior (5.5) que cuando las células eran expuestas al anterior tratamiento durante sólo la primera ronda (2.8).

Por nuestra parte hemos llevado a cabo el mismo diseño experimental, pero sin emplear Urd en la solución tratante. La diferencia de las medias de ICH_s de una ronda y de dos en BrdUrd se confirmó cuando la FdU estaba presente a la concentración empleada por Schwartzman y Cortés (157) (10^{-7} M) (2.95 frente a 5.17). Sin embargo, cuando la FdU no se adicionaba a la solución tratante, es decir, cuando las células crecían sólo en un medio con BrdUrd las diferencias en las frecuencias de intercambios en células con una o dos rondas de replicación en BrdUrd eran bastante menos extremadas (3.08 frente a 3.65) aunque aún estadísticamente significativa ($P < 0.01$).

Estos resultados se exponen en la Tabla 3, mientras que en la Figura 10 puede verse como en los cuatro casos los valores obtenidos se ajustan bien a una distribución teórica de Poisson.

Considerando lo anterior, nos propusimos a continuación, ver si la mencionada diferencia se mantenía si usábamos concentraciones de FdU más elevadas. Así, comparamos la frecuencia de intercambios que obtuvimos con una solución compuesta por 10^{-4} M de BrdUrd y $5 \cdot 10^{-7}$ M de FdU, mantenida durante dos ciclos celulares (9.18) (Tabla 2, línea 2) con la que se obtiene cuando en el segundo ciclo de replicación el BrdUrd y la FdU se substituyen por 10^{-4} M de dT (Tabla 2, línea 11). Como se vé en éste último caso la media obtenida (5.23) es claramente inferior a la del primero.

La razón entre la frecuencia de intercambios que se obtiene en cromosomas con dos rondas completas de replicación en BrdUrd (3 cadenas bromosustituídas), con respecto a la obtenida en cromosomas con una sola ronda de BrdUrd (1 cadena bromosustituída) es muy parecida (de aproximadamente 1.75) para las concentraciones de FdU de 10^{-7} M y de $5 \cdot 10^{-7}$ M. Sin embargo, esta razón tiende a disminuir para concentraciones de FdU menores de 10^{-7} M o cuando la FdU no es aplicada junto con la BrdUrd en la solución tratante.

Por otra parte, ya hemos mencionado que cuando las células meristemáticas se tratan con FdU a la concentración más alta, el tiempo necesario para que tenga lugar una replicación completa del ADN se prolonga considerablemente. Por ello decidimos medir la duración de la interfase a cada una de las concentraciones de FdU utilizadas, así como en ausencia de la misma. Para ello marcamos una población meristemática espontáneamente sincrónica como células binucleadas, por la inhibición de la citocinesis celular provocada por un tratamiento con cafeína durante 1 hora. Una vez levantado este tratamiento los meristemas se trasladaron a un medio con las soluciones de FdU y/o BrdUrd y el tiempo transcurrido desde este momento hasta la aparición del número máximo de células en bimitosis se con-

sideró la duración media de la interfase en esas condiciones.

Los resultados fueron en parte infructuosos, ya que el efecto inhibitor del FdU a la concentración de $5 \cdot 10^{-7} M$ parece ser potenciado por la cafeína, de manera que no se observaron células binucleadas en mitosis ni aún a las 50 horas de iniciado el tratamiento. De cualquier manera la duración del ciclo celular en estas condiciones puede ser estimada por medición del tiempo necesario para obtener tinción diferencial de las cromátidas y como hemos dicho ese tiempo resultaba ser al menos 10 horas superior al aplicado en condiciones standards.

Obtuvimos resultados positivos a una concentración de $10^{-7} M$ y en ausencia de FdU. Como puede verse (Fig. 11) en esta última situación no existe ningún retraso apreciable en la cinética de proliferación celular, siendo cualquier retraso solamente achacable a la presencia de FdU en el medio.

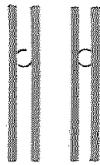
FIGURA 1.- Representación esquemática de la segregación semi-conservativa del ADN en los cromosomas en el caso de que incorporen bromodesoxiuridina (BrdUrd) durante dos ciclos de replicación consecutivos.

Mediante barras negras se representan las cadenas de ADN nativo y con barras claras el ADN bromosustituído.

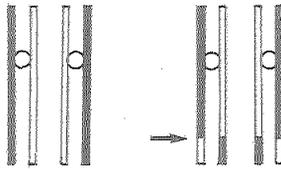
En los cromosomas de la segunda mitosis puede establecerse diferencias de tinción entre una cromátida monosustituída y otra cromátida bisustituída con el análogo (A) y pueden ser detectados los intercambios entre cromátidas ocurridos durante la primera replicación (C,D) o durante la segunda (B,D).

Nótese que no es suficiente una sólo ronda de replicación (interfase) en BrdUrd para obtener tinción diferencial de las cromátidas.

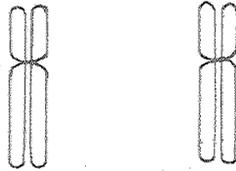
Las flechas indican la localización y el momento de producción de un intercambio en las cadenas de ADN en replicación y las puntas de flecha la correspondiente visualización en el cromosoma metafásico.



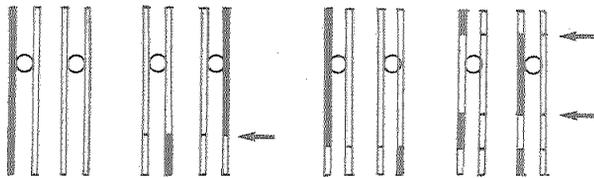
Primera interfase
con BrdUrd



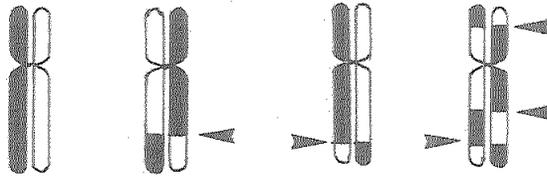
Primera mitosis



Segunda interfase
con BrdUrd



Segunda
mitosis



A

B

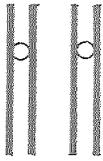
C

D

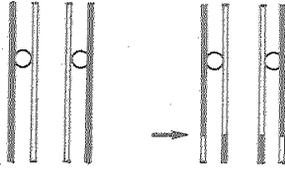
FIGURA 2.- Representación esquemática de la segregación semi-conservativa del ADN en los cromosomas en el caso de que incorpore BrdUrd sólo durante una ronda de replicación seguida de otra en presencia de Timidina.

Por medio de barras negras se representa ADN nativo y con barras claras el ADN bromosustituído.

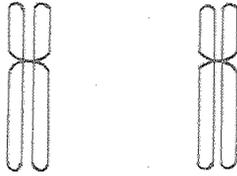
En este caso la diferenciación se obtiene entre una cromátida no sustituida y otra monosustituída con el análogo en los cromosomas de la segunda mitosis. Asimismo, los intercambios producidos (flechas) pueden ser perfectamente visualizados.



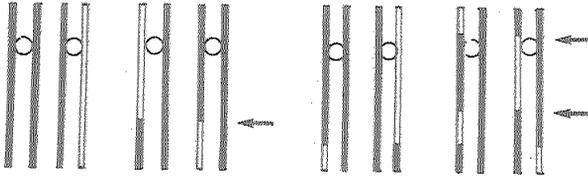
Primera interfase
con BrdUrd



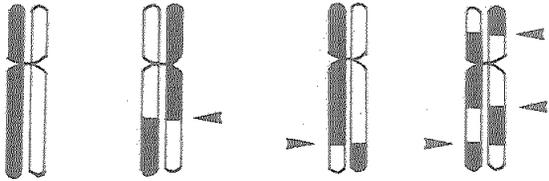
Primera
mitosis



Segunda interfase
con TdR



Segunda
mitosis



A

B

C

D

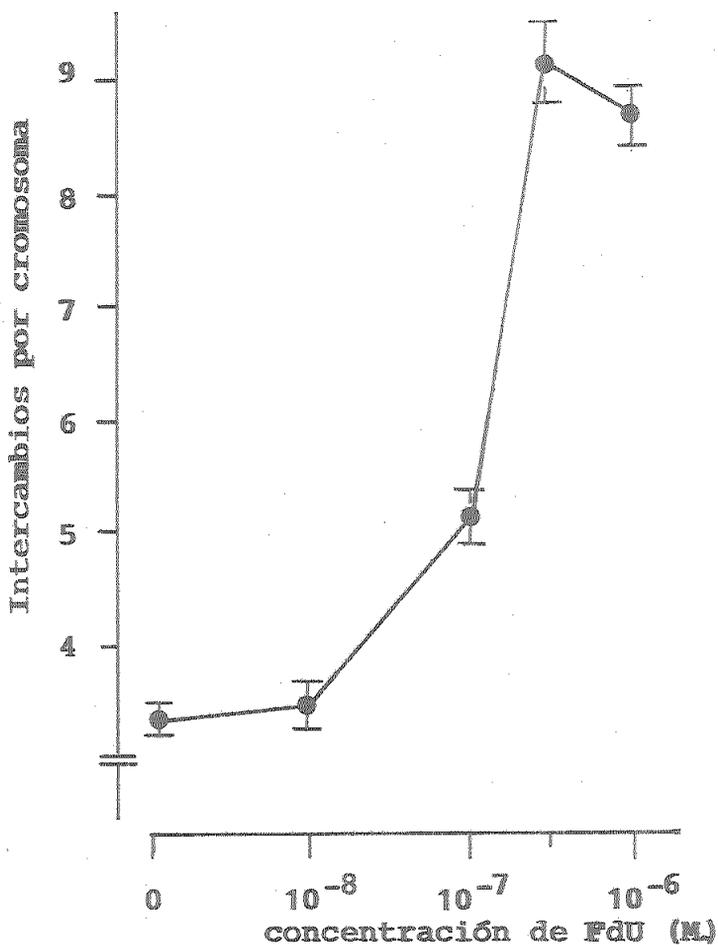


FIGURA 3.- Efecto de distintas dosis de FdU sobre la producción de intercambios entre cromátidas hermanas. La FdU se administró durante dos rondas de replicación consecutivas, simultáneamente con BrdUrd a una concentración 10^{-4} M.

ordenadas : frecuencia de ICH_s

abcisas : concentraciones molares de FdU

Nótese como la frecuencia de ICH_s se eleva drásticamente al aumentar la concentración del nucleósido, alcanzándose una saturación a una concentración de FdU de 5.10^{-7} M.

FIGURA 4.- Cromosomas de *Allium cepa* mostrando tinción diferencial e ICH_s .

a) Cuando han crecido en un medio con $10^{-4}M$ de BrdUrd durante dos rondas de replicación.

b) Cuando a la solución anterior se le añade $5 \cdot 10^{-7}M$ de FdU.

Obsérvese como en este último caso los cromosomas presentan un número notablemente superior de ICH_s que en el primero.

En el margen inferior derecha se presenta un cromosoma, en detalle, con un alto número de ICH_s inducidos por un tratamiento con $5 \cdot 10^{-7}M$ de FdU.



FIGURA 5.- Representación esquemática de una serie de experimentos para demostrar la capacidad de la FdU para provocar ICH_s .

Rectángulos blancos: ausencia de FdU; rectángulos sombreados: presencia de $5 \cdot 10^{-7} M$ de FdU.

a) Dos periodos de síntesis de ADN en BrdUrd y en ausencia total del inhibidor.

b) Dos periodos de síntesis de ADN (S1 y S2) en un medio que contiene BrdUrd y FdU a la concentración indicada.

c) Tratamiento con FdU durante sólo el primer periodo S (S1).

d) Tratamiento con FdU durante sólo el segundo periodo S (S2).

La capacidad de inducir intercambios es diferente según el momento y duración del tratamiento. A la derecha de cada experimento se representa un cromosoma con la moda de intercambios.

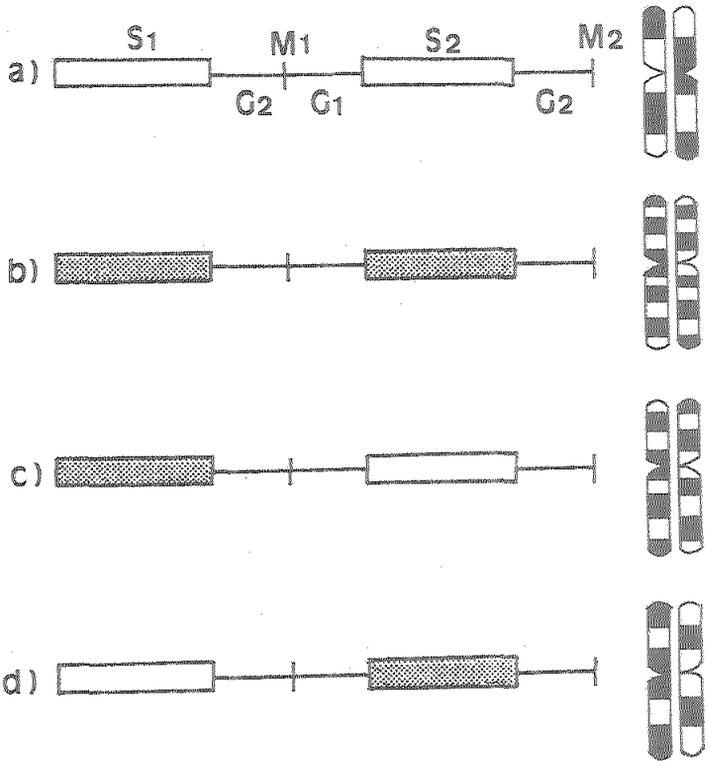
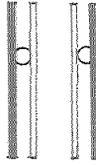


FIGURA 6.- Segregación del ADN bromosustituído durante tres rondas de replicación sucesivas incorporándose Brd-Urd.

Barras negras: ADN nativo; barras blancas: ADN bromosustituído. Sólo una de cada cuatro cromátidas aparece intensamente teñida.

En los cromosomas de la tercera mitosis pueden ser detectados tanto intercambios recíprocos, ocurridos durante el último periodo S (flechas grandes), como no recíprocos, ocurridos durante el primer o segundo periodo S (flechas pequeñas). Obsérvese como algunos ICH_s que ocurriesen durante el tercer periodo S no pueden llegar a ser detectados (B).

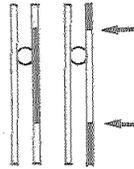
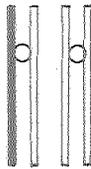
Primera interfase
con BrdÜrd



Primera
mitosis



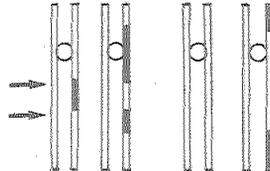
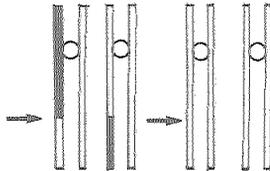
Segunda interfase
con BrdÜrd



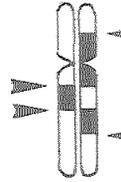
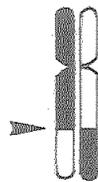
Segunda
mitosis



Tercera interfase
con BrdÜrd



Tercera
mitosis



A

B

C

D

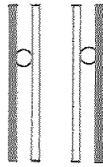
FIGURA 7.- Segregación del ADN durante tres ciclos celulares consecutivos en el caso de que sólo en el primero esté presente la BrdUrd.

Barras negras: ADN nativo; barras blancas: ADN bromosustituído.

En este caso, sólo una de cada cuatro cromátidas resulta debilmente teñida.

En los cromosomas de la tercera mitosis también pueden detectarse dos tipos de intercambios: recíprocos (flechas grandes) y no recíprocos (flechas pequeñas). Asimismo, en el caso A los intercambios que se produjesen no serían detectables.

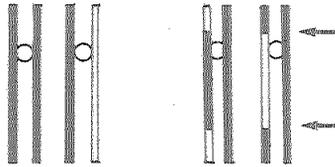
Primera interfase
con BrdUrd



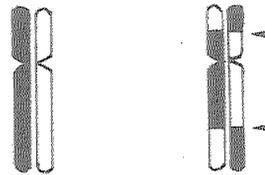
Primera
mitosis



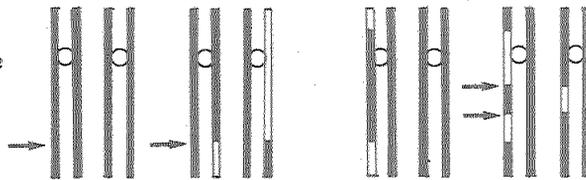
Segunda interfase
con TdR



Segunda
mitosis



Tercera interfase
con TdR



Tercera
mitosis

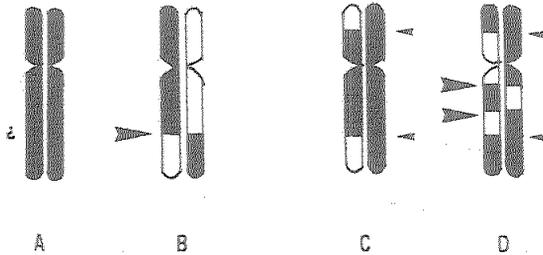


FIGURA 8.- Cromosomas de *Allium cepa* en la tercera mitosis después de incorporar BrdUrd durante los tres ciclos de replicación del ADN mostrando intercambios recíprocos y no recíprocos.

a) Cuando no se adiciona FdU al medio de crecimiento.

b) y c) Cuando se suplementa el medio que contiene BrdUrd con $5 \cdot 10^{-7}$ M de FdU sólo durante el segundo ciclo celular.

Notese como en esta última situación la frecuencia de ICH_s recíprocos es alta.

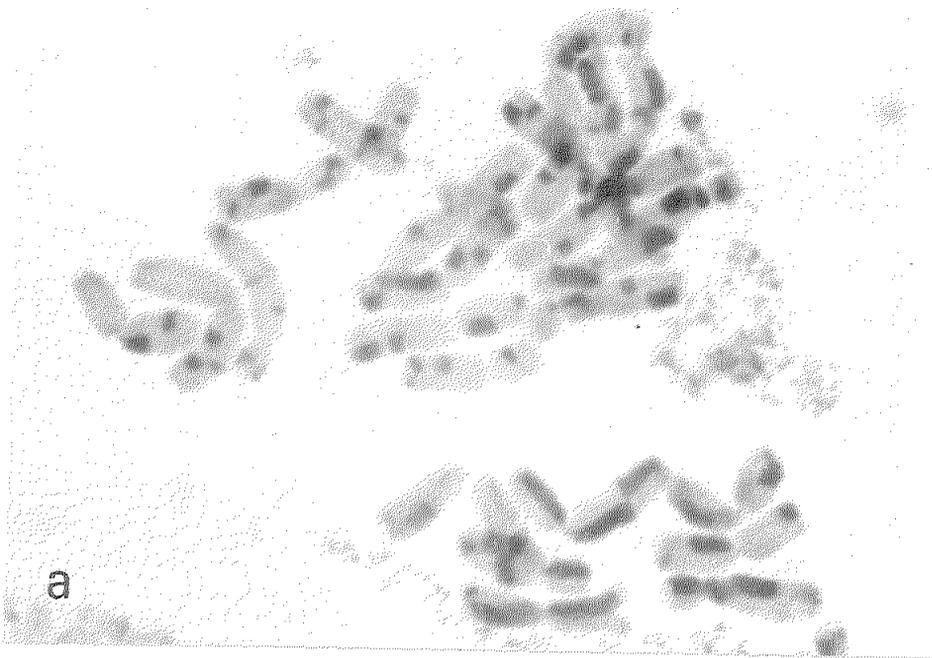


FIGURA 9.- Aberraciones cromosómicas provocadas por un tratamiento con Fluorodesoxiuridina.

Las aberraciones encontradas eran frecuentemente roturas de cromátidas y aberraciones de tipo intercambio, típicamente provocadas por los agentes llamados S-dependientes.

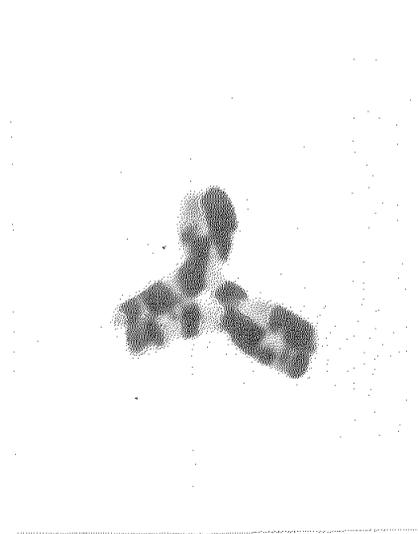
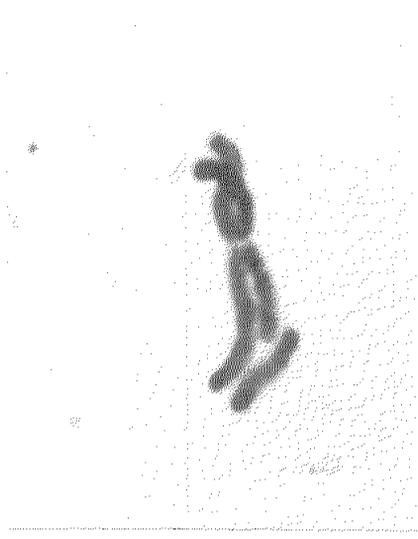


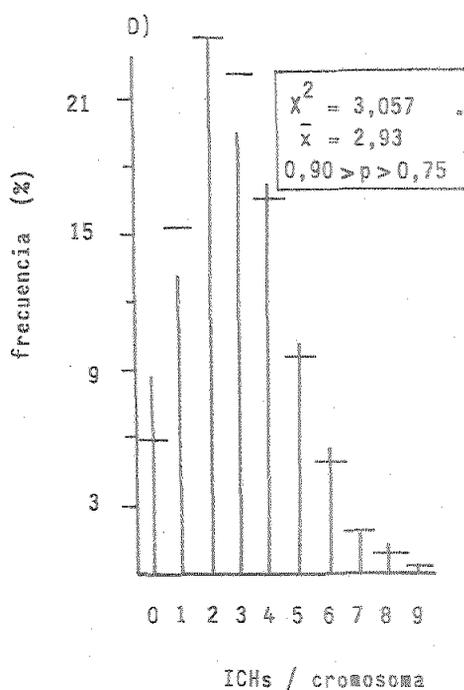
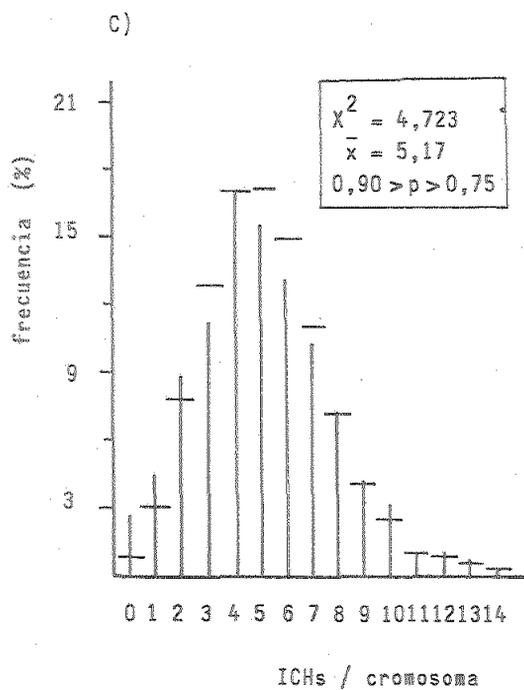
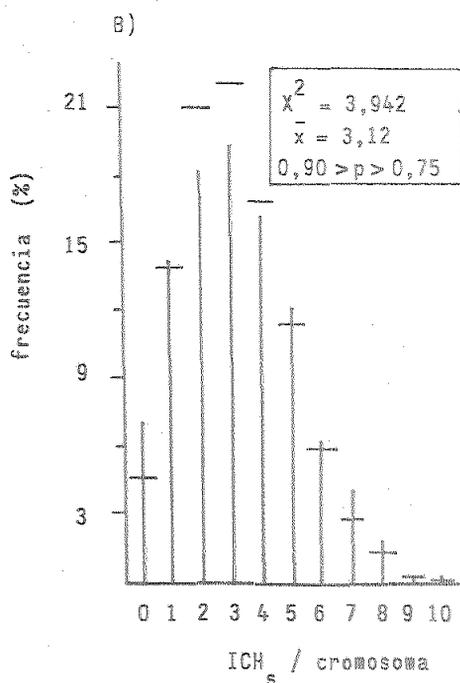
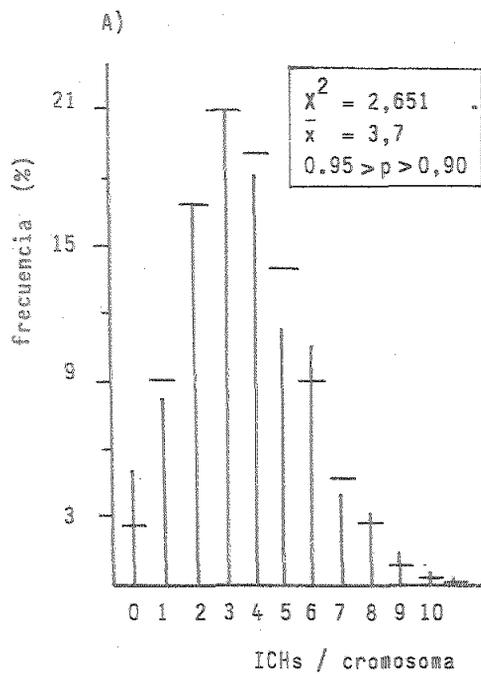
FIGURA 10.- Frecuencias de ICH_s en cromosoma de una ronda o dos en BrdUrd con o sin FdU adicionado.

A) y B) Dos y una ronda de BrdUrd respectivamente en ausencia de FdU.

C) y D) Dos y una ronda de BrdUrd respectivamente más $10^{-7} M$ de FdU.

Para todos los casos las líneas verticales representan el porcentaje de cromosomas con 0, 1, 2, ... intercambios y las líneas horizontales los respectivos valores esperados si los datos se ajustaran a una distribución teórica de Poisson.

Como puede verse después de la realización del test de Chi-cuadrado, el ajuste fué bueno en los cuatro casos.



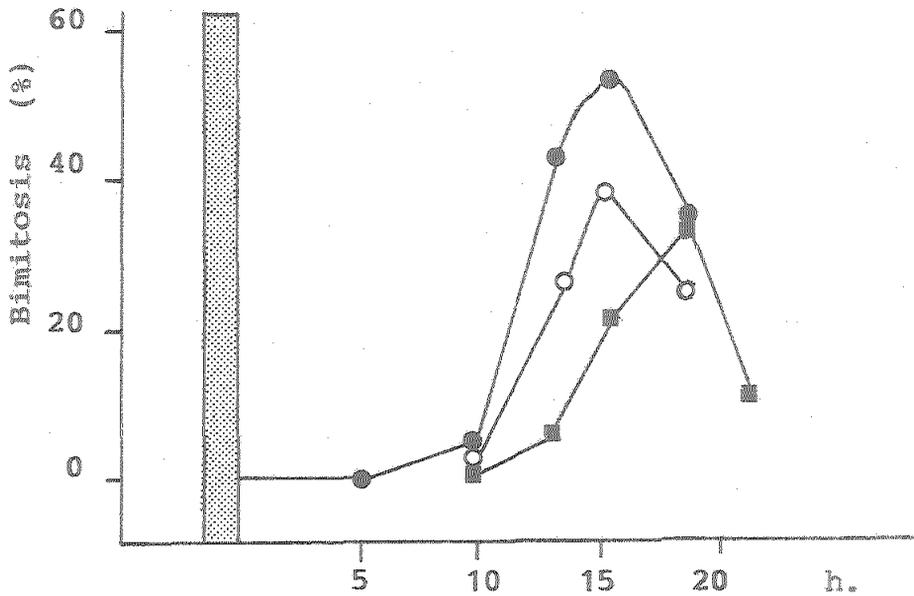


FIGURA 11.- Medición del tiempo de duración de la interfase B bajo tres diferentes condiciones experimentales. ordenada : porcentaje de células binucleadas en bimitosis.

abcisas : horas después de cafeína.

La formación de células binucleadas fue inducida por un tratamiento de una hora con 5mM de cafeína (■).

● en agua filtrada (control).

○ en 10⁻⁴ M de BrdUrd.

■ en 10⁻⁴ M de BrdUrd más 10⁻⁷ M de FdU.

TABLA 1.

Valores de frecuencia de intercambios entre cromatidas hermanas en células meristemáticas radicales de *Allium cepa* tratados con dT y Urd.

Ciclo celular		ICH _s / cromosomas		
1	2	Concentraciones de nucleósidos probado	Nº de cromosomas contados	Media \pm EE
BrdUrd ^a	dT	0	640 ^b	2.80 \pm 0.16
		10 ⁻⁵ M	320	2.45 \pm 0.18
		10 ⁻⁴ M	960 ^b	3.08 \pm 0.15
		10 ⁻³ M	320	3.05 \pm 0.21
		10 ⁻² M	640 ^b	2.82 \pm 0.13
BrdUrd:Urd	BrdUrd:Urd	0	640 ^b	3.65 \pm 0.17
		10 ⁻⁵ M	640 ^b	2.34 \pm 0.13
		10 ⁻⁴ M	320	2.24 \pm 0.18
		10 ⁻³ M	320	2.81 \pm 0.23

a. La concentración de BrdUrd fue siempre de 10⁻⁴ M.

b. Resultados de al menos dos experimentos diferentes.

TABLA 2. Inducción de ICH_s por 5-Fluorodesoxiuridina

Experimento nº	Anterior a BrdUrd	ciclos celulares			Media de ICH por cromosoma + EE	Nº de cromosomas evaluados
		1	2	3		
1	----	BrdUrd	BrdUrd	----	3.65 ± 0.16	960 ^a
2	----	BrdUrd:FdU	BrdUrd:FdU	----	9.18 ± 0.40	640 ^a
3	----	BrdUrd:FdU	BrdUrd	----	7.09 ± 0.26	640 ^a
4	----	BrdUrd	BrdUrd:FdU	----	3.86 ± 0.21	640 ^a
5	----	BrdUrd	BrdUrd	BrdUrd	1.35 ± 0.18 ^b	320
					3.80 ± 0.19 ^c	
6	----	BrdUrd	BrdUrd:FdU	BrdUrd	2.37 ± 0.22 ^b	320
					3.96 ± 0.22 ^c	
7	----	BrdUrd:FdU;dT (10 ⁻⁴ M)	BrdUrd:FdU;dT (10 ⁻⁴ M)	----	6.29 ± 0.36	320
8	----	BrdUrd:FdU;dT (5.10 ⁻⁴ M)	BrdUrd:FdU;dT (5.10 ⁻⁴ M)	----	2.89 ± 0.17	320
9	FdU	BrdUrd	BrdUrd	----	4.46 ± 0.25	320
10	FdU:dT(10 ⁻⁴ M)	BrdUrd	BrdUrd	----	4.19 ± 0.26	320
11	----	BrdUrd:FdU	dT	----	5.23 ± 0.36	320

BrdUrd = 10⁻⁴M; FdU = 5.10⁻⁷M; dT = 10⁻⁴M

a. Datos de al menos dos experimentos

b. ICH_s recíprocos

c. ICH_s no recíprocos.

TABLA 3

Frecuencias de ICH_s / cromosoma cuando las células meristemáticas radicales de *Allium cepa* toman BrdUrd durante 2 (BB-BT) o sólo 1 (BT-TT) ciclo de replicación del ADN y atendiendo a la ausencia o presencia de FdU en la solución de BrdUrd.

	- FdU	+ 10^{-7} M FdU	+ $5 \cdot 10^{-7}$ M FdU
BT-TT	3.08 \pm 0.15	2.93 \pm 0.22	5.23 \pm 0.36
BT-BB	3.65 \pm 0.16	5.17 \pm 0.25	9.18 \pm 0.40

2.- FRECUENCIA Y LOCALIZACION DE LOS ICH_S.

La localización de los intercambios entre cromátidas hermanas es una de las cuestiones más intensamente estudiadas para intentar dilucidar el todavía hoy desconocido significado biológico de los mismos.

Las fuertes discrepancias que hay entre los resultados de los distintos autores que han estudiado este problema en diferentes especies y las contradicciones que muchas veces existen en los datos referentes a una especie en particular (ver introducción), nos han llevado a realizar un estudio de la frecuencia y distribución de los intercambios espontáneos e inducidos en nuestro material.

El cariotipo de *A. cepa* tiene un número cromosómico diploide de 16. El índice de brazos que caracteriza a cada cromosoma es muy similar (Tabla, 4) y sólo el cromosoma subteloecéntrico satelizado (st) puede ser fácilmente reconocido (Stockert y col., 1969(174)(Fig., 12). Por ello fué elegido para estudiar en él la frecuencia de intercambios espontáneos e inducidos. Asimismo, hemos estudiado sobre dicho cromosoma los patrones de distribución de tales intercambios con objeto de poder establecer una aleatoriedad en cuanto a su localización o bien una producción de ICH_S preferencial en algunas regiones cromosómicas. Para ello hemos puesto de manifiesto previamente las diferentes regiones especiales que pueden establecerse a lo largo de dicho cromosoma, como son las regiones heterocromáticas y las que replican su ADN al final del periodo S. Finalmente hemos establecido una comparación entre los patrones de distribución de los intercambios espontáneos con el de los inducidos en orden a determinar el grado de posible coincidencia topográfica.

2.1.- Heterocromatina constitutiva en Allium cepa.

En muchas especies en las que este problema ha sido abordado

las bandas C positivas (compuestas por heterocromatina constitutiva y teñidas intensamente con Giemsa luego de llevar a cabo tratamientos desnaturalizantes) coinciden, en gran medida, con las regiones cromosómicas ricas en ADN de replicación tardía. Este no es el caso en nuestro material, ya que en *A. cepa* las bandas C se encuentran casi exclusivamente en los telómeros de los cromosomas mientras que las regiones ricas en ADN de replicación tardía presentan una situación tanto telomérica como pericentromérica, además de localizarse en algunos cromosomas a nivel intersticial (Figs.13 y 14).

Por otro procedimiento de bandeo cromosómico, conocido como bandeo N, se pone de manifiesto la heterocromatina constitutiva asociada a las regiones organizadoras nucleolares que suelen localizarse en las constricciones secundarias de ciertos cromosomas (regiones NOR_s). En *A. cepa* las más importantes de estas zonas especiales se hallan en relación a la constricción secundaria localizada distalmente en el brazo corto del par de cromosomas subtelocéntricos satelizados (Figs. 13 y 14).

Finalmente, una modificación introducida por nosotros a la técnica de bandeo C nos ha permitido poner de manifiesto no sólo la heterocromatina asociada a los NOR_s, sino también la heterocromatina asociada a las constricciones primarias (centrómeros) de todos los cromosomas del complemento de *A. cepa* (Figs.13 y 14).

2.2.- Detección del ADN de replicación tardía.

Una forma de poner de manifiesto las regiones cromosómicas que son ricas en ADN que replica al final del periodo S es hacer que las células incorporen el análogo de la timidina 5-Bromodesoxiuridina en el ADN durante la replicación temprana y media, y levantado posteriormente este tratamiento, permitir que las células desarrollen su última etapa de síntesis de ADN en un medio que contenga timidina normal (Fig. 15). Después de aplicar la metodología FPG, para la tinción

diferencial del ADN bromosustituído, se obtiene el patrón de replicación tardía que se muestra en las Figs.13y14. Como puede verse, las zonas más intensamente teñidas con Giemsa, que son los que incorporaron timidina en su ADN de replicación tardía, aparecen en el cromosoma satelizado de *Allium cepa* en forma de una amplia banda pericentromérica, así como otras en posición telomérica principalmente, en confirmación de lo ya publicado en este mismo material por Cortés y col. (1980) y Cortés y González-Gil (1982)(29) (31).

Una innovación en la metodología para detectar a nivel cromosómico una riqueza en ADN de replicación tardía la constituye el empleo, por nuestra parte, de un agente sincronizante como es el 5-aminouracilo (5-AU), uno de cuyos efectos parece ser impedir la replicación del ADN en los últimos estadios del periodo S (Socher y Davidson, 1971; Scheuermann y Klaffke-Lobsien, 1973; Diéz y col., 1976) (167) (150) (37).

De acuerdo con Diéz y col. (1976) (37) cuando las células son tratadas con 0.5 mM de 5-AU durante 18 horas a 25°C, se produce una caída del índice mitótico nada más iniciarse el tratamiento, alcanzando valores muy bajos después de las 6 horas, pero si el 5-AU es retirado del medio de cultivo, todas las células detenidas en ese punto de la interfase llegan a mitosis de una manera más o menos sincrónica. Como nosotros necesitamos que las células incorporen BrdUrd en presencia de 5-AU, durante toda la replicación temprana y media, hasta el bloqueo de la síntesis de ADN en la replicación tardía por parte del 5-AU y posteriormente permitir que las células terminasen su replicación en presencia de dT y llegasen a metafase, realizamos un estudio previo de la evolución del índice mitótico (IM%) bajo las condiciones experimentales que íbamos a utilizar.

Como puede observarse en la figura 16 el 5-AU ejerce un efecto inhibitor de la proliferación celular que se hace evidente a partir de las 4 horas de tratamiento, llegando a alcanzar el índice mitótico valores mínimos a las 8 horas(Fig.17a). Sin embargo, este efecto resultó ser

reversible, de manera que si se interrumpe el tratamiento y se les permite a las células recuperarse en presencia de dT, el IM empieza a incrementarse, llegando a alcanzar un valor 33,3 a las 10 horas de recuperación para después volver a disminuir (Fig. 17b).

Después de un tratamiento continuo con 5-AU junto con BrdUrd todos los núcleos interfásicos de las células meristemáticas mostraban el patrón típico de cromocentros intensamente teñidos mostrando una clara polarización, como podría esperarse de una replicación del ADN incorporando BrdUrd sólo durante la replicación temprana y media y ausencia de replicación del ADN correspondiente a la replicación tardía (Fig. 18).

Del mismo modo, cuando a las células sincronizadas con 5-AU se les permite llegar a mitosis puede obtenerse un gran número de células en metafase mostrando el patrón característico de replicación tardía; esto es, se tiñen intensamente con Giemsa las regiones teloméricas, pericentroméricas y algunas bandas intersticiales, como resultado de la incorporación de timidina de estas regiones (Fig. 13a).

2.3.- Diseño experimental.

Se realizaron cuatro experimentos diferentes para estudiar luego, en cada caso, la frecuencia y distribución de los intercambios (Fig. 19).

- (1) Sustitución de la timidina por BrdUrd sólo durante la primera ronda de replicación, seguida de otra en ausencia de BrdUrd y en presencia de timidina. No fué utilizado en este caso ningún agente físico ni químico inductor de ICH_s (Fig. 19a).
- (2) Incorporación de BrdUrd en el ADN durante dos periodos consecutivos. Igual que en el caso anterior la incorporación de BrdUrd fué facilitada mediante la adición de 10^{-7} M de FdU. Del mismo modo, no fué empleado ningún agente físico o químico adicional (Fig. 19b).

- (3) Sustitución con el nucleósido halogenado durante la primera ronda de replicación y la segunda en presencia de timidina. Con objeto inducir los ICH_S las células fueron sometidas, durante la segunda ronda cuando estaba presente la timidina, a un pulso de luz visible (LV), en la mitad del segundo periodo S (13 horas antes de la fijación) (Fig. 19c).
- (4) Tratamiento con hidrazida maleica (HM), durante dos horas, en el periodo G1 del segundo ciclo celular, poco antes de dar comienzo la síntesis de ADN en presencia de timidina (Fig. 19d).

2.4. Frecuencia de ICH_S.

El valor medio de intercambios por cromosoma satelizado resultó ser diferente dependiendo del esquema experimental llevado a cabo.

Un tratamiento con BrdUrd solamente durante un primer periodo S seguido de otro en presencia de timidina tuvo como consecuencia una frecuencia de ICH /cromosoma satelizado menor ($\bar{x} = 3.13$) que cuando el tratamiento se realiza a lo largo de dos ciclos celulares consecutivos ($\bar{x} = 4.90$).

Aunque es sabido que el BrdUrd por sí mismo provoca aberraciones cromosómicas e ICH_S, utilizaremos el término "espontáneos" para referirnos a los intercambios obtenidos en ausencia de cualquier otro tratamiento mutagénico adicional, si bien en presencia de BrdUrd como elemento indispensable para la obtención de la tinción diferencial entre cromátidas hermanas.

Por su parte, tanto el tratamiento con luz visible como el efectuado con la hidrazida maleica dieron como resultado un claro incremento en la frecuencia de ICH_S en cromosomas TB-TT (sólo 1 de las cuatro cadenas de ADN bromosustituída). La media de ICH fue de 10.09 para el caso de un tratamiento con luz visible en mitad del segundo periodo S y de 10.25 para el caso de un tratamiento con hidra-

zida malefica en el G1 del segundo ciclo celular. De acuerdo con Latt y col. (1981) (101) un incremento de menos del doble en la frecuencia de intercambios por cromosomas no debe ser considerada como una diferencia biológicamente significativa, cuando se está tratando de evaluar el daño que pueda provocar una sustancia determinada en el ADN (medido como ICH_s inducidos). Como puede verse, dado que ambos tratamientos mutagénicos empleados por nosotros producen como consecuencia una frecuencia de ICH por cromosoma satelizado (x = 10.09 y x = 10.25) superior al doble (casi 3.2 veces para la LV e HM) de la obtenida en el experimento control utilizado como control (x = 3.13), estos agentes pueden ser considerados como potentes inductores de ICH_s en nuestro sistema (Tabla 5).

Si tal como se ha propuesto el número de ICH_s por cromosoma es proporcional a su longitud en metafase (Taylor, 1958; Latt, 1974a) (183) (99), la frecuencia de intercambios en el cromosoma satelizado no debe ser distinta de la del resto de los cromosomas no satelizados de A. cepa, dadas sus semejanzas en tamaño. En cada experimento, para determinar si la frecuencia de intercambios en el cromosoma satelizado estaba disminuída o potenciada en algún modo, en comparación con el resto de los cromosomas, se utilizó el test estadístico Z. Este test, una vez establecida la frecuencia de ICH_s en los cromosomas no satelizados del cariotipo y su longitud total, compara la probabilidad de que^{ss} produzca un ICH en los cromosomas satelizados, de acuerdo con su longitud, con los observados en los mismos, y está especialmente indicado para el análisis de datos que como los presentes, se ajustan bien a una distribución de Poisson.

$$Z = \frac{p_{ns} - p_s}{\sqrt{P(1-P) \left(\frac{1}{n_{ns}} + \frac{1}{n_s} \right)}}$$

$$P_{ns} = \frac{\lambda_{ns}}{n_{ns}} ; \quad \frac{\lambda_s}{n_s}$$

$$P = \frac{n_{ns} P_{ns} + n_s P_s}{n_{ns} + n_s}$$

Siendo:

p = probabilidad de un intercambio.

P = estimador de los ICH_s aceptando que las poblaciones son idénticas.

λ = medias de ICH/cromosoma.

n = tamaños de muestra.

los subíndices ns y s significan "no satelizados" y "satelizados" respectivamente.

Como puede verse en la Tabla 5 no hay una diferencia estadísticamente significativa entre el cromosoma satelizado y el resto de los cromosomas que componen el cariotipo en cuanto a la frecuencia de ICH_s observados, siendo esto cierto tanto para los intercambios espontáneos (2.93 frente a 3.13, en el experimento 1 y 5.17 frente a 4.90, en el experimento 2) como para los inducidos (10.81 frente a 10.09, en el experimento 3 y 11.24 frente a 10.25 en el experimento 4).

2.5. Patrón de distribución de los ICH_s a lo largo del cromosoma satelizado.

Con el propósito de estudiar la distribución de los ICH_s a lo largo del cromosoma, los cromosomas satelizados fueron divididos en 16 segmentos, 4 de los cuales correspondían al brazo corto (portador de la región organizadora nucleolar) y 12 al brazo largo. En cada experimento, cada intercambio evaluado era adjudicado, según su localización, al segmento correspondiente. La división de los cromosomas en segmentos fué efectuada mediante un ocular graduado, y cada división equivalía a 0.7 μ a la magnificación empleada, lo que dá como longitud media del cromosoma satelizado 11.2 μ aproximadamente.

La distribución intracromosómica tanto de los ICH_s espontáneos como de los inducidos resultó no ser al azar (Fig. 20), es decir, no fue uniforme a lo largo del cromosoma, sino que, por el contrario, algunos segmentos presentaban una gran cantidad de intercambios, superando el límite de confianza establecido previamente (nivel de significación del 1%), mientras que otros mostraban un número menor de ICH_s de los que cabría esperar de acuerdo con una distribución aleatoria de los intercambios.

Los límites superiores e inferiores de confianza fueron establecidos para un nivel de confianza del 1% ($\alpha = 1\%$) de acuerdo con las siguientes fórmulas:

$$Z_u = b_i D + \left(\frac{1}{2} + \mu_{\alpha}/2\right) \sqrt{b_i D}$$

$$Z_l = b_i D - \left(\frac{1}{2} + \mu_{\alpha}/2\right) \sqrt{b_i D}$$

Siendo:

b_i = longitud relativa del segmento en cuestión.

D = suma total de ICH_s en todos los segmentos (todo el cromosoma).

$b_i D$ = frecuencia esperada de ICH por segmentos (si la frecuencia esta correlacionada sólo con la longitud del segmento metafásicos.

Z_u = límite superior de confianza.

Z_l = límite inferior de confianza.

Si un segmento está sometido a ICH al azar, el número de intercambios encontrado en él es de esperar que caiga dentro de estos límites (Z_u y Z_l) con una probabilidad $1 - \alpha$.

Atendiendo a la diferenciación longitudinal establecida previamente en el cromosoma satelizado, los 16 segmentos pueden agruparse en al menos 4 fracciones con características peculiares: a) Regiones NOR_s , b) regiones ricas en ADN de replicación tardía pero no detectadas como heterocromáticas mediante los procedimientos de bandeado llevadas a cabo, c) otras regiones heterocromáticas y d) otras regiones cromosómicas (Fig. 20).

a) Regiones organizadoras nucleolares. Los NOR_s , localizados distalmente en el brazo corto del cromosoma satelizado y que se tiñen intensamente con Giemsa después de los procedimientos de bandeado C y N (segmento número 1) resultaron ser las regiones cromosómicas más altamente sensibles a los ICH_s , rebasando el límite superior de confianza en todos los casos, excepto cuando la incorporación de BrdUrd en el ADN tiene lugar sólo durante la primera ronda de replicación (Fig. 20), en cuyo caso se mantiene el número de ICH_s dentro de lo que cabría esperar de una distribución aleatoria de los mismos.

b) Regiones ricas en ADN de replicación tardía, no detectadas como heterocromáticas. Los segmentos del cromosoma satelizado que son ricos en ADN que replica al final del periodo S son pericentroméricos (segmentos 4, 5 y 6) y los teloméricos (segmentos 1 y 16) y parcialmente coincidentes con la heterocromatina constitutiva. El segmento cromosómico número 6, que es rico en ADN de replicación

tardía, pero que no se detecta como heterocromático, es también muy sensible a los intercambios inducidos por luz visible. Sin embargo, bajo el resto de las condiciones experimentales, la frecuencia de intercambios detectados en este segmento permanece dentro del intervalo de confianza, aunque hay que reseñar que, en cualquier caso es más susceptible a presentar ICH_s que las otras regiones de replicación tardía que, al mismo tiempo, se detectan como heterocromáticas (Fig. 20 M(VL)).

- c) Heterocromatina constitutiva. Las bandas C positivas (segmentos 4, 5 y 16) pueden ser clasificadas como las zonas del cromosoma que son menos sensibles a la producción de ICH, aunque el segmento pericentromérico 4 muestra una frecuencia de intercambios espontáneos muy cercana al límite inferior de confianza (Fig. 20, M y T).

Una baja incidencia de ICH_s en las regiones heterocromáticas del conjunto del cariotipo de este mismo material ha sido descrita por Schwartzman y Cortés en 1977 (157).

- d) Otras regiones cromosómicas. En general, en los segmentos cromosómicos no mencionados hasta ahora (segmentos 2, 3 y del 7 al 15) la frecuencia de intercambios observada se mantuvo dentro del intervalo de confianza establecido en base a una distribución aleatoria de los mismos a lo largo del cromosoma satelizado. Como excepción los segmentos 3 y 13 vuelven a tener, respectivamente, una baja y alta sensibilidad, especialmente a los ICH_s inducidos por luz visible.

En base a los resultados presentados podemos decir que, en general hemos encontrado una tasa de ICH_s menor que la que cabría esperar en las regiones heterocromáticas del cromosoma satelizado de A. cepa con la excepción de la región organizadora nucleolar la cual, a pesar de detectarse como heterocromática mediante los procedimientos de bandeado correspondientes se manifiesta como una zona del cromosoma altamente sensible a la producción de intercambios entre cromátidas hermanas.

La incorporación de BrdUrd en el ADN en lugar de la Timidina normal durante una ronda de replicación permite teóricamente detectar citológicamente regiones de especial riqueza de determinados pares de bases en el cromosoma metafásico (Fig. 21). Un contenido especialmente alto de pares de bases AT en un cromosoma o en una región determinada de un cromosoma haría que en esa zona, en una de las cromátidas, se incorporase mayor cantidad de BrdUrd en oposición a la adenina, que en la otra cromátida hermana. Puesto que la presencia de BrdUrd implica la tinción menos intensa con Giemsa, aquella región cromosómica que haya incorporado menor cantidad del análogo halogenado aparecería más teñida que el resto del cromosoma, después de aplicarle la técnica para la tinción diferencial del ADN bromosustituído. También podría detectarse regiones ricas en pares GC, al mismo nivel en ambas cromátidas hermanas.

Se podría pensar que una diferente composición de bases (riqueza en pares AT) en el ADN del cromosoma satelizado afectase a la frecuencia de ICH_s inducidos, especialmente a los inducidos por luz visible.

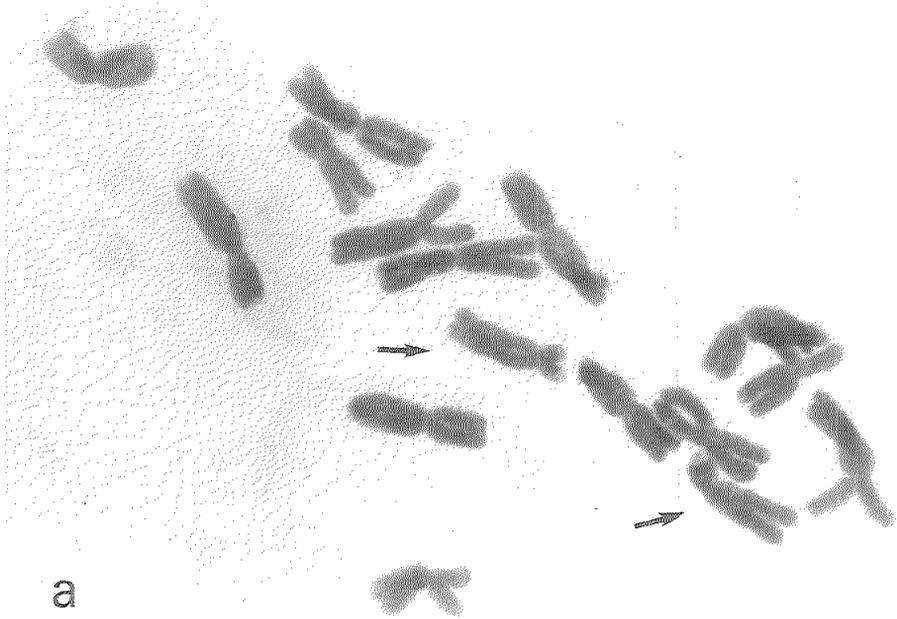
Con objeto de confirmar esta posibilidad, sometimos nuestro material de trabajo a un tratamiento para la incorporación de BrdUrd durante una ronda de replicación (aproximadamente 20 horas) en una solución de dicha sustancia más FdU a la concentración de 10^{-8} M. Después de aplicar la técnica de tinción FPG, los cromosomas satelizados y todos los que forman el complemento, mostraban una tinción clara y homogénea (Figs., 14 y 22), de modo que no se detectaron ni regiones muy ricas en pares AT, ni regiones ricas en pares GC.

FIGURA 12.- Cariotipo de *Allium cepa*.

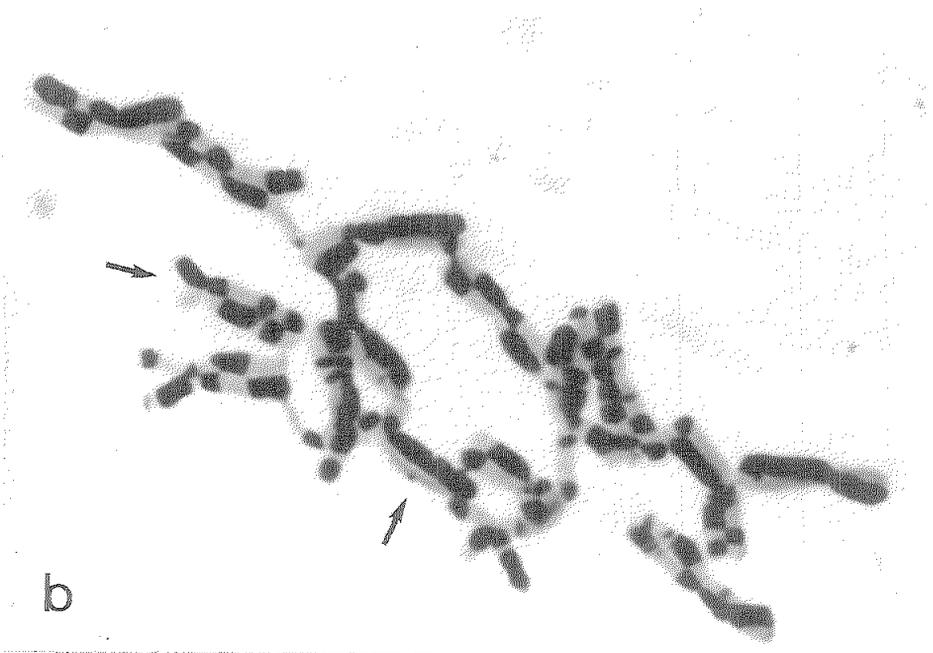
a) teñido con Orceína-acético-clorhídrica.

b) Teñido con Giemsa después de aplicarles la técnica de tinción diferencial FPG.

Las flechas señalan los cromosomas subtelocéntricos satelizados del complemento diploide, únicos fácilmente identificables individualmente.



a



b

FIGURA 13.- Cariotipo montado de *Allium cepa* después de aplicar diferentes técnicas de bandeo.

RT : Replicación tardía en dT tras incorporarse BrdUrd

C : Bando C.

N : Bando N (organizadores nucleolares).

Cm : Bando C modificado.

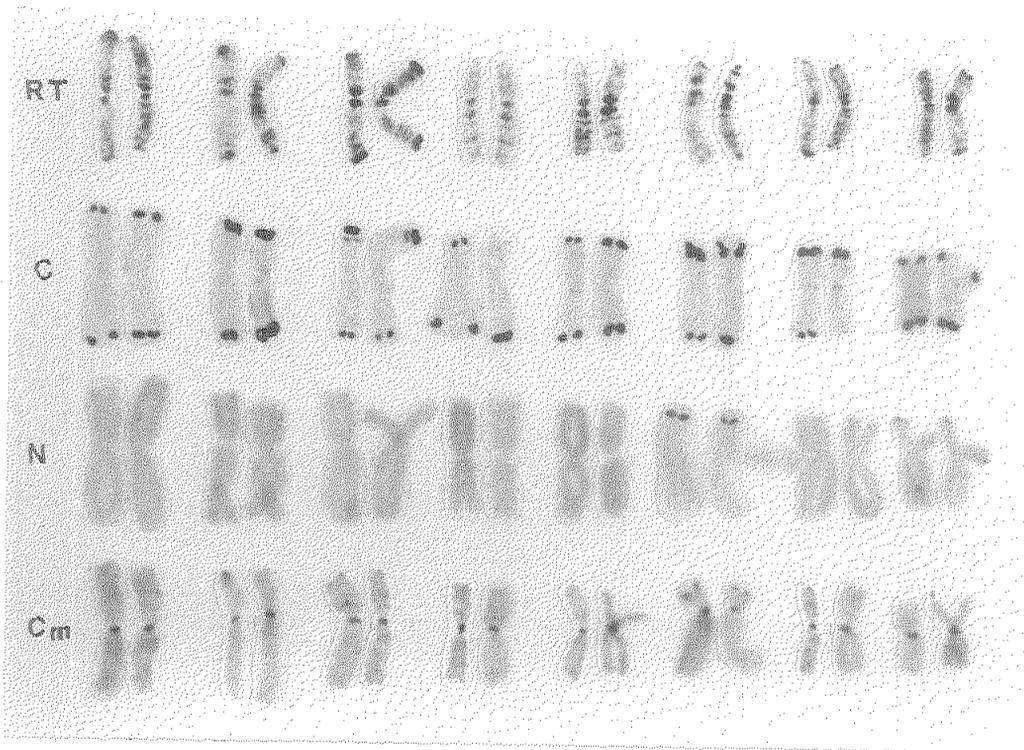
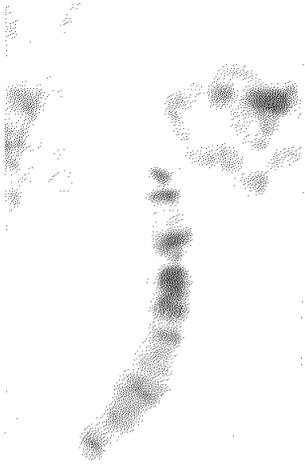


FIGURA 14.- Cromosomas satelizados de *Allium cepa* después de ser sometidos a diferentes técnicas experimentales.

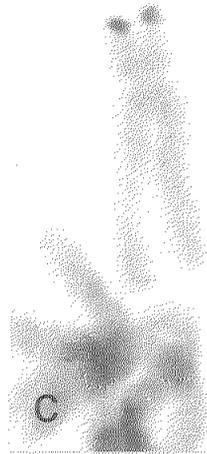
- a) Replicación tardía en dT tras incorporarse BrdUrd.
- b) Bando C
- c) Bando N
- d) Bando C modificado.
- e) M1 tras un periodo S incorporando BrdUrd.
- f) FPG.



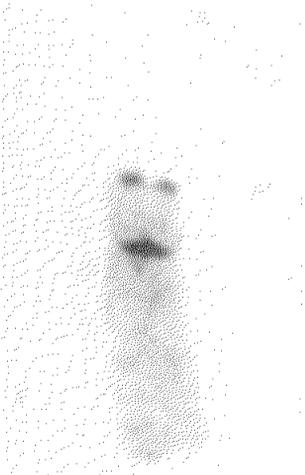
a



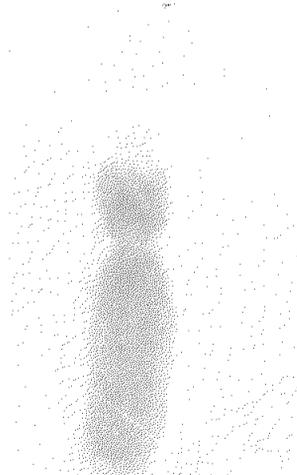
b



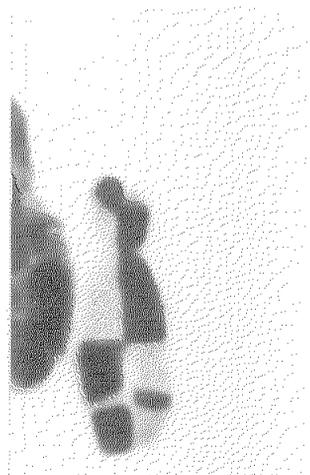
c



d



e



f

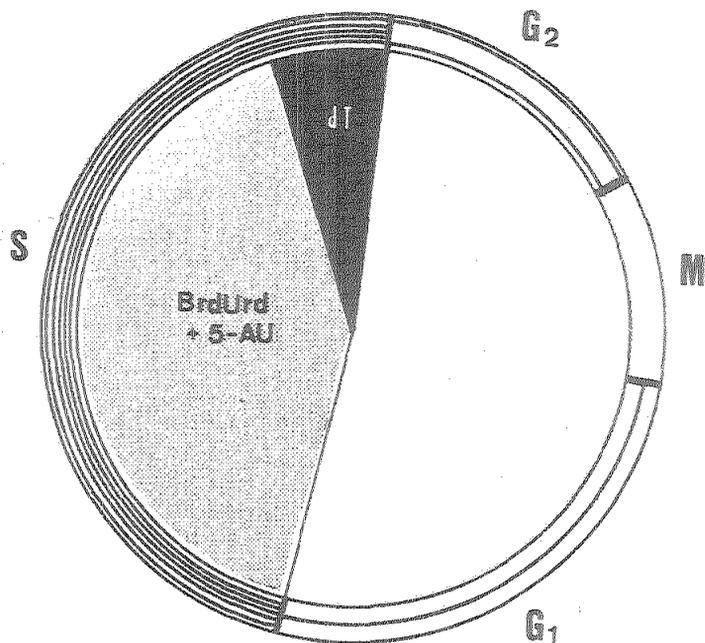


FIGURA 15.- Esquema en el que se representan las distintas fases del ciclo celular y los tratamientos necesarios para conseguir detectar las regiones del cromosoma que replican al final del periodo S. Area sombreada : tratamiento con BrdUrd y 5 A.U. durante el periodo S temprano y medio. Area oscura : Tratamiento con dT durante el periodo S tardío.

FIGURA 16.- Evolución del índice mitótico en una población meristemática tratada con 10^{-4} M de BrdUrd, 2.5 mM de 5-A.U. y 10^{-8} M de FdU y posterior recuperación en timidina normal.

Es evidente que durante el tratamiento la población celular disminuye hasta hacerse casi nula a partir de las ocho horas y que durante la recuperación de dicho tratamiento se obtiene una oleada de células en división más o menos sincrónica que alcanza su valor máximo hacia las diez horas de retirado el tratamiento.

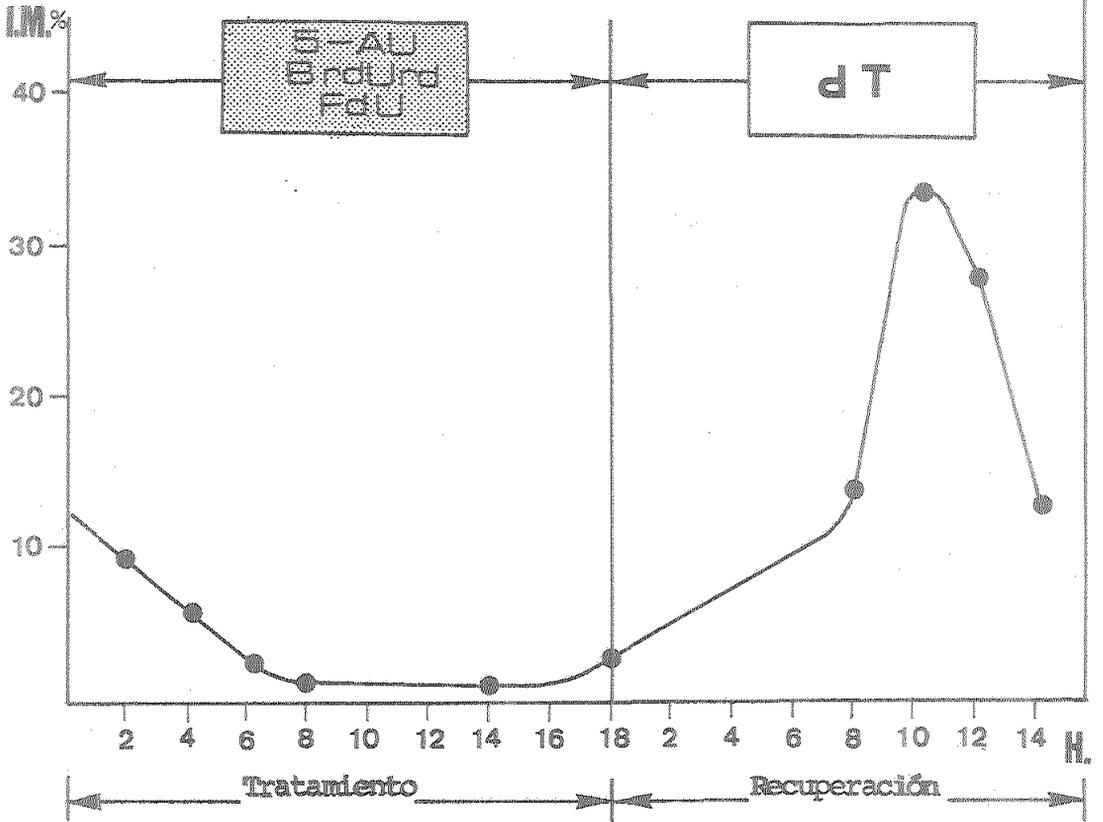


FIGURA 17.- Células meristemáticas de *Allium cepa* teñidas con orceína.

- a) Después de ocho horas de tratamiento con 5-AU. La actividad mitótica en el meristemo es nula.
- b) Después de diez horas de recuperación del anterior tratamiento un gran número de células meristemáticas se encuentran en división.

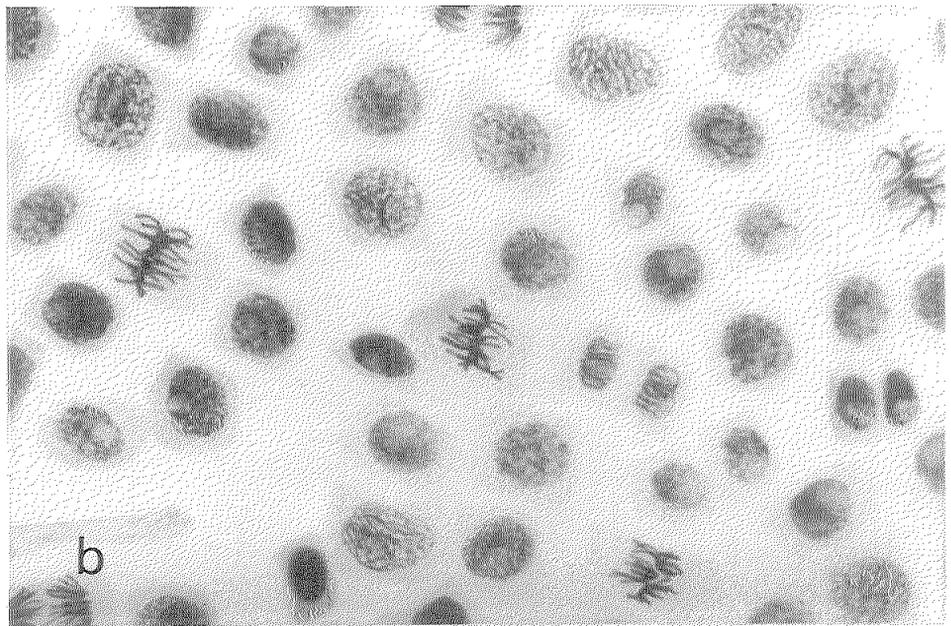
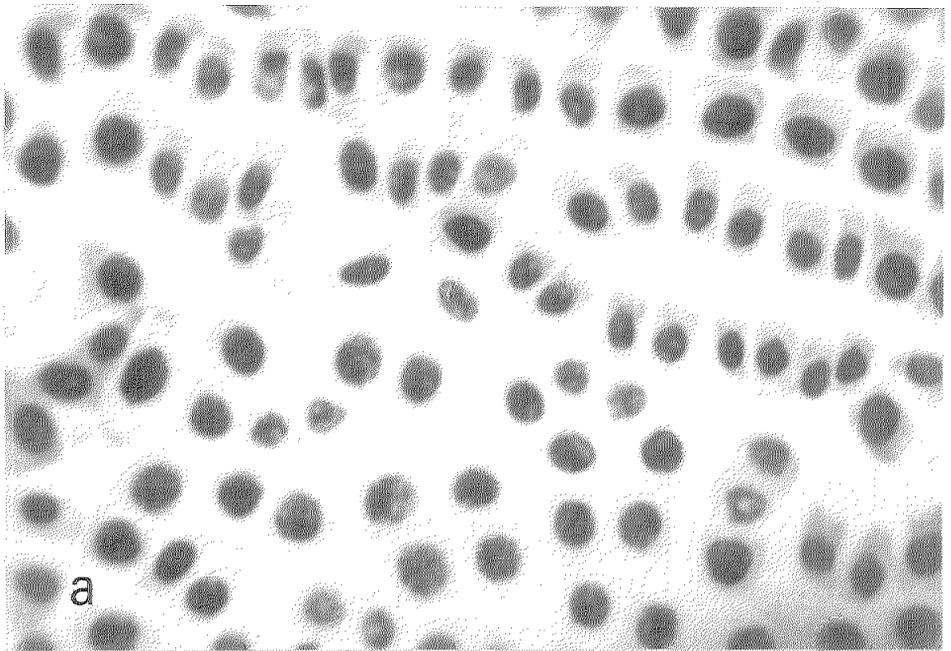


FIGURA 18.- Núcleos de células meristemáticas de *Allium cepa* mostrando el patrón de replicación tardía en dT. Los cromocentros más intensamente teñidos corresponden a esas regiones que replican al final del periodo S y muestran una clara polarización. En el margen inferior derecho se muestra en detalle un núcleo con el mencionado patrón morfológico de cromocentros intensamente teñidos.

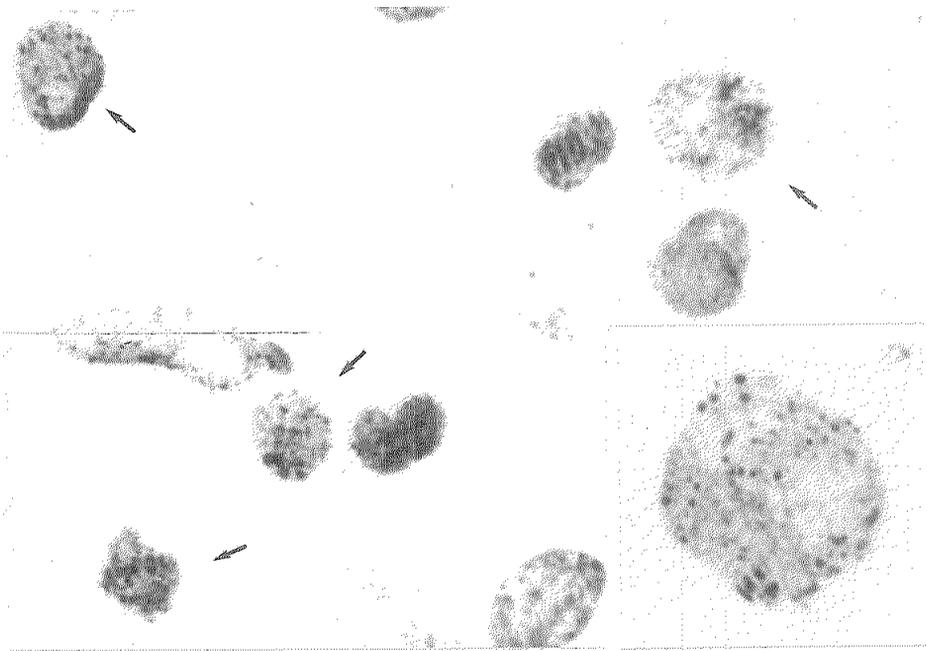


FIGURA 19.- Esquemas experimentales utilizados para estudiar, en el cromosoma satelizado de *Allium cepa*, la frecuencia y localización de los ICH_S .

Rectángulo blanco : un período S en $10^{-4}M$ de BrdUrd y $10^{-7}M$ de FdU.

Rectángulo oscuro : un periodo S en $10^{-4}M$ de dT.

a) Primer periodo S en BrdUrd y FdU y segundo en dT.

b) Dos periodos S consecutivos en BrdUrd y FdU.

c) Tratamiento con luz visible ($700 J/m^2/seg.$) a mitad del segundo periodo S, en presencia de dT.

d) Tratamiento con $3 \cdot 10^{-4}M$ de hidrazida maleica en el periodo G1 del segundo ciclo celular.

LV = luz visible.

HM = hidrazida maleica.

A la derecha de cada experimento se representa un cromosoma con la correspondiente moda de ICH_S obtenida.

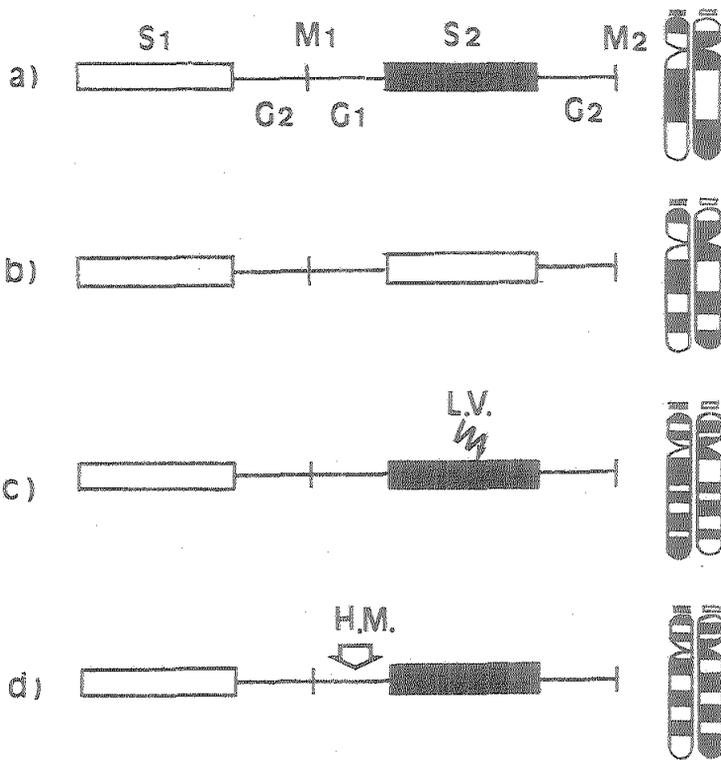


FIGURA 20.- Modelo de distribución de los ICH espontáneos e inducidos a lo largo de los 16 segmentos en los que fué subdividido el cromosoma satelizado de *Allium cepa* atendiendo a sus características heterocromáticas, eucromáticas o de replicación tardía de su ADN.

Ordenadas : número absoluto de ICH_s detectados en cada segmento cromosómico.

Las líneas horizontales paralelas al eje de abscisas representan los límites superior e inferior de confianza esperados en base a una distribución aleatoria de los ICH_s .

M y T, distribución de los intercambios espontáneos en cromosomas monosustituídos (BT-TT) y trisustituídos (BT-BB) respectivamente.

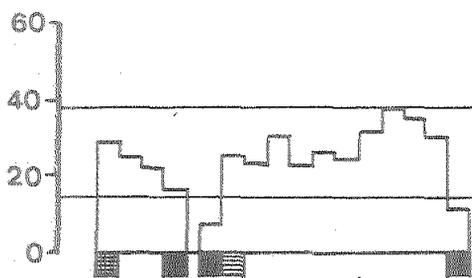
M(LV) y M(HM), distribución de los intercambios inducidos por luz visible e hidrazida maleica respectivamente, en cromosomas monosustituídos con BrdUrd.

 NOR_s

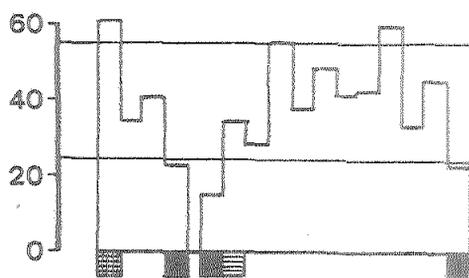
 Regiones ricas en ADN de replicación tardía pero no detectadas como heterocromáticas.

 Otras regiones heterocromáticas.  Otras regiones cromosómicas.

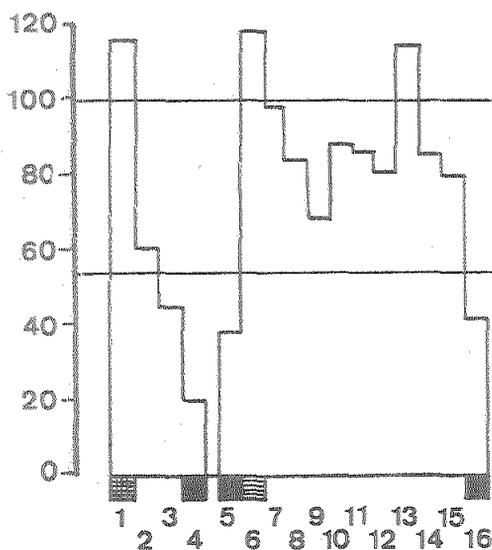
M



T



M(LV)



M(HM)

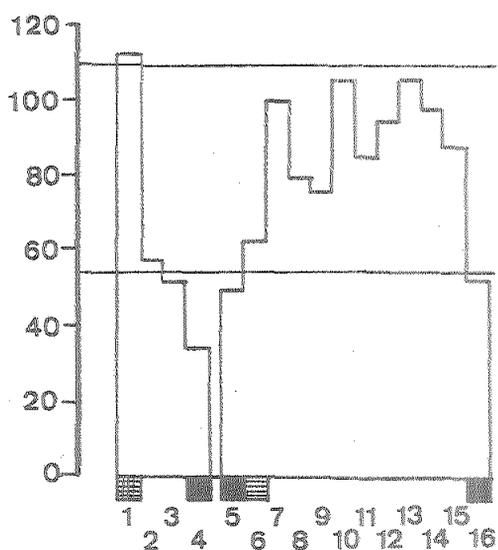


FIGURA 21.- Esquema representativo de como podría llegar a detectarse, a nivel citológico, una especial riqueza en pares de bases A-T en una región cromosómica determinada.

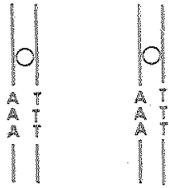
A.: en el supuesto que exista la mencionada riqueza especial en pares de bases.

B.: en el caso de una distribución aleatoria de las mismas.

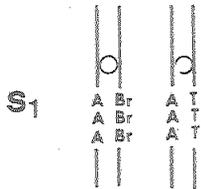
S. Periodos de síntesis de ADN.

M. Cromosomas en mitosis.

A



S



S₁

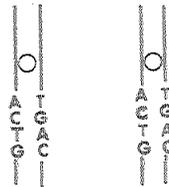
M₁



M₁

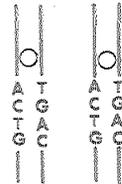


B



S

S₁



S₁

M₁



M₁



FIGURA 22.- Cariotipo de *Allium cepa* sometido a un tratamiento con BrdUrd durante veinte horas y teñido con Giemsa después de serle aplicado la metodología FPG (cromosomas M1).

Los cromosomas satelizados (flechas) y los demás cromosomas que forman el complemento muestran una tinción homogénea, lo cual parece indicar que no existen regiones especialmente ricas en A-T, detectables mediante esta metodología.

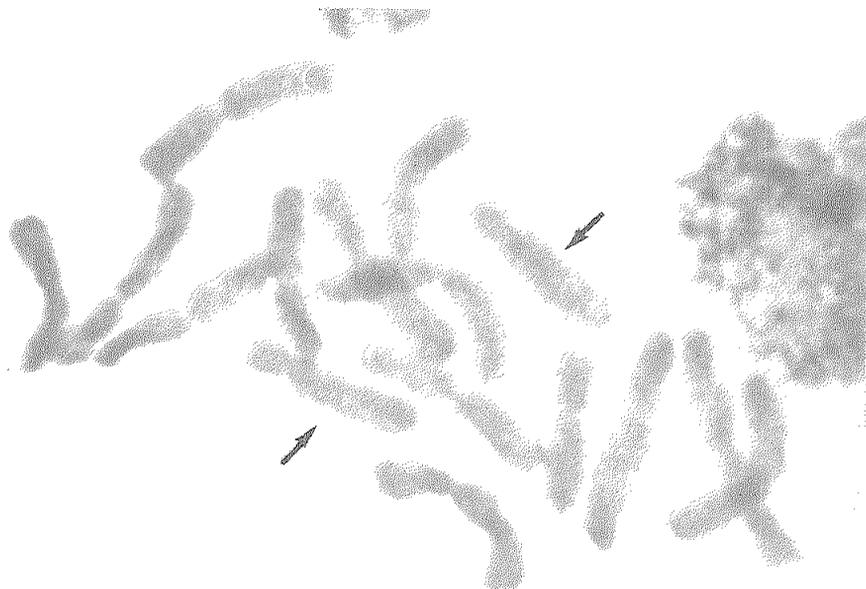


TABLA 4

Longitud aproximada de los cromosomas 1 - 8 de *Allium cepa* (porcentaje en relación a la longitud total del complemento) y valor medio del índice de brazos de cada cromosoma (n = 8).

cromosoma nº	% longitud			Índice de brazos		
1	7.63	±	0.03	1.69	±	0.03
2	7.09	±	0.04	1.86	±	0.02
3	6.68	±	0.04	1.56	±	0.02
4	6.37	±	0.03	1.50	±	0.05
5	6.17	±	0.02	1.15	±	0.13
6	6.17	±	0.03	2.73	±	0.03
7	5.04	±	0.03	1.04	±	0.04
8	4.62	±	0.03	1.56	±	0.03

TABLA 5

Comparación de las frecuencias de los ICH_s en cromosomas no satelizados y satelizados tras diferentes tratamientos.

Tratamiento ^a	Cromosomas no satelizados			Cromosomas satelizados			Test Z
	Cromosomas analizados	número de ICH _s	media de ICH _s ± EE	Cromosomas analizados	número de ICH _s	media de los ICH _s ± EE	
BT	300	880	2.93 ± 0.15	120	378	3.13 ± 0.16	z = -1.26 0.05 ≤ p ≤ 0.10
BB	300	1553	5.17 ± 0.16	120	588	4.90 ± 0.21	z = -1.42 0.05 ≤ p ≤ 0.10
BT (VL)	300	3243	10.81 ± 0.23	120	1210	10.09 ± 0.38	z = -2.04 0.05 ≤ p ≤ 0.10
BT (MH)	300	3396	11.24 ± 0.18	120	1230	10.25 ± 0.27	z = -2.01 0.05 ≤ p ≤ 0.10

a. BT: 1^{er} S en BrdUrd y 2º S en dT; BB: 1^{er} y 2º S en BrdUrd; BT (VL): tratamiento con luz visible en el 2º S en dT; BT (MH): tratamiento con hidrazida maleica en el G₁ del 2º ciclo celular

3.- INTERCAMBIOS ENTRE CROMATIDAS HERMANAS Y ESTRUCTURA DEL CROMOSOMA

La incorporación de BrdUrd en los cromosomas y su posterior detección citológica por medio de la técnica FPG aparte de su gran utilidad para la observación y el análisis de los ICH_s , facilita el poder observar detalles que pueden suministrar información acerca de la organización de la cromatina en los cromosomas metafásicos. La existencia de intercambios de material cromosómico cuya amplitud es inferior a la de la cromátida fue demostrada por primera vez por Kihlman (1975) (90) en cromosomas metafásicos de *Vicia faba* luego de una ronda de replicación en BrdUrd seguida de otra en ausencia del análogo (es decir, en cromosomas con una constitución TT-TB). Dicho autor propuso que este tipo de segmentos intercambiados sería el resultado de la ocurrencia de dos ICH_s muy próximos entre sí a lo largo de la fibra de cromatina. En los cromosomas de *Allium cepa* también es frecuente observar dichos intercambios puntuales (Schvartzman y Cortés, 1977; Schvartzman y col., 1978; Cortés y Hazen, 1981) (157) (160) (30). Con este material, los resultados de un análisis estadístico de las distancias entre dos intercambios apoyaron la hipótesis de Kihlman (1975) (90) en el sentido de que los segmentos intercambiados que abarcan menos del ancho de la cromátida son consecuencia de dos ICH_s muy próximos (Schvartzman y col., 1978) (160).

Nosotros hemos observado dichos intercambios puntuales y en la figura 23 pueden verse varios cromosomas teñidos diferencialmente después de la incorporación de BrdUrd durante un período de síntesis de ADN (cromosomas TT-TB) ó bien durante dos rondas consecutivas de replicación (cromosomas TB-BB). Puede observarse que, aunque se presenten a un mismo nivel en ambas cromátidas hermanas, la posición relativa de uno con respecto al otro puede variar, presumiblemente debido a torsiones de la cromátida a nivel del centrómero. Por otra parte, la amplitud de estos intercambios puntuales puede variar, de

manera que algunos abarcan la casi totalidad de la anchura de la cromátida mientras que otros se encuentran casi al límite de resolución del microscopio óptico. Todas estas observaciones están de acuerdo con los resultados de Schwartzman y col., (1978) (160), así como también el hecho de que las dimensiones longitudinales de los segmentos intercambiados permanecen bastante constantes, siendo del orden de aproximadamente 0.5 μ m. En ningún caso se observaron variaciones en cuanto a la extensión longitudinal de los segmentos.

Aparte de estos intercambios puntuales, nosotros hemos detectado la presencia de regiones cromosómicas de replicación tardía de características similares a los segmentos intercambiados. Cuando se permite que las células lleven a cabo su período S temprano y medio incorporando BrdUrd y se le suministra dT para que efectúen su replicación tardía incorporándola, se consigue, como vimos, una tinción preferencial con Giemsa de las regiones cromosómicas ricas en ADN replicado al final del S. Este procedimiento es el idóneo para detectar pequeñas bandas de replicación, ya que en caso de llevarse a cabo la replicación tardía en BrdUrd luego de incorporarse dT, pequeñas bandas ricas en BrdUrd (poco teñidas) quedarían enmascaradas al encontrarse con un fondo intensamente teñido. En los cromosomas de *Allium cepa* las regiones cromosómicas ricas en ADN de replicación tardía corresponden a los telómeros, regiones pericentroméricas y a un cierto número de bandas intersticiales, como puede apreciarse en la figura 24 en la que se muestra un grupo de cromosomas metafásicos con bandas como resultado de incorporarse BrdUrd únicamente durante la replicación temprana y media. Como puede verse en la figura 25, se detectan en determinados cromosomas, por ejemplo en los pares 4 y 7, segmentos de replicación tardía (SRT) que se encuentran al mismo nivel de ambas cromátidas, intensamente teñidos sobre fondo claro. Estos SRT comparten con los intercambios puntuales una serie de propiedades. Aparte de la localización en ambas cromátidas que hemos señalado, su posición relativa puede variar, así como su amplitud a lo ancho de la cromátida

Por el contrario, como ocurre con los intercambios puntuales sus dimensiones longitudinales son muy constantes, asimismo de aproximadamente 0.5 μm y en ningún caso se observó variación longitudinal de estos SRT. Dado que los SRT detectados son regiones cromosómicas preferentemente no bromosustituídas cabe pensar que en ellas la estructura del cromosoma está relativamente bien conservada, ya que las fibras de nucleoproteínas bromosustituídas son las que sufren una degradación preferencial al aplicar la técnica FPG. No obstante lo anterior, hay que tener en cuenta que los tratamientos a que son sometidos los cromosomas, fundamentalmente la fijación, provocan alteraciones en los mismos..

Un tercer detalle apreciado en los cromosomas bromosustituídos, a añadir a los intercambios puntuales y a los SRT ya mencionados, lo constituye la observación de que, en ocasiones, la trayectoria de un intercambio a través de la cromátida no es rectilínea, sino que adopta la forma de una línea quebrada. En un intento de proponer una denominación las llamaremos en adelante intercambios discontinuos (Fig. 26).

Por nuestra parte, hemos llevado a cabo el análisis del patrón morfológico que presentan estos intercambios, tanto en lo que se refiere a una sola cromátida como teniendo en cuenta ambas cromátidas a un determinado nivel. Como puede apreciarse en la figura 27, hemos empleado para nuestro análisis tanto cromosomas de la segunda mitosis (M2) como de la tercera (M3).

Si consideramos una sola cromátida, la imagen que se observa responde a dos tipos diferentes no superponibles (Figs. 27a y b). Como puede verse, en unos casos el perfil adopta la forma de una L (Fig. 27b), mientras que en otras ocasiones se trata de una imagen simétrica de esta última (Fig. 27a).

Con objeto de ver como se presentan estos intercambios discontinuos en ambas cromátidas y comparar la imagen que adoptan en una y otra hemos seleccionado cromosomas de segunda mitosis (M2)

ya que en los de tercera mitosis (M3) sólo podríamos apreciar éstos detalles en el caso de tratarse de intercambios recíprocos. Como era de esperar, en ambas cromátidas se presenta un intercambio discontinuo al mismo nivel (Fig. 27c), como ocurre en general con cualquier tipo de intercambio. Atendiendo al patrón morfológico que se observa en una cromátida y en su cromátida hermana, luego de estudiar 60 cromosomas pudimos comprobar que en el 82 por ciento de los casos las imágenes son simétricas, mientras que en el 18 por ciento restante en ambas cromátidas el patrón resultó ser idéntico (Fig. 28).

Si atendemos a dos intercambios discontinuos adyacentes en un determinado brazo cromosómico, puede encontrarse, asimismo, dos patrones morfológicos distintos, como puede verse en la figura 27d y e.

En ocasiones ocurre que dos intercambios adyacentes se dan de tal forma que terminan a la misma altura siguiendo el eje longitudinal de la cromátida, observándose en este caso una imagen como la mostrada en la figura 29. También en este caso en la cromátida hermana puede apreciarse una imagen simétrica, o bien el mismo patrón morfológico en ambas cromátidas hermanas.

FIGURA 23.- Intercambios puntuales en los cromosomas de *Allium cepa* (flechas).

La amplitud de los intercambios puntuales no llega a alcanzar la anchura total de la cromátida; sin embargo, sus dimensiones longitudinales son aproximadamente constantes del orden de 0,5 μm .

La barra representa 10 μm .

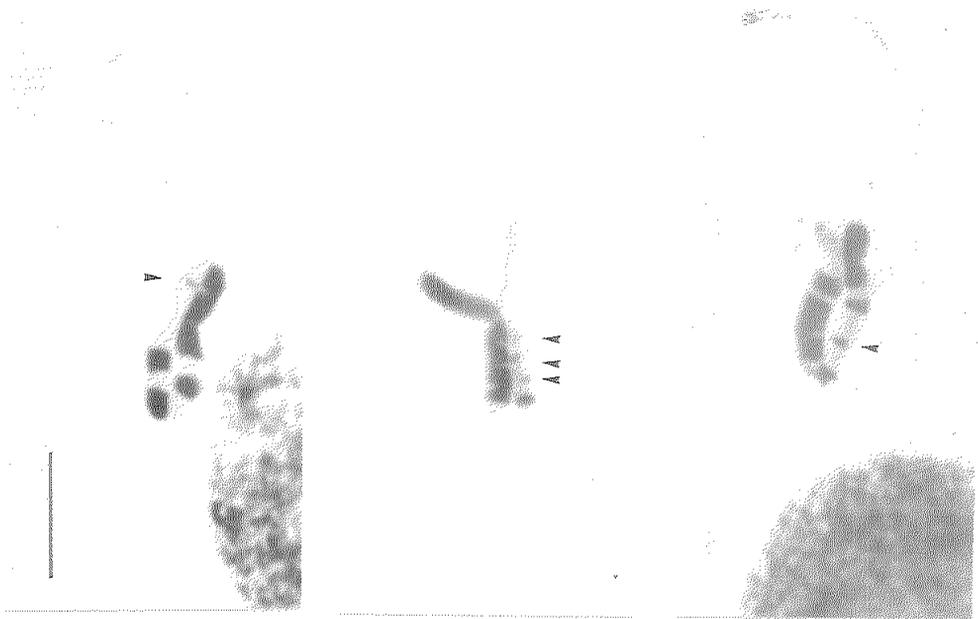


FIGURA 24.- Grupo de cromosomas metafásicos de *Allium* cepa con tinción preferencial de las regiones cromosómicas que replicaran incorporando dT al final del periodo S tras incorporar BrdUrd. Como puede verse, estas corresponden principalmente a las regiones pericentroméricas y teloméricas así como algunas bandas intersticiales.

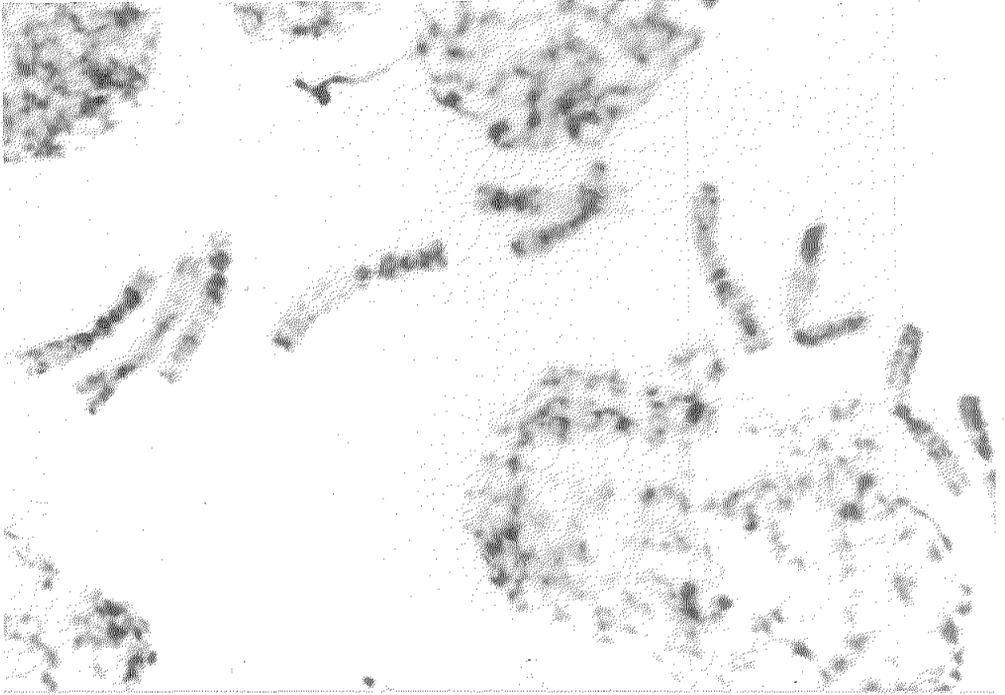


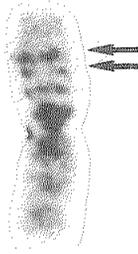
FIGURA 25.- Cromosomas de *Allium cepa* mostrando segmentos de replicación tardía (SRT) que abarcan menos del ancho de la cromátida (flechas).

Estos SRT comparten con los intercambios puntuales muchas de sus características, como el espesor de aproximadamente $0.5 \mu\text{m}$ y la variabilidad en cuanto a su dimensión transversal en la cromátida.

La barra representa $10 \mu\text{m}$.



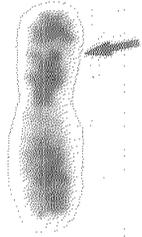
a



b



c



d

FIGURA 26.- Intercambios discontinuos (ID).

a) Grupo de cromosomas teñidos diferencialmente después de dos periodos de síntesis incorporando BrdUrd en el ADN. Obsérvese que varios cromosomas presentan este tipo especial de ICH_s (flechas).

b) c) y d) Distintos cromosomas en los que puede apreciarse claramente intercambios discontinuos (flechas). Obsérvese como la imagen que se presenta en una y otra cromátida parece ser simétrica.

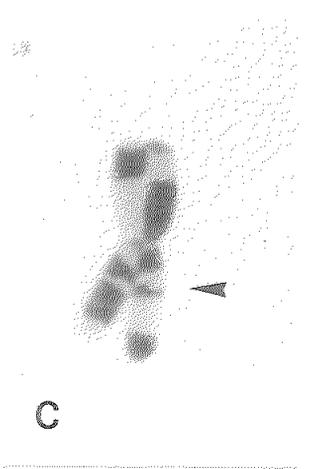
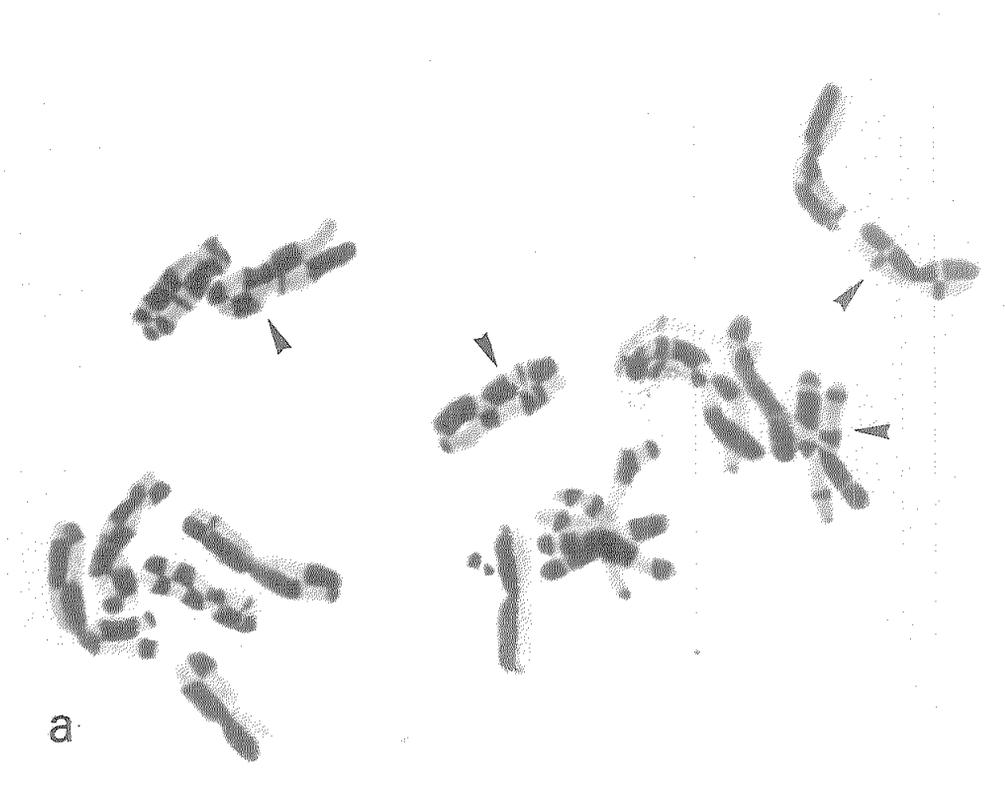


FIGURA 27.- Distintos patrones morfológicos que pueden presentar los intercambios discontinuos (ID).

a) y b) cromosomas de M3 en los que se presentan dos tipos morfológicos diferentes de ID. Mientras que en el segundo caso el perfil parece adoptar forma de L, en el primero la imagen parece ser la simétrica.

c) intercambios discontinuos considerando ambas cromátidas hermanas en cromosomas de M2. Los ID se presentan en ambas cromátidas a un mismo nivel.

d) y e) Dos patrones morfológicos distintos que pueden darse considerando dos intercambios discontinuos adyacentes.

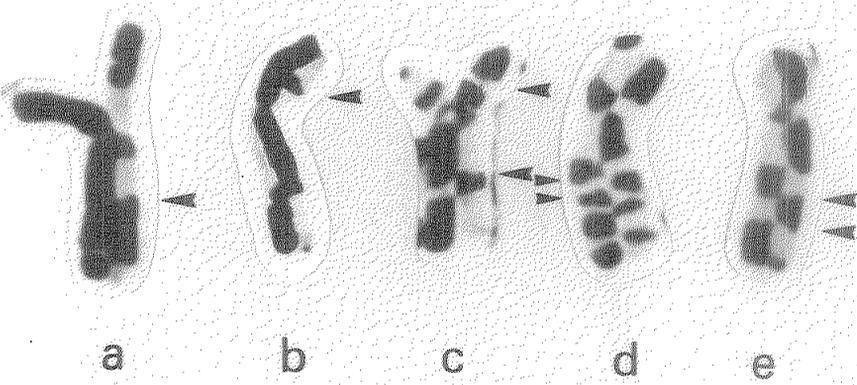


FIGURA 28.- Intercambios discontinuos.

Tres casos en los que puede observarse ID en ambas cromátidas de los cromosomas. Obsérvese que en este caso en ambas cromátidas se presenta el mismo patrón morfológico (no existe imagen especular). Comparar con la figura 26 b, c y d.

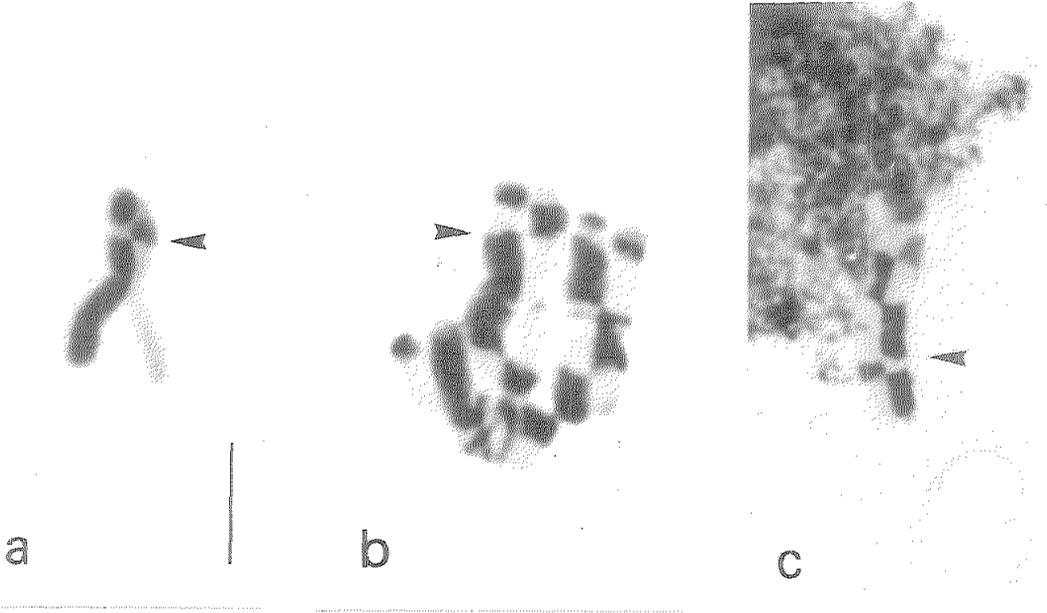
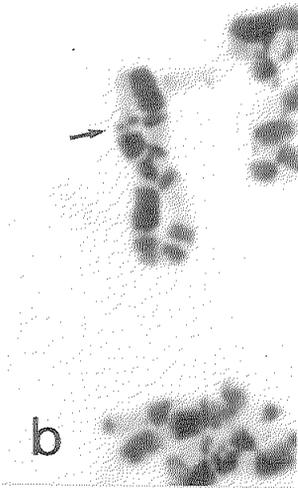
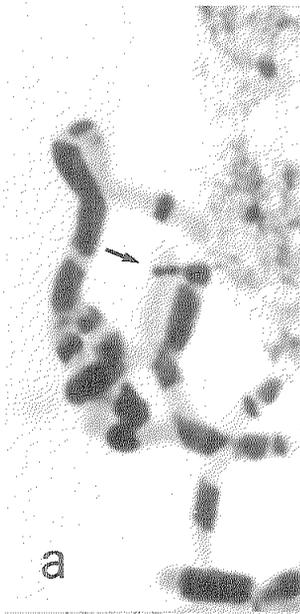


FIGURA 29.- Cromosomas que presentan un tipo particular de intercambios discontinuos. También aquí considerando ambas cromátidas hermanas, en unos casos parecen presentar imágenes simétricas (b), mientras que en otras el patrón morfológico es el mismo (c).



DISCUSION.

ACERCA DEL PAPEL DE LA TIMIDINA, URIDINA Y FLUORODESOXIURIDINA EN LA PRODUCCION DE INTERCAMBIOS ENTRE CROMATIDAS HERMANAS.

A la hora de discutir los resultados obtenidos en cuanto a la producción de intercambios bajo diferentes condiciones experimentales nos encontramos con la dificultad que representa el casi total desconocimiento que aún tenemos hoy en día acerca del mecanismo molecular mediante el cual ocurren los ICH_S , así como del significado biológico de los mismos. En orden a contribuir, en nuestra medida a un mejor conocimiento acerca de estas cuestiones, nosotros hemos estudiado la capacidad de la dT, la Urd y FdU, nucleósidos habitualmente empleados en los experimentos diseñados para conseguir la tinción diferencial de cromátidas hermanas, en cuanto a provocar o no intercambios en nuestro material de trabajo.

Es bien sabido que pueden inducirse ICH_S bien por agentes que actúan directamente sobre el ADN o bien por medio de una acción indirecta. Entre los primeros se encuentra la radiación ultravioleta

(Kato, 1973; Wolff y col., 1974; Natarajan y col., 1980) (80) (198 (122), las radiaciones ionizantes, aunque en menor medida (Perry y Evans, 1975; Hollstein y col., 1979) (138) (70) y diversas sustancias químicas incluyendo agentes intercalantes (Banerjee y Benedict, 1979; Speit y Vogel, 1979) (6) (172) y alquilantes (Latt, 1973; Perry y Evans, 1975) (98) (138). Entre los agentes cuya acción sería indirecta, por otra parte, se encuentran algunos inhibidores de la biosíntesis de desoxiribonucleótidos, tales como la FdU (Kihlman y Kronborg, 1975; Kato, 1977b; Sono y Sakaguchi, 1980) (91) (87) (170), la hidroxiaurea (Kato, 1977b; Ishii y Bender, 1980) (87) (77) y ametopterina (Banerjee y Benedict, 1979) (6), los cuales provocarían una perturbación metabólica que resultaría en una inducción de ICH_s.

Los resultados publicados por los diferentes investigadores acerca de la posibilidad de inducir ICH_s por medio de la dT han sido bastante contradictorios. Así, en células de hamster chino, Davidson y col., (1980) (35) observaron que la dT no tenía efecto alguno en el rango 0 - 360 μ M y, por otra parte, Wilmer y Natarajan (1981) (192) tampoco consiguieron inducir ICH_s con dT a concentraciones extremadamente altas (de hasta $9 \cdot 10^{-3}$ M). Por el contrario, Perry (1983) (139) en este mismo material, ha observado recientemente un incremento en la frecuencia de los ICH_s dependiente de la dosis, siendo ésta de hasta 100 μ M. Dado que este efecto podría ser revertido totalmente mediante la adición de desoxicitidina (dC), dicho autor propuso que el balance existente en cuanto a los precursores del ADN jugaría un papel muy importante para que dicho ADN pudiera sintetizarse normalmente, de manera que cuando hay desequilibrios en el mencionado balance, la replicación no sería fiel y habría, como consecuencia, errores en dicha replicación que serían el origen de los ICH_s. Esta sería la explicación de porqué agentes químicos que no dañan directamente al ADN podrían provocar ICH_s (Davidson y col., 1980) (35).

Mientras que Davidson y col., (1980) (35) y Perry (1983) (139) emplearon la dT simultáneamente con la BrdUrd durante dos rondas de replicación sucesivas, Wilmer y Natarajan (1981) (192) lleva-

ron a cabo tratamientos con diferentes concentraciones de dT sólo durante un ciclo celular después de que las células incorporasen BrdUrd. Nosotros hemos seguido este último esquema experimental y, contrariamente a lo publicado por Perry (1983) (139) no hemos podido observar que la dT indujese intercambios a ninguna de las concentraciones ensayadas (hasta 10^{-2} M). La dT en exceso (a concentraciones superiores a 10^{-3} M) se sabe que bloquea la síntesis de ADN en mamíferos, debido probablemente al efecto inhibidor que tiene la timidina trifosfato (dTTP) sobre la enzima ribonucleótido difosfato reductasa, impidiendo así la reducción de citidina difosfato (CDP) a desoxicitidina difosfato (dCDP), precursor del ADN. Por nuestra parte, hemos observado un retraso bastante importante en la duración del ciclo celular cuando empleábamos dT a concentraciones más altas de 10^{-3} M.

Entre los modelos moleculares que se han propuesto hasta la fecha para explicar la ocurrencia de intercambios el que ha recibido mayor aceptación ha sido el publicado por Painter (1980) (130). De acuerdo con dicho modelo (Fig. 30), los ICH_s ocurrirían exclusivamente en las uniones entre grupos de replicones, en aquellos casos en que dicha zona separase un replicón totalmente replicado y otro en proceso de replicación. Espontáneamente ocurrirían roturas de doble cadena que se separarían luego ligándose de nuevo probablemente con intervención enzimática de topoisomerasas tipo II. En ocasiones, en lugar de volverse a unir en la conformación original, se unirían las cadenas hijas de la parte replicada con las parentales del replicón aún no replicado. En base a este modelo, mientras más tiempo persista la situación de que unos replicones están en fase de replicarse mientras que otros han completado la replicación, mayor es la probabilidad de que ocurran ICH_s . De hecho, este modelo predice que aquellos agentes que bloquean ó entorpecen el progreso de la horquilla de replicación, una vez iniciada la misma, alargando la duración del período S, deben ser capaces de inducir ICH_s . De hecho, esto podría ser cierto para las lesiones provocadas por los agentes alquilantes, la luz ultravioleta y el benzo (a) pireno, por ejemplo, así como para

En orden a analizar cualquier posible efecto de la Urd en nuestro material de trabajo en cuanto a inducir ICH_s , sometimos a las células a tratamientos con concentraciones crecientes del nucleósido aplicándolo simultáneamente con la BrdUrd durante dos rondas de replicación sucesivas. Como pudimos ver, en ningún caso se elevó la media de los ICH_s por encima de los valores control. Por el contrario, los valores fueron siempre algo superiores a los observados cuando la BrdUrd se encontraba sola. Dichas diferencias resultaron ser estadísticamente significativas (t de Student, $P < 0.01$). Ello parece indicar que la adición de Urd exógena simultáneamente con la BrdUrd inhibiría en cierta medida la ocurrencia de ICH_s . En nuestra opinión una primera explicación para la modificación introducida por la Urd en cuanto a la frecuencia de ICH_s podría deberse a un efecto metabólico, en este caso disminuyendo en lugar de aumentar dicha frecuencia, sin que resultase afectada directamente la composición del ADN. Alternativamente otra explicación sería que, en presencia de la Urd, se viese algo disminuida la tasa de incorporación de BrdUrd en el ADN. En este sentido, se sabe que, en general, la Urd y la dC puede transformarse en desoxitimidina monofosfato (dTMP) a través de desoxiuridina monofosfato (dUMP) con participación de varias enzimas entre las que se encuentra la timidilato sintetasa (Kornberg, 1980) (97). De este modo, la dT formada a partir de la Urd podría competir con la BrdUrd e incorporarse una menor cantidad de esta última en el ADN, con lo cual ocurrirían menos ICH_s .

El efecto mejor conocido a nivel celular de la FdU es el inhibir muy eficazmente la metilación del ácido desoxiuridílico (UrdMP), en la porción 5, para que este se transforme en ácido timidílico (dTMP) reacción catalizada por la enzima timidilato sintetasa (Cohen y col., 1958) (25), y por ello se ha empleado para favorecer la incorporación de BrdUrd en el ADN, sobre todo en células vegetales (Kihlman y Kronborg, 1975; Schwartzman y Cortés, 1977) (90) (457). A diferencia de otros nucleósidos halogenados en la posición 5, como

la relación que existe entre la temperatura de cultivo y la frecuencia de intercambios (mayor frecuencia cuanto más baja sea la temperatura) (Gutierrez y col., 1981) (63).

Nosotros hemos observado no obstante que, pese al claro alargamiento en la duración del ciclo de división al emplear concentraciones altas de dT, presumiblemente por perturbación metabólica, no se observó un incremento en la frecuencia de ICH_S . Estos resultados parecen indicar que no basta con provocar una mayor duración del periodo S para elevar la frecuencia de ICH_S , aunque existan evidencias experimentales en este sentido. Esta conclusión, en principio, no tiene porque estar en contradicción con el modelo propuesto por Painter (1980) (130). Lo que parece indicar es que para que se induzcan intercambios al margen de los que podrían considerarse puramente espontáneos y aquellos debidos al BrdUrd, no sería condición suficiente un alargamiento del tiempo necesario para llevar a cabo la replicación.

La Urd ha sido empleada en la metodología para lograr la tinción diferencial de cromátidas hermanas con objeto de contrarrestar cualquier posible efecto negativo de la FdU sobre la síntesis de ARN, tanto en células animales (Latt, 1973) (78) como vegetales (Kihlman y Kronborg, 1975; Schwartzman y Cortés, 1977) (91) (157). Empleando células D-6 de hamster chino, Suzuki y col., (1982) (179) observaron que la Urd sola, cuando se administraba después de una primera ronda de replicación en BrdUrd no era capaz de inducir ICH_S . Por otra parte, Yosida y col., (1983) (199) empleando una variante de las células V-79 de hamster chino, la línea UR-216 que requiere Urd, observaron que cuando las células se encontraban en un medio carente de Urd la frecuencia de ICH_S era aproximadamente el doble de la observada cuando se suplementaba el medio con Urd. Basándose en dicho resultado, estos últimos autores propusieron que la alta frecuencia de ICH_S en las células privadas de Urd podría ser atribuida a una perturbación metabólica.

la clorodesoxiuridina (CldU) ó la iododesoxiuridina (IdU), la FdU no se incorpora en el ADN, ya que es reconocido por las células como Urd (Szybalsky, 1974; Goz, 1978) (181) (59). Han sido varios los autores que han publicado que el nucleosido FdU es capaz de provocar aberraciones cromosómicas (Sono y Sakaguchi, 1978) (169), así como ICH_s (Kihlman y Kronborg, 1975; Galloway, 1977; Sono y Sakaguchi, 1978; Suzuki y col., 1982) (91) (53) (169), mientras que la base, el fluorouracilo (FU) parece ser mucho menos eficaz (Sono y Sakaguchi, 1978; Musilová y col., 1979; Düker, 1981) (169) (119).

Diferentes autores han propuesto que el incremento en la frecuencia de ICH_s al incrementar la concentración de FdU en la solución de BrdUrd podría muy bien deberse a un incremento en la incorporación de BrdUrd debido a la eficaz inhibición ejercida por la FdU sobre la timidilato sintetasa, más que a un efecto directo de la FdU por sí misma (Kihlman y Kronborg, 1975; Galloway, 1977) (91) (53). La mayor eficacia de la FdU comparada con el FU en cuanto a inducir ICH_s y aberraciones cromosómicas podría atribuirse a la más estrecha relación metabólica existente entre la FdU y el ADN (Sono y Sakaguchi, 1978) (169). En los cromosomas de *Vicia faba*, Kihlman y Kronborg (1975)(91) observaron que la FdU inducía ICH_s eficazmente a la concentración de $10^{-7} M$ y superiores. En *Allium cepa* nosotros hemos confirmado que cuando la FdU se suministra simultáneamente con la BrdUrd manteniéndose constante la concentración de esta última, durante dos rondas de replicación sucesivas la frecuencia de ICH_s observada depende de la dosis de FdU, alcanzándose una saturación para una concentración de FdU de $5 \cdot 10^{-7} M$. También pudimos observar que a concentraciones de FdU por encima de $10^{-6} M$ la actividad proliferativa en el meristemo resulta fuertemente afectada, de manera que las mitosis son insuficientes para cuantificar los ICH_s . Cuando se emplea la dosis de FdU más eficaz en la inducción de ICH_s que no afecte negativamente a la proliferación ($5 \cdot 10^{-7} M$) pero, en lugar de durante dos ciclos sucesivos, únicamente durante la primera ronda de replicación ó, alternativamente, durante la segunda, la efectividad varía dependiendo del ciclo en que la FdU este pre-

sente. Así, cuando el inhibidor está presente sólo durante la primera ronda de replicación, la tasa de ICH_s en la segunda mitosis es claramente superior que cuando se trata únicamente durante la segunda ronda

En células de hamster chino, Natarajan y col. (1981) (123), emplearon simultáneamente con la BrdUrd inhibidores de la poli-(ADP-ribosa)-polimerasa, tales como la 3-aminobenzamida y la benzamida, con lo cual se reduce en las células la capacidad de reparar lesiones en el ADN. Tratando con dichos inhibidores durante sólo el primer ciclo, sólo el segundo ciclo ó durante ambos, llegaron a la conclusión de que la mayoría de los ICH_s inducidos parecen formarse durante la segunda ronda de replicación, en la cual se usa como molde ADN que contiene BrdUrd, mientras que en la primera ronda el ADN parental no está bromosustituído. Por otra parte, Dillehay y col. (1983) (38) llegaron también a la conclusión de que la mayoría de los muchos ICH_s basales que ocurren en el mutante EM9 de hamster chino (12 veces el valor encontrado en no mutantes) parecen ser una consecuencia del BrdUrd incorporado, y ocurrirían durante la replicación del ADN que contiene BrdUrd en una cadena parental (durante la segunda ronda). Asimismo, O'Neill y col. (1983) (128) han alcanzado idénticas conclusiones, aunque por otro camino. Estos autores se han basado en que la CldU induce del orden de 7-8 veces más ICH_s que la BrdUrd a igual nivel de sustitución por la dT en células en cultivo de ovario de hamster chino. Suministrando a las células alternativamente CldU o BrdUrd durante el primero ó el segundo ciclo, observaron que la frecuencia de ICH_s dependía claramente de cual de los dos nucleósidos halogenados había estado presente durante la primera ronda de replicación por lo que concluyeron que la inducción de ICH_s parece depender sólo de la replicación del ADN análogo-sustituído durante el segundo S.

Mediante el análisis de los intercambios "gemelos" (ocurridos durante el primer S) y "simples" (ocurridos en el segundo S) en cromosomas endorreduplicados de células de síndrome de Bloom, Shiraishi y col. (1983) (165), dado que se detectaban del orden de 12 ICH_s "simples" por cada ICH "gemelo", llegaron a la conclusión de que en este

tipo de células la mayoría de los ICH_S ocurren durante el segundo ciclo celular. Esto contrasta con lo observado por otros autores en los linfocitos de individuos normales en los cuales parecen ocurrir los ICH_S con igual frecuencia en ambos ciclos celulares. Como hemos visto antes, nuestros propios resultados también sugieren que la mayoría de los ICH_S inducidos por la FdU ocurren durante la replicación del ADN bromosustituído durante la segunda ronda de replicación (cada dúplex de ADN que se ha de replicar durante el segundo S consta de una cadena bromosustituída y otra no sustituida) y esto parece deberse, con toda probabilidad, a que el aumento en la cantidad de BrdUrd incorporada durante el periodo S anterior, como consecuencia del efecto inhibitor del FdU sobre la timidilato sintetasa, sería responsable de que ocurriesen muchos ICH_S . Esta hipótesis resultó apoyada por los resultados obtenidos al mantener a las células durante tres rondas consecutivas en presencia de BrdUrd. Es bien sabido que en estas células se detectan dos tipos de ICH_S ; los llamados "recíprocos", ocurridos durante el tercer periodo S y los "no recíprocos", ocurridos durante el primer ó segundo S. Cuando la FdU que suministrada durante el segundo S, era de esperar que si el efecto en cuanto a la inducción de ICH_S tuviese lugar en el mismo ciclo en que el inhibidor está presente, aumentaría la frecuencia de ICH_S "no recíprocos" con respecto a los valores control. Por el contrario, lo que sufrió un incremento fué la frecuencia de ICH_S "recíprocos", es decir, los ocurridos durante el S siguiente a aquel en que estaba presente la FdU.

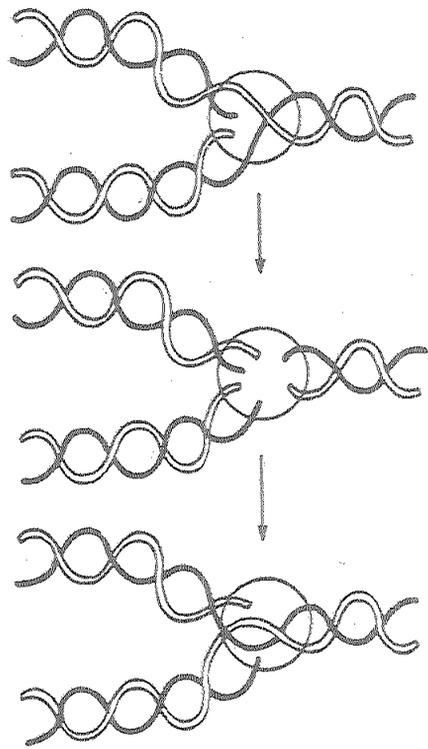
En cuanto a que la inducción de ICH_S por la FdU se deba a una mayor incorporación de BrdUrd en el ADN, en nuestro caso los resultados experimentales que parecen apoyarlo. En primer lugar, cuando la dT se suministra simultáneamente con la BrdUrd y la FdU durante los dos ciclos sucesivos de frecuencia de ICH_S experimenta un descenso comparada con la observada para la BrdUrd y FdU, lo cual es lo que cabría esperar de una menor incorporación de BrdUrd en el ADN debido a la competencia de la dT. Además puede comprobarse que aumentando la concentración de dT en el medio disminuye la frecuencia de ICH_S . En se-

gundo lugar, hemos visto que para que la FdU induzca eficazmente ICH_S (en la ronda siguiente a aquella en la que se trata) ha de estar presente también la BrdUrd, puesto que cuando tratamos con FdU sólo ó con FdU y dT durante el tiempo correspondiente a un ciclo completo antes de suministrar la BrdUrd, sólo se produce un pequeño incremento en la tasa de ICH_S , que podría por otra parte ser debido a un efecto residual que diese lugar a una incorporación de BrdUrd sólo algo superior a la que tiene lugar en los controles en ausencia de FdU. Es decir, que una pequeña cantidad de FdU podría aún estar presente en la célula cuando se suministra BrdUrd, estimulando en pequeña medida la incorporación del nucleósido en el ADN.

En resumen, todos estos resultados sugieren que la incorporación de BrdUrd en el ADN es la responsable de la mayoría de los ICH_S inducidos por la FdU así como que dichos ICH_S se formarían cuando tiene lugar la replicación de ADN parental que está bromosustituído. No obstante, sabemos que la presencia de BrdUrd en el ADN parental no es un requisito previo para que ocurran los ICH_S llamados basales, como ha podido verse al observar ICH_S "gemelos" (ocurridos durante el primer ciclo de división) en células tetraploides inducidas con colcemida (Taylor, 1958) (183) o en células endorreduplicadas (Wolff y Perry, 1975) (197) así como en cromosomas de la tercera mitosis (M3) por medio de la tinción diferencial en tres tonos (Miller y col., 1976; Schwartzman y Goyanes, 1980; Tsuji y Kato, 1981) (116) (159) (188). Estos ICH_S del primer ciclo, evidentemente, ocurren cuando el ADN parental no se encuentra bromosustituído. En base a esto, podemos proponer que si el mecanismo molecular que opera cuando las cadenas parentales no están bromosustituídas es el mismo que cuando lo están, la presencia de una alta tasa de BrdUrd en una cadena parental parece potenciar la ocurrencia de ICH_S . Otra explicación alternativa podría ser que los ICH_S pudiesen ocurrir en ambos casos por mecanismos moleculares diferentes. En cualquier caso, parece que el medio en el cual se va a desarrollar la replicación del ADN bromosustituído (durante el segundo S) juega también un papel importante ya que si admitimos

que los ICH_s inducidos por FdU son en realidad formados en la siguiente ronda de replicación, cuando replica el ADN parental ya altamente bromosustituído y el tratamiento con FdU no tiene efecto sobre la producción de ICH_s en la misma ronda de replicación en la que está presente, sería de esperar que la frecuencia de intercambios en cromosomas de M2 que han sido tratados con BrdUrd y FdU durante el primer S sea similar independientemente de si en el segundo S la FdU esta o no presente. Sin embargo cuando en la segunda replicación no esta presente la FdU no se alcanzaran cotas tan extremadamente altas en la tasa de producción de ICH_s como cuando lo está. Esto parece poner de manifiesto alguna clase de interacción entre los niveles de bromosustitución de las cadenas parentales y la composición del medio en el cual se disponen a replicar. De la misma manera hemos podido observar que cuando las células cursan su segundo S en presencia de dT la frecuencia de ICH_s es menor que cuando se encuentran en presencia de BrdUrd. Esto es especialmente evidente cuando comparamos los resultados de dos rondas consecutivas en presencia de concentraciones relativamente altas de FdU simultáneamente con BrdUrd con lo observado cuando en la segunda ronda se sustituyen los anteriores por dT. De algún modo, por un mecanismo molecular que desconocemos, la presencia de dT en el medio, ó bien la incorporación de la misma en las cadenas hijas, ejerce un efecto inhibitor de los ICH_s que, de otro modo, se producirían.

FIGURA 30.- Modelo teórico de Painter para explicar la formación de un intercambio entre cromátidas hermanas. El modelo propone que se producirían recombinaciones entre cadenas de ADN en las uniones entre grupos de replicones. El intercambio que se representa en la figura ocurriría entre las cadenas de ADN de nueva síntesis del replicón ya replicado y las cadenas parentales del replicón en proceso de replicación.



2. DISTRIBUCION INTER E INTRACROMOSOMICA DE LOS INTERCAMBIOS

Si la frecuencia de ICH_s depende de la cantidad de ADN contenido en un cromosoma, el número medio de intercambios por cromosoma debe de ser aproximadamente proporcional a su longitud en metafase y puede establecerse un parámetro (número medio de ICH_s por cromosoma/longitud relativa de ese cromosoma) para comparar cada cromosoma con el resto del complemento. Los resultados de la mayoría de los autores que han estudiado este aspecto parecen apoyar lo anterior (Taylor, 1958; Geard y Peacock, 1969; Dutrillaux y col., 1974; Latt, 1974a) (183) (55) (43)(99). Por el contrario Schweizer (1973) (163) encontró en algunos cromosomas de *Vicia faba* un número de ICH_s considerablemente menor de los que les correspondería según su longitud mientras que otros mostraban un exceso, que estaba asociado a las constricciones secundarias de esos cromosomas. Similares observaciones han sido hechas por Ikushina y Wolff (1974) (76) en células CHO y más recientemente por Thelma y Rao (1982), quienes han publicado que los autosomas de las células de *Nesokia indica* tenían menos intercambios de los esperados según su longitud en metafase y llegaron a afirmar que en algunos autosomas, especialmente en los más pequeños no ocurren ICH_s mientras que, por el contrario, los ICH_s parecen ocurrir preferentemente en determinados cromosomas o en segmentos cromosómicos específicos (185).

La exclusión de los ICH_s producidos en el área centromérica debido a la dificultad que ofrece el recuento de intercambios en esas regiones, podía explicar en parte el bajo número de ICH_s , sobre todo en los cromosomas de menor tamaño. Con objeto de evitar esta variabilidad en los resultados, Becher y Sandberg (1983) (10) recomiendan incluir los ICH_s centroméricos a la hora de evaluar los intercambios por cromosoma, ya que estos autores han encontrado que el número de intercambios en la región centromérica aumenta consi-

derablemente con la contracción del cromosoma, dada la dificultad de distinguir claramente los intercambios centroméricos de los pericentroméricos. Consecuentemente, si los ICH_s centroméricos son omitidos de la evaluación podría obtenerse una frecuencia falsamente baja de intercambios en los cromosomas más contraídos.

Por nuestra parte, como vimos, hemos llevado a cabo una comparación de la frecuencia de ICH_s observados en los cromosomas satelizados de *Allium cepa*, bajo cuatro condiciones experimentales diferentes con la obtenida para el conjunto de los cromosomas. Ni para el caso de los intercambios espontáneos ni para el de los inducidos pudimos encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los pares de valores. Dado que la longitud aproximada del cromosoma satelizado ($11,2 \mu$) es semejante al tamaño medio de los cromosomas del complemento, nuestros resultados apoyan la idea más comúnmente aceptada de que los intercambios se producen en un cromosoma en cantidad aproximadamente proporcional a su longitud en metafase (y, asimismo en su contenido en ADN), siendo esto cierto no sólo para los ICH_s espontáneos sino también para los producidos por luz visible y por hidrazida maleica.

En primer lugar es importante señalar que pese a que el cromosoma satelizado es portador de una constricción secundaria a nivel de la cual se organiza el nucleolo, y a que dicha región es especialmente sensible a la ocurrencia de ICH_s , el exceso de intercambios debido a ello no es suficiente como para que el valor total en dicho cromosoma se aparte significativamente de los que cabría esperar, de acuerdo con su tamaño relativo en el cariotipo. Esta afirmación es válida tanto para el caso de ICH_s espontáneos como para los inducidos. En cuanto a estos últimos, parece claro pues que en ninguno de los dos casos (luz visible e hidrazida maleica) presenta el par satelizado ninguna característica especial que pudiese hacerlo sensible de un modo peculiar ante la lesión provocada por estos agentes. Si bien en el caso de la hidrazida maleica se desconoce el mecanismo molecular por el cual es capaz de inducir aberraciones e intercambios

aunque se sabe que es un agente S-dependiente (Zwielinska y Zuk, 1978) (202), para la luz visible si existen datos acerca de su efecto a nivel de ADN. Ikushima y Wolff (1974) (76) fueron los primeros que demostraron que cuando se exponen cromosomas bromosustituídos a la luz visible, la frecuencia de ICH_s se incrementa notablemente. La luz visible por el contrario parece no tener efecto sobre el ADN nativo, cosa que sí ocurre con la luz ultravioleta (Rommelaere y col., 1973) (147). En cuanto a la naturaleza del daño inducido en los cromosomas bromosustituídos por la iluminación con luz visible, Ben-Hur y Elkind (1972) (12) demostraron que se trata en último término de roturas de cadena simple en el ADN. En este sentido, Schwartzman y col., (1979) (161) proponen que el efecto último a nivel del ADN, es decir, las roturas de cadenas simples, podría ser idéntico para la luz visible y ultravioleta, aunque por caminos distintos.

Nuestros resultados confirman los publicados por Schwartzman y col., (1979) (161) y por Schwartzman y Gutierrez (1980) (158) en este mismo material en cuanto a la eficacia de un tratamiento con luz visible a principios del segundo periodo S, después de haberse incorporado BrdUrd en el ADN durante un primer periodo de síntesis. Si admitimos que el único blanco para que la luz visible sea capaz de provocar lesiones es el ADN bromosustituído, sería de esperar que mientras más riqueza de timidina tuviese un ADN, más cantidad de bromouracilo se incorporarían en sustitución de la misma y más sensible sería dicho ADN a la luz visible. En base a que hemos observado que el cromosoma satelizado no es especialmente sensible a la luz podría proponerse que no presenta una especial riqueza de AT, si lo comparamos con el resto del cariotipo. Esto no implica que en determinadas regiones cromosómicas pueda darse una especial riqueza de AT, como discutiremos más adelante en relación con la distribución inter cromosómica de los ICH_s .

Han sido numerosos los trabajos en los que se ha demostrado que las aberraciones cromosómicas ocurren con mayor frecuencia en las regiones heterocromáticas que en la eucromatina (Natarajan y Ahns

tróm, 1973) (120). Dado que en principio se pensaba que las aberraciones cromosómicas podrían ser intercambios incompletos (Evans, 1977) (45) (Kato, 1977a) (86) resultó de interés estudiar la distribución de los ICH_S en orden a tratar de establecer una relación entre ambos fenómenos que apoyen la existencia de un mecanismo común.

Aunque unos pocos autores han propuesto que los ICH_S parecen ocurrir preferentemente a la heterocromatina (Natarajan y Klasterka, 1974; Schnedl y col., 1976) (121) (151) la mayoría han alcanzado resultados completamente contradictorios, es decir, que las regiones heterocromáticas presentan menos intercambios de los que podría esperarse de acuerdo con su longitud (Latt, 1974; Carrano y Wolff, 1975; Bostock y Christie, 1976; Hsu y Pathak, 1976; Schwartzman y Cortés, 1977; Kato, 1979) (99) (22) (14) (73) (157) (88). En cualquier caso, la distribución de los ICH_S suele ser diferente de las aberraciones cromosómicas, lo cual se emplea como argumento en contra de que exista un mecanismo común.

En lo que si coinciden diferentes autores es en que los ICH_S son especialmente frecuentes en las zonas de unión entre eucromatina y heterocromatina (Carrano y Wolff, 1975; Bostock y Christie, 1976; Crossen y col., 1977; Dolfini, 1978; Friebe, 1978; Gatti y col., 1979; Kato, 1979; Cortés, 1980) (22) (14) (33) (39) (51) (54) (88) (29) y en que las regiones NOR son, asimismo, especialmente sensibles a los ICH_S (Schweizer, 1973; Schubert y col., 1979; Ockey, 1980) (163) (154) (124).

Nosotros hemos observado que en el cromosoma satelizado de *Allium cepa* que, al igual que ha sido publicado, primeramente para el cariotipo en su conjunto (Schwartzman y Cortés, 1977) (157) las regiones correspondientes a bandas C (telómeros) así como las zonas pericentroméricas presentan, en general, al menos ICH_S de los que cabría esperar, tanto espontáneos como inducidos. Aunque las regiones pericentroméricas de los cromosomas de *A. cepa* no se bandean, el patrón de heterocromatina constitutiva encontrado en los núcleos interfásicos hace pensar que si son heterocromáticas, aunque el procedimiento

de bandeo C empleado sería incapaz de ponerlas de manifiesto. Hemos de tener en cuenta que mediante el bandeo C modificado se detecta al menos parte de esa heterocromatina centromérica.

También hemos encontrado, de acuerdo con lo publicado en otros materiales, una alta incidencia de ICH_S en la región NOR asociada a la constricción secundaria del cromosoma satelizado, siendo pues, su comportamiento distinto al resto de las regiones detectadas como heterocromáticas mediante los procedimientos de bandeo llevados a cabo.

Stack y Commings (1979) (173) han publicado que mediante experimentos de hibridación "in situ" se detectan secuencias largas repetitivas en la heterocromatina telomérica de *A. cepa*. Otros autores (Marazia y Maggini, 1977; Cremonini y col., 1981; Loiero y col., 1982) (112) (32) (107) también han encontrado secuencias altamente repetitivas en el ADN de esta especie. Loiero y col., (1982) (107) han demostrado además que ADN altamente repetitivo hibridiza en las regiones teloméricas y paracentroméricas y en algunas zonas intercalares. Un ADN rico en AT y, por tanto, susceptible de ser altamente bromosustituído, sería especialmente sensible a la ocurrencia de ICH_S espontáneos, si admitimos que la frecuencia de ICH_S es proporcional a la cantidad de BrdUrd incorporada (Mazrimas y Stetka, 1978; Schwartzman y col., 1979) (114) (162). Igualmente, este sería el caso cuando tratamos con luz visible, ya que se considera que el ADN bromosustituído es el blanco para la acción de dicho agente, al producirse una debrominación que resulte finalmente en roturas de la cadena simple (Ben-Hur y Elkind, 1972) (12). Aunque en diferentes organismos se ha demostrado que en la heterocromatina constitutiva se encuentra ADN altamente repetitivo especialmente rico en AT, carecemos de datos en este sentido en *A. cepa*. Si bien Stack y Commings (1979) (173) han publicado que esta especie tiene el contenido más bajo en GC encontrado en una angiosperma, nada sabemos acerca de la composición de las regiones heterocromáticas de los cromosomas.

En el caso de la luz visible, aunque las regiones heterocromáticas fuesen especialmente ricas en AT, dado que el tratamiento se dió a mediados del S y dichas regiones replican al final, podría haber tenido lugar la reparación de al menos la mayor parte de las lesiones antes de llegar el momento de la replicación, que es cuando ocurren los ICH_S. Sin embargo, en el caso de los ICH_S espontáneos sería lógico pensar que si hubiese una especial incorporación de BrdUrd en la heterocromatina, la frecuencia de los ICH_S sería allí especialmente alta.

Una hipótesis acerca de la causa de una menor incidencia de intercambios en las regiones heterocromáticas podría ser la alta condensación de las fibras de cromatina en esas regiones cromosómicas a lo largo de todo el ciclo celular, excepto en el breve periodo de tiempo que tardan en replicar. Se puede pensar que esa alta condensación prevenga al ADN de las alteraciones que constituyan el paso inicial para que se produzca un ICH.

Dado que las proteínas asociadas al ADN determinan su grado de empaquetamiento, la susceptibilidad diferencial a la producción de ICH_S a lo largo de un cromosoma dado, podría estar relacionada con el tipo y la proporción relativa de las proteínas asociadas al ADN en cada región del mismo. De las proteínas cromosómicas, la histona H1 se cree que juega un papel fundamental en el mantenimiento de la estabilidad de la superhélice y del empaquetamiento de la fibra de cromatina y podría pues postularse que la relativa proporción de histonas H1 sería la responsable de las diferencias observadas, en las diferentes zonas del cromosoma, en cuanto a la producción de intercambios entre cromátidas hermanas.

Kato también postuló en 1979 (88) que la supresión de los ICH_S en las bandas C y su potenciación en las regiones interbandas pudiera ser debido fundamentalmente a la estructura terciaria de la cromatina en esas regiones. Se ha publicado también que en los nucleosomas asociados con un ADN altamente repetitivo se produce una pérdida de la histona H1; mientras que contienen diversas proteínas

no histónicas no detectables en el resto de la cromátida nuclear (Musch y col., 1977) (118). Estas proteínas parecen estar fuertemente unidas al ADN (Maio y Shildkrant, 1969) (108) lo que, presumiblemente, pueda tener como consecuencia una mayor protección de esas regiones a la acción de las nucleasas (Bostock y col., 1976) (15).

Otra presumible hipótesis acerca de la menor incidencia de ICH_S en las regiones heterocromáticas podría establecerse en base a que la replicación en estas regiones, que suele ocurrir al final del S parece ser especialmente rápida (Cortés y González-Gil, 1982) (31) y por tanto, de acuerdo con diferentes modelos moleculares acerca del mecanismo de producción de ICH_S (Painter, 1980; Ishii y Bender, 1980) (130) (77), la posibilidad de que ocurriesen ICH_S sería menor en esas regiones que en otras que se replican más lentamente.

3.- ACERCA DE LA ESTRUCTURA DEL CROMOSOMA METAFASICO.

Hoy día existe un acuerdo general en que la estructura del cromosoma es uninémica, y el descubrimiento de los cuerpos nucleosomas han supuesto un avance considerable para entender la relación que existe entre el ADN y las histonas al constituir la fibra de cromatina. Una cuestión muy importante que permanece sin aclarar es como se dispone la fibra de cromatina en el cromosoma metafásico. Ya vimos que aún no existen pruebas concluyentes acerca de la posible organización en ordenes cada vez superiores que irían desde el nivel de los nucleosomas hasta la cromátida. Nosotros nos limitaremos en la presente discusión fundamentalmente a la posible estructura que la cromatina adopta al condensarse en mitosis, basándonos en nuestras observaciones al microscopio óptico de cromosomas bromosustituídos.

La posible organización de la cromatina en mitosis a nivel inmediatamente inferior al de la cromátida ha sido objeto de amplio debate (Stubblefield, 1973; Bostock y Sumner, 1978) (177) (16). Mientras que determinados autores basándose en observaciones al microscopio electrónico han propuesto que las fibras de cromatina irían plegadas sin seguir una ordenación especial hasta constituir la cromátida, siendo los cromómeros las subestructuras más importantes (Du Prau, 1968; Bahr, 1977) (41) (3), otros, tomando como base observaciones al microscopio óptico y electrónico han defendido la idea de que la cromatina adopta una disposición helicoidal en mitosis y meiosis para formar la cromátida (Fujii, 1926; Makino, 1936; Ohnuki, 1965) (52) (109) (126). Dicha estructura dispuesta en espiral es lo que se conoce con el nombre de cromonema.

Baranetzky, J. (1880) (7) fué el primero en describir una estructura espiral en cromosomas meióticos de plantas, hace ya más

de 100 años. En 1926, Fujii (52) también describió una estructura formada por pequeños giros en cromosomas meióticos de *Tradescantia*. Durante el periodo comprendido entre 1926 y 1940 se realizaron algunos trabajos siguiendo esta misma línea, principalmente acerca de la morfología y el comportamiento del cromonema tanto en cromosomas metafásicos como anafásicos de la primera división meiótica. Al contrario que en plantas, las observaciones en este sentido en cromosomas animales se vieron retrasadas por dificultades técnicas, al no estar aún puesto a punto el choque hipotónico. A pesar de ello, pueden encontrarse en la literatura trabajos de investigadores que llegaron a demostrar la presencia del cromonema en cromosomas de espermatozoides de saltmontes (Makino, 1936; White, 1940; Coleman, 1943; Makino y Momma, 1950) (109)(191) (26) (110). Del mismo modo existen informes acerca de la morfología especial que adoptan los cromosomas somáticos de ciertos protozoos flagelados. Su estructura espiral se ha observado claramente en varias especies del género *Holomastigotoides*, con la particularidad de que en este caso se describe una espiral pequeña que se mantiene en todos los estadios del ciclo celular, y una espiral grande, que empieza a aparecer tan pronto como tiene lugar la condensación de la cromatina, en profase (Cleveland, 1949, 1954)(23) (24). Asimismo, en el foraminífero *Patellina corrugata* también se puede observar el empaquetamiento en espiral del cromonema (Le Calvez, 1938, 1950; Grell, 1959) (102) (103) (60). La estructura espiral de los cromosomas de *Euglena viridis* ha sido también descrita por Saito en 1961 (148). Hay que mencionar aquí que en los cromosomas anafásicos de *Patellina* y de *Euglena* se han descrito dos fibras de cromonema en lugar de una, lo cual en principio no tendría porque estar en contra del modelo uninémico de estructura del cromosoma generalmente aceptado. En este sentido, hay que decir que a veces se han descrito "dobles cromátidas o subcromátidas" en cromosomas animales y vegetales (Ris, 1961; Peacock, 1963; Giménez-Martín y col., 1963; Sparvoli y col., 1965; Trosko y Wolff, 1965; Wolff, y Hewitt, 1966)(145) (135) (57) (171) (187) (195) aunque hoy en día se

considera que, al menos en la mayoría de los casos se trataría de "artefactos" (Bostock y Sumner, 1978) (16).

Con cromosomas humanos, Ohnuki (1965, 1968) (126) (127) desarrolló una técnica sencilla que permitía poner de manifiesto las espirales, al parecer sin introducir una distorsión importante en la configuración del cromosoma. La técnica se basa en el uso de una solución hipotónica de especial composición salina. La aplicación de esta metodología mejora la visualización del cromonema debido, probablemente, a la extracción de alguno de los constituyentes del cromosoma. En general, los giros del cromonema no son reconocibles en los núcleos interfásicos al observarlos al microscopio óptico, debido a la descondensación de la cromatina. Por el contrario, el cromonema enrollado en forma de espiral aparece claramente visible los cromosomas individuales, sobre todo en la profase tardía y en metafase, aumentando el diámetro de giro a medida que aumenta la contracción cromosómica.

Ohnuki, además de establecer esta configuración helicoidal del cromonema en cromosomas humanos, hizo una serie de apreciaciones acerca del número de giros presentes en un cromosoma, la dirección de tales giros y la situación que se presenta en regiones especiales del cromosoma, tales como constricciones primarias, secundarias y regiones teloméricas.

En cuanto al número de giros, según este autor dicho número guarda relación con el grado de contracción cromosómica, de manera que existiría una amplia variación dependiendo del estado de condensación de la cromatina. No obstante, cada cromosoma metafásico en particular presentaba aproximadamente el mismo número de giros en las diferentes células estudiadas. Otra observación general era que los cromosomas más grandes presentaban mayor número de giros que los más pequeños.

A pesar de las dificultades que existen para, en cromosomas teñidos simplemente con Giemsa, analizar en detalle la dirección del giro de las hélices, esto es, si está girada hacia la izquierda o

hacia la derecha en relación al eje longitudinal de la cromátida, los resultados de Ohnuki sugieren que la dirección del cromonema no es específica en ninguna parte del cromosoma. Sin embargo, algunas veces se observan cromosomas que mostraban direcciones de giro simétricas en ambas cromátidas, es decir, si una estaba a un determinado nivel girada hacia la derecha, la otra lo estaba hacia la izquierda. De la misma manera, este autor propuso que la dirección del giro parecía cambiar dentro de la misma cromátida, e incluso a veces en el mismo brazo cromosómico, siendo este cambio también simétrico en ambas cromátidas. Esto puede estar en relación con las contricciones secundarias, las cuales, según Ohnuki se caracterizan porque el cromonema está allí más debilmente espiralizado o porque a ese nivel aparecen cambios en la dirección de giro. Igualmente, las constricciones primarias aparecen como zonas localmente desenrolladas, sin mostrar a una configuración específica. Esto contrasta con la idea de una alta especialización estructural en el centrómero.

En estos cromosomas desespiralizados puede observarse mejor la configuración que el cromonema adquiere al alcanzar las partes extremas del cromosoma (regiones teloméricas). Se han descrito incluso tipos de estructuras teloméricas en cromosomas metafásicos, según la espiral acabe en forma puntiaguda o adquiriera una apariencia redonda. En cromosomas de hamster sirio, Molina (1973) (117) demostró, asimismo la estructura en espiral, luego de tratar con hialuronidasa.

Pese a todas las observaciones acerca de la estructura helicoidal del cromosoma, Bahr y col., (1973)(4), de acuerdo con el modelo de fibra de cromatina plegada al azar que mencionamos anteriormente, han propuesto que tales imágenes se debían en parte a la disposición oblicua de cromómeros alrededor de un eje imaginario de la cromátida que estaría en realidad, constituido por fibras longitudinales. Por otra parte, Bostock y Sumner (1978) (16) afirman que aunque muchos cromosomas, especialmente algunos de los mayores que se encuentran en plantas, muestran una clara estructura espiral, esto no parece ser un atributo universal de los cromosomas y además, que mu-

chas ilustraciones que pretendían mostrar una estructura espiral no son del todo convincentes. Aparte de esto, muchos estudios recientes han ignorado por completo las observaciones de que la cromatina cuando se halla en su máximo grado de condensación para formar las cromátidas en metafase se organiza en forma de una macrohélice (Ohnuki, 1968; Haapala y Nokkala, 1982) (127) (64) que, recientemente, se ha demostrado que guarda una relación inherente con las bandas G detectadas al microscopio óptico (Harrison y col., 1981) (67). Dicha estructura en espiral ha llegado a observarse incluso en cromosomas humanos en G1 condensados prematuramente (Jørgesen y Bak, 1982)(78) Al microscopio electrónico, mediante el scanning, se ha observado, asimismo en repetidas ocasiones la estructura helicoidal (Harrison y col., 1981; Haapala y Nokkala, 1982; Utsumi, 1982) (67) (64) (189)

La tinción diferencial que permite poner de manifiesto aquellas regiones cromosómicas que han incorporado BrdUrd en su ADN ha servido para aportar datos adicionales que sugieren también la existencia de un nivel de organización helicoidal de la cromatina para constituir la cromátida. En primer lugar, hay que mencionar que la tinción de fluorescencia más Giemsa (FPG) ha sido útil para observar, con un alto grado de resolución, pequeños segmentos intercambiados que no alcanzan la anchura total de la cromátida. La existencia de estos segmentos ha sido demostrada en *Vicia faba* (Kihlman, 1975)(90) y en *Allium cepa* (Schvartzman y Cortés, 1977; Schvartzman y col., 1978; Cortés y Hazen, 1981) (157) (160) (30). Kihlman les denominó intercambios puntuales o "dot-like exchanges" y propuso que podrían ser el resultado de dos intercambios entre cromátidas hermanas que ocurriesen muy próximos entre sí a lo largo de la fibra de cromatina. Posteriormente, en *Allium cepa*, Schvartzman y col., (1978) (160), mediante un análisis estadístico de las distancias entre intercambios a lo largo del cromosoma llegaron a resultados que parecían en apoyo de la hipótesis de Kihlman.

Las observaciones de Schvartzman y col., (1978) acerca del patrón morfológico que presentan estos intercambios puntuales, y las

realizadas en la presente Tesis Doctoral parecen demostrar que no existen disposiciones longitudinales de fibras de cromatina de diámetro detectable al microscopio óptico. Esta afirmación es resultado de que, aunque el tamaño de los segmentos a lo ancho de la cromátida es variable, la dimensión longitudinal es aproximadamente constante, de unas 0.5 μm , lo cual se estima que sería el espesor del cromonema. Además, dicho cromonema es visible en determinados casos en núcleos profásicos de *A. cepa*, sin haberlos sometidos a ningún tratamiento hipotónico, como puede verse en la figura 31. La hipótesis acerca de la existencia de una subestructura cromosómica de estas características en los cromosomas interfásicos parece asimismo apoyada por el hecho de haber observado nosotros segmentos de replicación tardía (SRT) que presentan características comunes con los intercambios puntuales en cuanto a su espesor constante, asimismo de unas 0.5 μm . En la figura 32 puede verse un esquema que representa el caso de un intercambio puntual y de un SRT de acuerdo con el modelo del cromonema.

Si admitimos la existencia del cromonema en los cromosomas metafásicos de *A. cepa* puede efectuarse un cálculo del número de hipotéticos giros que le corresponderían a cada cromosoma de acuerdo con su longitud (Tabla.6). En contraposición a lo que afirmaba Ohnuki (1968) (127) en cromosomas humanos, acerca de que el número de giros depende del estado de condensación de la cromatina, reduciéndose dicho número conforme se va condensando el cromosoma, estudios recientes de Haapala (1984) (65) empleando tanto la microscopía óptica como electrónica han venido a demostrar que el número de giros no se relaciona directamente con el grado de condensación, ya que permanece prácticamente constante en cromosomas que van reduciendo su longitud desde prometáfase hasta metafase (no hay eliminación de giros).

Otra cuestión muy importante es la dirección de los giros, dado que se ha descrito que puede haber dos direcciones alternativas de la hélice, ya que la misma puede estar girada hacia la derecha

o hacia la izquierda (Ohnuki, 1968; Haapala, 1984) (127) (65). Existen, en principio, dos posibilidades: ó que la dirección del giro en un determinado brazo cromosómico sea completamente al azar, ó bien que haya una cierta determinación de dicha dirección. En este sentido, mientras que Ohnuki (1968) (127) afirma que en los cromosomas humanos la dirección de los giros es al azar, Haapala (1984) (65), en el mismo material llega a la conclusión de que no es así, sino que en la mayoría de los casos la dirección en ambas cromátidas a un determinado nivel sería simétrica, o sea, una iría girada a la derecha y su cromátida hermana a la izquierda.

Por nuestra parte, al no tratarse de cromosomas sometidos a ningún choque hipotónico, no hemos podido analizar la dirección de la hipotética hélice a lo largo de todo el cromosoma. No obstante, el patrón que presentan los que hemos dado en llamar intercambios discontinuos nos sugiere cual es la dirección del giro al nivel en que son observados. Como vimos, las imágenes que se observan como resultado de los intercambios discontinuos pueden ser de dos tipos diferentes, no superponibles. En la figura 33, podemos observar cual sería la dirección del giro para que resultara una u otra imagen, es decir, en un caso la hélice tendría un giro a la derecha y en el otro la dirección sería hacia la izquierda.

Basándonos en dicho patrón morfológico, hemos podido observar que en la mayoría de los casos (82%) la dirección de giro a un nivel determinado en ambas cromátidas hermanas parece ser simétrica (Fig., 34), coincidiendo con lo observado en cromosomas humanos (Haapala, 1984) (65). Si esto es así, podría proponerse que existe un mecanismo desconocido que determinara el sentido del giro que adoptaría el cromonema al irse condensando la cromatina con la llegada a mitosis.

En cromosomas humanos, aunque la dirección de giro a lo largo de la cromátida se mantiene hasta cierto punto, se ha descrito que ocurren cambios a determinados niveles, por ejemplo, donde hay una constricción secundaria (Ohnuki, 1968) (127). Como resultado de la

observación del patrón morfológico que aparece cuando se encuentran dos intercambios descontínuos adyacentes en una cromátida que pueden dar origen a dos imágenes diferentes, como vimos, parece deducirse que, mientras que en unos casos se mantiene la dirección de giro entre ambos intercambios adyacentes (Fig. 33c), en otros casos habría tenido lugar un cambio de la dirección del giro (Fig. 33d). Dado que, en este último caso, no se observa constricción secundaria alguna que pudiese dar lugar al cambio ó reversión en la dirección de giro, nuestras observaciones parecen estar de acuerdo con las de Haapala (1984) (65) en el sentido de que la mayoría de los sitios donde ocurre un cambio se distribuirían al azar a lo largo de las cromátidas, sin que aparezcan como constricciones al condensarse la cromatina. Al parecer, dicha reversión ocurre en ambas cromátidas hermanas al nivel que sea. En algunos casos particulares los ID parecían abarcar una sólo vuelta completa de la hélice, mostrando simetría en el sentido de giro de la supuesta hélice en ambas cromátidas hermanas. En la figura 35a se da la posible interpretación de este hecho basado en el modelo de cromonema. En la figura 35b se muestra el caso de que, por una presumible torsión de una cromátida a nivel del centrómero, la imagen formada en ella parece ser una línea recta, que podría interpretarse como la imagen correspondiente al reverso del intercambio observado en la cromátida hermana.

En resumen, el conjunto de nuestras observaciones en cromosomas bromo-sustituídos constituyen un apoyo a la idea de que las cromátidas en metafase están constituidas por un cromonema que se dispone helicoidalmente, y por tanto, no se trataría de un artefacto provocado por los tratamientos hipotónicos a que han sido sometidos tradicionalmente los cromosomas para poder observar dicha estructura. En nuestra opinión, el uso combinado de dichos tratamientos hipotónicos y de la técnica FPG podría aportar en el futuro nuevos datos acerca de la estructura del cromosoma metafásico, por ejemplo, en lo que se refiere a la especial estructura del centrómero, telómeros y constricciones secundarias. La microscopía electrónica de scanning también

podría ser de gran utilidad para estudiar los cromosomas bromosustituidos.

CONCLUSIONES.

1.- Del estudio de la capacidad de distintos nucleósidos, tales como Timidina, Uridina y Fluorodesoxiuridina, para inducir intercambios entre cromátidas hermanas (ICH_g) concluimos que, en *Allium cepa*, la Timidina no parece tener efecto alguno sobre la frecuencia de ICH_g ; la Fluorodesoxiuridina, sin embargo, ha demostrado ser un potente inductor de intercambios en nuestro sistema, mientras que la Uridina es capaz de provocar un descenso débil, aunque estadísticamente significativo en la tasa de intercambios basales.

2.- La Timidina en exceso y la fluorodesoxiuridina provocan un retraso considerable en la cinética de proliferación celular, aunque sólo en el segundo caso este retraso va acompañado de una inducción de ICH_g . Estos resultados parecen indicar que un alargamiento en la duración del ciclo celular no es condición suficiente para que se eleve la frecuencia de intercambios.

- 3.- La capacidad de la Fluodesoxiuridina (FdU) para inducir intercambios resultó ser diferente según el ciclo celular en el cual fuese aplicado el tratamiento, de manera que, cuando la FdU estaba presente en el medio únicamente durante la primera ronda de replicación, la tasa de intercambios en cromosomas de la segunda mitosis, era notablemente superior que cuando el tratamiento con este inhibidor se realizaba sólo durante la segunda ronda.
- 4.- La alta frecuencia de ICH_s observada al tratar con FdU parece ser resultado de un alto grado de incorporación de BrdUrd en el ADN más que de un efecto directo de la FdU por sí misma.
- 5.- La mayor parte de los ICH_s inducidos por FdU son producidos cuando un ADN altamente bromosustituído es usado como molde para la replicación.
- 6.- La razón entre las frecuencias de intercambios que se obtiene para cromosomas con dos o sólo una ronda de replicación en BrdUrd se mantiene cuando se usa simultáneamente FdU a las concentraciones de $10^{-7}M$ y $5 \cdot 10^{-7}M$. Sin embargo, la razón tiende a disminuir para concentraciones de FdU menores o en ausencia de la misma.
- 7.- El cromosoma subtelocéntrico satelizado de *Allium cepa* muestra una frecuencia de ICH_s espontáneos e inducidos proporcional a su longitud en metafase.
- 8.- En base a los resultados presentados podemos decir que, en general, hemos encontrado una tasa de ICH_s menor de la que cabría esperar según una distribución aleatoria de los mismos, en las regiones heterocromáticas del cromosoma satelizado de *Allium cepa* con la excepción de la región organizadora nucleolar (NOR) la cual, a pesar de detectarse como heterocromática mediante los procedimientos de bandeado correspondientes se manifiesta como una

zona cromosómica altamente sensible a la producción de intercambios entre cromátidas hermanas.

- 9.- El alto grado de resolución ofrecido por la técnica FPG nos ha permitido observar ciertos detalles que pueden suministrar información acerca de la organización de la cromatina en cromosomas metafásicos. Así, además de los intercambios puntuales, ya descritos, hemos observado segmentos de replicación tardía (SRT) que comparten las mismas propiedades de los intercambios puntuales e intercambios de características peculiares a los que hemos denominado intercambios discontinuos (ID).
- 10.- De los patrones morfológicos observados para los intercambios puntuales y los segmentos de replicación tardía puede deducirse que no existen asociaciones de fibras de cromatina de un diámetro detectable al microscopio óptico dispuestas longitudinalmente en los cromosomas metafásicos de *Allium cepa*.
- 11.- Los tres tipos fundamentales de observaciones realizadas en cuanto a la posible estructura del cromosoma en su estado de máxima condensación en metafase parecen apoyar el modelo propuesto por diferentes autores en cuanto a la existencia de una fibra o cromonema dispuesto helicoidalmente para constituir la cromátida.
- 12.- Las imágenes que se observan como resultado de los intercambios discontinuos pueden ser de dos tipos diferentes y no superponibles, lo cual podría tener implicaciones en cuanto al sentido de giro del cromonema.
- 13.- De las observaciones de los patrones morfológicos presentados por los ID en una o ambas cromátidas hermanas podemos deducir

que, en la mayoría de los casos la dirección de giro del cromosoma sería opuesta en una y otra cromátida hermana y que la dirección de giro puede cambiar a lo largo de la cromátida e incluso dentro del mismo brazo cromosómico, no siendo condición indispensable para ello la existencia de constricciones secundarias.

FIGURA 31.- Núcleo en profase de una célula meristemática de *Allium cepa*. Puede observarse claramente como la fibra de cromatina, al condensarse, adopta una apariencia helicoidal.

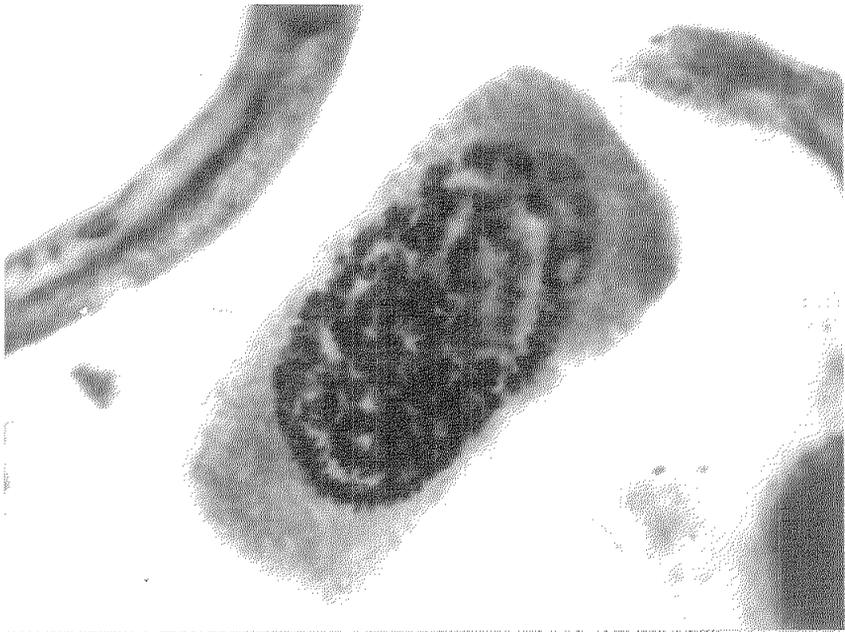


FIGURA 32.- Esquema de la interpretación de un intercambio puntual (a) y de un segmento de replicación tardía (b) Siguiendo el modelo del cromonema, esto es, suponiendo que la fibra de cromatina se organiza, a un nivel inferior al de cromátida, en forma de una macrohélice.



a



b



FIGURA 33.- Análisis de la posible dirección de giro de las hélices basado en los diferentes patrones morfológicos observados en los intercambios discontinuos.

a) Un ID con un perfil en L podría originarse cuando se condensa una hélice girada a la derecha

b) Para explicar la morfología de este tipo de ID, podría proponerse que el sentido de giro de esta hélice sea el contrario al anterior.

Considerando dos ID adyacentes las imágenes observadas parecen indicar que mientras que en unos casos la dirección de giro de la hélice se mantendría entre ambos intercambios (c), en otros dicha dirección de giro podría cambiar (d).



a



b



c



d



FIGURA 34.- Interpretación según el modelo del cromonema (c) de un intercambio discontinuo que presenta un patrón morfológico simétrico en ambas cromátidas hermanas (b). Para que se adquiriera dicha morfología al condensarse la cromatina (d) podría establecerse la hipótesis de que ambas hélices estuviesen giradas en sentidos opuestos, al nivel al que se observa tal ID.

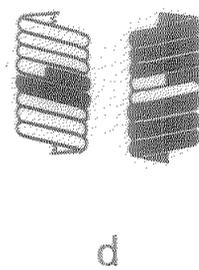
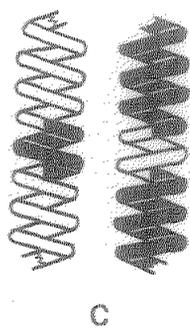
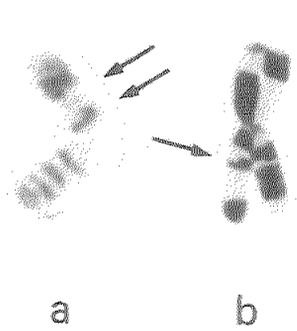
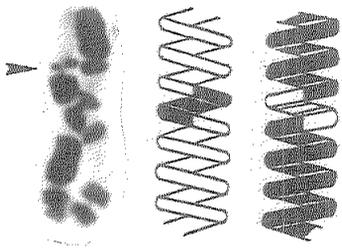


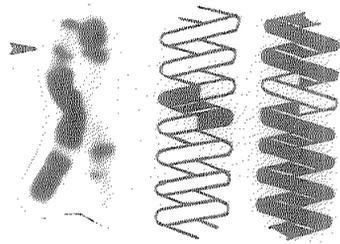
FIGURA 35.- Interpretación de un ID según el modelo del cromosoma.

a) Este ID puede ser interpretado como que abarca una vuelta completa de una hélice. Su cromátida hermana iría girada en sentido contrario, puesto que el patrón morfológico que presenta es simétrico.

b) admitiendo una torsión de una de las cromátidas con respecto a la otra.



a



b

TABLA 6

Estimación del número aproximado de giros para cada cromosoma del cariotipo de *Allium cepa* según su longitud.

	Par cromosómico nº							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Longitud del cromosoma ^a	14.70	14.11	13.52	12.93	12.34	11.76	9.99	8.82
Giros por cromátida	29-30	28-29	27-28	25-26	24-25	23-24	19-20	17-18

(a) La longitud del cromosoma se expresa en μm . Estos datos se obtuvieron a partir de mediciones de 10 metafases completas.

BIBLIOGRAFIA.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- ABE, S. y SASAKI, M. (1977). Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in chinese hamster cell exposed to various chemicals. I. Natl. Cancer Inst., 58, 1635- 1641.
- 2.- ADOLPH, K. W.; CHENG, S.M. y LAEMMLI, V.K. (1977). Role of non-histone proteins in metaphase chromosome structure. Cell, 12, 805-816.
- 3.- BAHR, G.F. (1977). Chromosomes and chromatin structure. En: Molecular structure of human chromosomes. Ed. J.J. Yunis; Academic Press, pp. 143-203.
- 4.- BAHR, G.F.; MIKEL, U. y ENGLER, W.F. (1973). Chromosome identification. Ed. T. Caspersson y L. Zech. pp.280. Academic Press, New York.

- 5.- BAK, A.L.; ZEUTHEN, J. y CRICK, F.H.C. (1977). Higher order structure of human mitotic chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 1595-1599.
- 6.- BANERJEE, A. y BENEDICT, W.F. (1979). Production of sister-chromatid exchanges by various cancer chemotherapeutic agents. Cancer Res., 39, 797-799.
- 7.- BARANETZKY, J. (1880). Die kernteilung in den Pollenmutterzellen einiger Tradescantien. Bot. Zeitg., 38, 241.
- 8.- BARANOVSKAYA, L.J.; ZAKHAROV, A.F; DUTRILLAUX, B.; CHARPENTIER, S.; PRIEUR, M. y LEJEUNE, J. (1972). Differentiation des chromosomes X per les methodes de despiralisation au 5-bromodeoxyuridine (BUDR) et de denaturation thermique menagee. Ann. Genet., 15, 271-274.
- 9.-BARNES, J.M.; MAGEE, P.M.; BOYLAND, E., HADDON, A. y PASSEY, R.T. (1957). The non-toxicity of maleic hydrazide for mammalian tissues Nature (Lond), 180, 62-64.
- 10.- BECHER, R. y SANDBERG, A.A. (1983). Sister chromatid exchange in centromere and centromeric area. Hum. Genet., 63, 358-361.
- 11.- BELISARIO, R.L.; MALEY, G.F.; GALIVAN, J.H. y MALEY, F. (1976). Amino-acid sequence at the Fd-UMP binding site of thymidilate synthetase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 1848-1852.
- 12.- BEN-HUR, E. y ELKIND, M.M. (1972). Damage and repair of DNA in 5-bromodeoxyuridine-labelled chinese hamster cells exposed to fluorescent light. Biophys. J., 12, 636-647.

- 13.- BENYAJATI, C. y WORCEL, A. (1976). Isolation characterisation and structure of the folded interphase genome of *Drosophila melanogaster*. *Cell*, 9, 393-407.
- 14.- BOSTOCK, C.J. y CHRISTIE, S. (1976). Analysis of the frequency of sister chromatid exchanges in different regions of chromosomes of the kangaroo rat (*Dipodermis ordii*). *Chromosoma*, 56, 275-287.
- 15.- BOSTOCK, C.J.; CHRISTIE, S. y MATCH, F.T. (1976). Accesibility of DNA in condensed chromatin to nuclease digestion. *Nature (Lond)*, 262, 519.
- 16.- BOSTOCK, C.J. y SUMNER, A.T. (1978). The eukaryotic chromosome. Ed. Elsevier/North-Holland, pp. 285-287.
- 17.- BRADBURY, E.M.; MOLGAARD, H.V., STEVENS, R.M.; BOLUND, L.A. y JOHNS, E.W. (1972). X-rays studies of nucleoproteins depleted of lysine rich histone. *Eur. J. Biochem.*, 31, 474-482.
- 18.- BREWEN, J.G. y PEACOCK, W.J. (1969). The effect of tritiated thymidine on sister-chromatid exchange in a ring chromosome. *Mutat. Res.*, 7, 433-440.
- 19.- BUTENKO, R.J. y BASKAKOF, Y. A. (1960). On the mechanism of the effect of maleic hydrazide on plants. *Fiziol. Rastenii.*, 7, 385-394.
- 20.- CAMPBELL, A.M.; COTTER, R.J. y PARDON, J.F. (1978). Light scattering measurements supporting helical structures for chromatin in solution. *Nucleic. Acid. Res.*, 5, 1571-1580.
- 21.- CARPENTER, B.G.; BALDWING, J.P.; BRADBURY, E.M. e IBEL, K. (1976)

Organisation of subunits in chromatin. *Nucleic Acid Res.*, 3, 1736-1746.

- 22.- CARRANO, A.V. y WOLFF, S. (1975). Distribution of Sister Chrom. ex. in the euromatin and heterocromatin of the Indian muntjac. *Chromosoma*, 53, 361-369.
- 23.- CLEVELAND, L.R. (1949). The whole life cycle of chromosomes and their coiling system. *Trans. Amer. Phil. Soc.*, 39, 1-100.
- 24.- CLEVELAND, L.R.(1954). Hormone-induced sexual cycles of flagelates XII. Meiosis in *Barbulanympha* following fertilization, autogamy and endomitosis. *J. Morphol.*, 95, 557-619.
- 25.- COHEN, S.; FLAKS, J.G.; BARNER, H.O.; LOEB, M.R. y LICHTENSTEIN, J. (1953). The mode of action of 5-Fluorouracil and its derivatives. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 44, 1004-1012.
- 26.- COLEMAN, (1943). Chromosome structure in the Acrididae with special reference to the X chromosomes. *Genetics*, 28, 2-8.
- 27.- COMINGS, D.E. y OKADA, T.A. (1969). Electron microscope study of well dispersed mammalian and avian chromosomes: a single DNA helix per chromatid model. *J. Cell. Biol.*, 43, 52a.
- 28.- CONGER, A.D. y FAIRCHILD, L.M. (1953). A quick-freeze method for making smear slides permanent. *Stain technol.*, 28, 281-283.
- 29.- CORTES, F. (1980). Occurrence of S.C.E. at euromatin-C-band junctions in *Allium cepa* chromosomes. *Experientia*, 36, 1290-1291.
- 30.- CORTES, F. y HAZEN, M.J. (1981). Suppression of "dot-like" exchan-

ges in C-bands and late replicating DNA-rich regions of chromosomes. *Experientia*, 37, 695-696.

- 31.- CORTES, F. Y GONZALEZ-GIL, (1982). BrdUrd incorporation into DNA and cell cycle kinetics in *Allium cepa*. *Cytologia*, 47, 481.
- 32.- CREMONINI, R.; LOIERO, M. y DURANTE, M. (1981). Differentiation of metaxylem cell line in the root cell of *Allium cepa*. II Changes in nucleotide sequence redundancy. *Protoplasma*, 108, 1-7.
- 33.- CROSSEN, P.E.; DRIETS, M.E.; ARRIGHI, F.E. y JOHNSTON, D.A. (1977) Analysis of the frequency and distribution of sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes. *Hum. Genet.*, 35, 345-352
- 34.- DARGLINGTON, C. D. Y Mc LEISH, R. (1952). Action of Maleic hydrazide on the cell. *Nature (Lond)*, 167, 407-409.
- 35.- DAVIDSON, R.L.; KAUFMAN, E.R.; DOUGHERTY, C.P.; OULLETTE, A.M.; DiFOLCO, C.M. y LATT, S.A. (1980). Induction of sister chromatid exchanges by BUdR is largely independent of the BUdR content of DNA. *Nature (Lond.)*, 284, 74-76.
- 36.- DAVIES, H.G. y HAYNES, M.E. (1975). Light and electron microscope investigations on certain leukocytes in a teleost fish and comparison of the envelope-limited monolayers of chromatin structural units in different species. *J. Cell. Sci.*, 17, 263-285.
- 37.- DIEZ, J.L.; GONZALEZ-FERNANDEZ, A. y LOPEZ-SAEZ, J.F. (1976). Mechanisms of mitotic synchronization induced by 5-AU. *Exp. Cell Res.*, 98, 79-89.
- 38.- DILLEHAY, L.E.; THOMPSON, L.H.; MINKLER, J.L. y CARRANO, A.V. (1983). The relationship between sister chromatid exchange and perturbations in DNA replication in mutant EM9 and normal CHO

cells. *Mutat. Res.*, 109, 283-296.

- 39.- DOLFINI, S.F. (1978). Sister chromatid exchange in *Drosophila melanogaster* cell lines in vitro. *Chromosoma*, 69, 339-347.
- 40.- DOUVAS, A.S.; HARRINGTON, C.A. y BONNER, J. (1975). Major nonhistone proteins of rat liver chromatin: Preliminary identification of myosin, actin, tubulin and tropomyosin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 3902-3906.
- 41.- Du PRAW, E.J. (1968). *Cell and Molecular Biology*. Academic Press. New York.
- 42.- DUTRILLAUX, B.; LAURENT, C.; COUTURIER, J. y LEJEUNE, J. (1973). Coloration des chromosomes humains par l'acridine orange apres traitement par 5-bromodeoxyuridine. *C.R. Acad. Sci (D) Paris*, 276, 3179-3181.
- 43.- DUTRILLAUX, B.; FOSSE, A.M.; PRIEUR, M. y LEJEUNE, J. (1974). Analyse des échanges de chromatides dans les cellules somatiques humaines. Traitement au BrdU (5-bromodeoxyuridine) et fluorescence bicolore par l'Acridine orange. *Chromosoma*, 48, 327-340.
- 44.- ELGIN, S.C.R.; FROEHNER, S.C., SMART, J.E. y BONNER, J. (1971). The biology and chemistry of chromosomal proteins. En: *Advances in cell and Molecular Biology*. Ed. E.J. Du Praw. Academic Press, New York, 1, 1-38.
- 45.- EVANS, H.J. (1977). Molecular mechanisms in the induction of chromosome aberrations. En: *Progress in Genetic Toxicology*. Ed. D. Scott B.A. Bridges y F.H. Sobels. Elsevier/North-Holland, Amsterdam. 2, 57-74.

- 46.- FINCH, J.T. y KLUG, A. (1976). Solenoidal model for superstructure in chromatin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 1899-1901.
- 47.- FISHBEIN, L.; FLAMM, W.G. y FLAK, H.L. (1970). Chemical mutagens. Environmental effects on biological system. Academic Press, New York.
- 48.- FISHBEIN, L. (1972). Pesticidal industrial food additive and drug mutagens. En: Mutagenic effects of environmental contaminants. Ed. H.E. Sutton and M.I. Harris. Academic Press, New York, p. 132.
- 49.- FRANCESCHINI, P. (1974). Semiconservative DNA duplication in human chromosomas treated with BRdR and stained with acridine orange. Exp. Cell. Res., 89, 420-421.
- 50.- FRIEBE, B. (1976). Spezifische Giemsa-Färbung von heterochromatischen chromosomen segmenten bei *Vicia faba*, *Allium cepa* und *Paeonia temifolia*. Theor. Appl. Genet., 47, 275-283.
- 51.- FRIEBE, B. (1978). Untersuchungen zum Schwester chromatidenaustausch bei *Secale cereale*. Microsc. Acta, 81, 159-165.
- 52.- FUJII, (1926). Citado en: OHNUKI, Y. (1968). Structure of chromosomes. I Morphological studies of the spiral structure of human somatic chromosomes. Chromosoma (Berl), 25, 402-428.
- 53.- GALLOWAY, S.M. (1977). Ataxia telangiectasia: the effects of chemical mutagens and X-rays on sister chromatid exchanges in blood lymphocytes. Mutat. Res., 45, 343-349.
- 54.- GATTI, M.; SANTIMI, G.; PIMPINELLI, S. y OLIVIERI, G. (1979). Lack of spontaneous sister chromatid exchange in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Genetics, 91, 255-274.

- 55.- O'GEARD, C.R y PEACOCK, W.J. (1969). Sister chromatid exchanges in *Vicia faba*. *Mutat. Res.*, 7, 215-223.
- 56.- GIBSON, D.A. y PRESCOTT, D.M.(1972). Induction of sister chromatid exchanges in chromosomes of rat kangaroo cells by tritium incorporation into DNA. *Exp. Cell. Res.*, 74, 397-402.
- 57.- GIMENEZ-MARTIN, G.; LOPEZ-SAEZ, J.F. y GONZALEZ-FERNANDEZ, A. (1963). Somatic chromosome structure (observation with the light microscope). *Cytologia (Tokyo)*, 28, 381-389.
- 58.- GONZALEZ-GIL, G. y NAVARRETE, M.H. (1982). On the mechanism of differential Giemsa staining of BrdU-substituted chromatids. *Chromosoma*, 86, 375-382.
- 59.- GOZ, B. (1978). The effect of incorporation of 5-halogenated deoxyuridines into the DNA of eukaryotic cells. *Pharmacol. Rev.*, 29, 249-272.
- 60.- GRELL, K.G. (1959). Untersuchungen über die Fortpflanzung und Sexualität der foraminiferen IV *Patellina corrugata*. *Arch. Protistenk.*, 104, 211-235.
- 61.- GRIGGS, H.G. y BENDER, M.A. (1973). Photoreactivation of ultraviolet-induced chromosomal aberrations. *Science*, 179, 86-88.
- 62.- GUTIERREZ, C. y CALVO, A. (1981). Approximated of baseline and BrdU induced sister chromatid exchange frequencies. *Chromosoma (Berl.)*. 83, 685-695.
- 63.- GUTIERREZ, C.; SCHVARTZMAN, J.B. y LOPEZ-SAEZ, J.F. (1981). Effect of growth temperature on the formation of sister chromatid exchan-

- ges in BrdUrd substituted chromosomes. *Exp. Cell. Res.*, 134, 73-79.
- 64.- HAAPALA, O. y NOKKALA, S. (1982). Structure of human metaphase chromosomes. *Hereditas*, 96, 215-228.
- 65.- HAAPALA, O. (1984). Chromatid macrocoiling and chromosome compaction. *Hereditas*, 100, 17-27.
- 66.- HAGLUND, U. y ZECH, L. (1979). Simultaneous staining of sister chromatid exchanges and Q-bands in human chromosomes after treatment with methyl-methane sulphonate, quinanine mustard and quinanine. *Hum. Genet.*, 49, 307-317.
- 67.- HARRISON, C.J.; BRITCH, M.; ALLEN, T.D. y HARRIS, R. (1981). Scanning electron microscopy of G-banded human karyotype. *Exp. Cell. Res.*, 134, 141-153.
- 68.- HARTMANN, K.U. y HEIDELBERGER, C. (1961). Studies on fluorinated pyrimidines, XIII. Inhibition of thymidilate synthetase. *J. Biol. Chem.*, 236, 3006-3013.
- 69.- HAUT, W.F. y TAYLOR, J.H. (1967). Studies of bromouracil deoxyriboside substitution in DNA of bean roots (*Vicia faba*). *J. Mol. Biol.*, 26, 389-401.
- 70.- HOLLSTEIN, M; McCANN, J.; LANGLOSANTO, F.A. y NICHOLS, W.W. (1979). Short-term test for carcinogens and mutagens. *Mutat. Res.*, 65, 133-226.
- 71.- HOWARD, A y PELC, S.R. (1951). Synthesis of nucleoprotein in bean root cells. *Nature*, 167, 599-601.
- 72.- HSU, T.C. y SOMERS, C.E. (1961). *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 47, 396.

- 73.- HSU, T.C. y PATHAK, S. (1976). Differential rate of sister chromatid exchange between euchromatin and heterochromatin. *Chromosoma*, 58, 269-273.
- 74.- HUBERMAN, J.A. y ATTARDI, G. (1966). Isolation of metaphase chromosomes from HeLa cells. *J. Cell. Biol.*, 31, 95-105.
- 75.- IGO-KEMENES, T. y ZACHAU, H.G. (1978). Domains in chromatin structure. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 42, 109-118.
- 76.- IKUSHIMA, T. y WOLFF, S. (1974). Sister chromatid exchanges induced by light-flashes to 5-bromodeoxyuridine and 5-Iododeoxyuridine-substituted chinese hamster chromosomes. *Exp. Cell. Res.*, 87, 15-19
- 77.- ISHII, I. y BENDER, M.A. (1980). Effect of inhibition of DNA synthesis on spontaneous and ultraviolet light-induced sister chromatid exchanges in chinese hamster. *Mutat. Res.*, 79, 19-32.
- 78.- JØRGENSEN, A.L. y BAK, A.L. (1982). The last order of coiling in human chromosomes. *Exp. Cell. Res.*, 139, 447-451.
- 79.- KATO, H. (1972). *Annu Rep. Natl. Inst. Genet.*, 22, 43.
- 80.- KATO, H. (1973). Induction of sister chromatid exchanges by U.V. light and its inhibition by caffeine. *Exp. Cell. Res.*, 82, 383-390.
- 81.- KATO, H. (1974a). Spontaneous sister exchanges detected by BUdR-labeling method. *Nature (London)*, 251, 70-72.
- 82.- KATO, H. (1974b). Is isolabelling a false image?. *Exp. Cell. Res.*, 89, 416-420.
- 83.- KATO, H. (1974c). Possible role of DNA synthesis in formation

- of sister chromatid exchanges. *Nature (Lond.)*, 252, 739-741.
- 84.- KATO, H. (1974d). Induction of sister chromatid exchange by chemical mutagens and its possible relevance to DNA repair. *Exp. Cell. Res.*, 85, 239-247.
- 85.- KATO, H. (1975). *Annu. Rep. Natl. Inst. Genet.*, 25, 31.
- 86.- KATO, H. (1977a). Mechanism for sister chromatid exchanges and their relation to the production of chromosomal aberrations. *Chromosoma (Berl.)*, 59, 179-191.
- 87.- KATO, H. (1977b). Spontaneous and induced sister chromatid exchanges as revealed by the BUdR-labeling method. *Int. Rev. Cytol.*, 37, 55-97.
- 88.- KATO, H. (1979). Preferential occurrence of sister chromatid exchanges at heterochromatin-euchromatin junctions in the wallaby and hamster chromosomes. *Chromosoma*, 74, 307-316.
- 89.- KATO, H. y SHIMADA, H. (1975). Sister chromatid exchanges induced by mitomycin C: a new method of detecting DNA damage at chromosomal level. *Mutat. Res.*, 28, 459-464.
- 90.- KIHLMAN, B.A. (1975). Sister chromatid exchanges in *Vicia faba*: Effects of thiotepa, caffeine and 8-ethoxycaffeine on the frequency of sister chromatid exchanges. *Chromosoma*, 51, 11-18.
- 91.- KIHLMAN, B.A. y KRONBORG, D. (1975). Sister chromatid exchanges in *Vicia faba*. I. Demonstration by a modified fluorescent plus Giemsa (FPG) technique. *Chromosoma*, 51, 1-10.
- 92.- KIHLMAN, B.A., ANDERSSON, H.C. y MATARAJAN, A.T. (1977). Molecular

mechanism in the production of chromosomal aberrations: Studies with the 5-bromodesoxyuridine-labelling method. En: de la Chapelle A., Sorsa, M. Eds. *Chromosomes Today*, 6, Holland Biomedical Press. Amsterdam, pp. 287-296.

- 93.- KIM, A. (1974). Chromatid austausch und heterochromatin veränderungen menschlicher chromosomen nach BrdU-markierung. *Hummangenetik*, 25, 179-188.
- 94.- KLIGERMAN, A.D. y BLOOM, S.E. (1975). A cytogenetic model for the study of chromosome aberrations in fishes. *Mutat. Res.*, 31, 334-335
- 95.- KORNBERG, R.D. (1974). Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA. *Science*, 184, 868-871.
- 96.- KORENBERG, J.R. y FREEDLENDER, E.F. (1974). Giemsa technique for the detection of sister chromatid exchanges. *Chromosoma*, 48, 355-360.
- 97.- KORNBERG, A. (1980). DNA replication. Ed. Freeman, San Francisco.
- 98.- LATT, S.A. (1973). Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 70, 3395-3399.
- 99.- LATT, S.A. (1974a). Localization of sister chromatid exchanges in human chromosomes. *Science*, 185, 74-76.
- 100.- LATT, S.A. (1974b) Sister chromatid exchanges, indices of human chromosome damage and repair: detection by fluorescen and induction by mitomicin C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 3162-3166.

- 101.- LATT, S.A.; ALLEN, J.; BLOOM, S.E.; CARRANO, A.; FALKE, E.; KRAM, D.; SCHNEIDER, F.; SCHRECK, R.; TICE, R.; WHITFIELD, B. y WOLFF, S. (1981). Sister chromatid exchange: a report of the Gene-Tox. Program. *Mutation Res.*, 87, 17-62.
- 102.- LeCALVEZ, J. (1938). Recherches sur les Foraminifères. I. Développement et reproduction. *Arch. Génér.*, 87, 211-243.
- 103.- LeCALVEZ, J. (1950). Recherches sur les Foraminifères. II. Place de la meiosis et sexualité. *Arch. Zool. Expér. Génét.*, 87, 211-243
- 104.- LEWIN, B. (1975). The nucleosome: Subunit of mammalian chromatin *Nature (Lond)*, 254, 651-653.
- 105.- LILLEY, D.M.J. y PARDON, J.F. (1979). Structure and function of chromatin. *Ann. Rev. Genet.*, 13, 197-233.
- 106.- LIN, M.S. y ALFI, O.S. (1976). Detection of sister chromatid exchange by 4'-6'-diamino-2-phenylindone fluorescence. *Chromosoma* 57, 219-225.
- 107.- LOIERO, M.; DURANTE, M.; TAGLIASACCHI, A.M. y AVANZI, S. (1982). Two patterns of labelling by tritiated highly repetitive DNA in metaphase chromosomes of *Allium cepa*. *Cytobios*, 34, 15-24.
- 108.- MAIO, J.J. y SCHILDKRAUT, C.L. (1969). Isolated mammalian metaphase chromosomes. II Fraccionated chromosomes of mouse and chinese hamster cell. *J. Molec. Biol.*, 40, 203-219.
- 109.- MAKINO, S. (1936). The spiral structure of chromosomes in the meiotic division of *Podisma* (Orthoptera). *J. Fac. Sci. Hokkaido Imp. Univ.*, Ser. VI, 3, 29-40.

- 110.- MAKINO, S. y MOMMA, E. (1950). Observations on the structure of grasshopper chromosomes subjected to a new acetocarmine treatment J. Morph., 86, 229-251.
- 111.- MANNA, G.K.; DAS, R.K. y DAS, P.K. (1976). Chromosome aberrations in mice treated with maleic hydrazide, uranil and guanine. Nucleus, 19, 40-46.
- 112.- MARAZIA, M. y MAGGINI, F. (1977). Reassociation kinetics of the DNA in *Allium cepa* y *Allium sativum*. Atti AGI, 22, 199-204.
- 113.- MARIN, G. Y PRESCOTT, D.M. (1964). The frequency of the sister chromatid exchanges following exposure to various doses of H^3 -thymidine or X-rays. J. Cell. Biol., 21, 159-167.
- 114.- MAZARIMAS, J.A. y STETKA, D.G. (1978). Direct evidence for the role of incorporated BrdUrd in the induction of sister chromatid exchanges. Exp. Cell. Res., 117, 23-30.
- 115.- Mc. CLINTOCK, B. (1938). The production of homozygous deficient tissues with mutant characteristics by mean of the aberrant mitotic behaviour of ring-shaped chromosomes. Genetics, 23, 315-376.
- 116.- MILLER, R.C.; ARONSON, M.M. y NICHOLS, W.W. (1976). Effects of treatment on differential staining of BrdU labeled metaphase chromosomes: three-way differentiation of M3 chromosomes. Chromosoma, 55, 1-11.
- 117.- MOLINA, R. (1973). Análisis experimental de la estructura del cromosoma en células eucarióticas. Tesis Doctoral.(1973)
- 118.- MUSICH, P.R.; BROWN, F.L. y MAIO, J.J. (1977). Subunit structure of chromatin and the organization of eukaryotic highly repetitive

DNA: Nucleosomal proteins associated with a highly repetitive mammalian DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash), 74, 3297-3301

- 119.- MUSILOVÁ, J.; MICHALOVA, K. y URBAN, J. (1979). Sister-chromatid exchanges and chromosomal breakage in patients treated with cytostatics. Mutat. Res., 67, 289-294.
- 120.- NATARAJAN, A.T. y AHNSTRÖM, G. (1973). Induced chromosomal aberrations and heterochromatin. En: Modern aspects of Cytogenetics: Constitutive heterochromatin in man. Symp. Med. Hoechst 6, Schattner Verlag, Stuttgart, New York, 215-223.
- 121.- NATARAJAN, A.T. y KLASTERSKA, I. (1975). Heterochromatin and sister chromatid exchanges in the chromosomes of *Microtus agrestis*. Hereditas, 79, 150-154.
- 122.- NATARAJAN, A.T.; VANZEELAND, A.A., VERDEGAAL-IMMERZEEL, E.A.M. y FILON, A.R. (1980). Studies on the influence of photoreactivation on the frequencies of U.V.-induced chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges and pyrimidine dimers in chicken embryonic fibroblast. Mutation Res., 69, 307-317.
- 123.- NATARAJAN, A.T.; CSUKAS, I y VANZEELAND, A.A. (1981). Contribution of incorporated 5-bromo-deoxyuridine in DNA to the frequencies of sister chromatid exchanges induced by inhibitors of poly-(ADP-ribose)-polimerase. Mutat. Res., 84, 125-132.
- 124.- OCKEY, CH. (1980). Differences between "spontaneous" and induced sister chromatid exchanges with fixation time and their chromosome localization. Cytogenet. Cell. Genet., 26, 223-235.
- 125.- OKADA, T.A. y COMINGS, D.E. (1980). A search for protein cores in chromosomes: Is the scaffold an artifact?. Am. J. Hum. Genet.

32, 814-832.

- 126.- OHNUKI, Y. (1965). Demonstration of the spiral structure of human chromosomes. *Nature*, 208, 916-917.
- 127.- OHNUKI, Y. (1968). Structure of chromosomes: I. Morphological studies of the spiral structure of human somatic chromosomes. *Chromosoma (Berl.)*, 25, 402-428.
- 128.- O'NEILL, J.P.; HEARTLEIN, M.W. y PRESTON, R.J. (1983). Sister-chromatid exchanges and gene mutations are induced by the replication of 5-bromo- and 5-chloro-deoxyuridine substituted DNA. *Mutat. Res.*, 109, 259-270.
- 129.- OUDET, P.; GROSS-BELLARD, M. y CHAMBON, P. (1975). Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell*, 4, 281-300.
- 130.-PAINTER, R.B. (1980). A replication model for sister-chromatid exchange. *Mutat. Res.*, 70, 337.
- 131.- PARDON, J.F.; RICHARDS, B.M. y COTTER, R.J. (1974). X-ray diffraction studies on oriented nucleohistone gels. *Cold Spring Harbor Symp, Quant Biol.*, 38, 75-81.
- 132.- PARDUE, M.L. y GALL, J.C. (1970). Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science N.Y.*, 168, 1356-1358.
- 133.- PATHAK, S.; STOCK, A.D. y LUSBY, A. (1975). A combinatory of sister chromatid differential staining and Giemsa banding. *Experientia*, 31, 916-917.

- 134.- PAULSON, J.R. y LAEMMLI, U.K. (1977). The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell*, 12, 817-828.
- 135.- PEACOCK, W.J. (1963). Chromosome duplication and structure as determined by autoradiography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 49, 793-801.
- 136.- PEACOCK, W.J. (1965). *Natl. Cancer Inst., Monogr.*
- 137.- PERRY, P. y WOLFE, S. (1974). New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*, 251, 156-158.
- 138.- PERRY, P. y EVANS, H.J. (1975). Cytological detection of mutagens carcinogen exposure by sister chromatid exchanges. *Nature (Lond.)* 258, 121-125.
- 139.- PERRY, P.E. (1983). Introduction of sister chromatid exchanges (SCE_s) by thymidine and the potentiation of mutagen-induced SCE_s in chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.*, 109, 219-229.
- 140.- PINON, R. y SALTS, Y. (1977). Isolation of folded chromosomes from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 2850-2854.
- 141.- POOLEY, A.S.; PARDON, J.F. y RICHARDS, B.M. (1974). The relation between the unit thread of chromosomes and isolated nucleohistone J. *Mol. Biol.*, 85, 533-549.
- 142.- PRESCOTT, D.M. (1970). The structure and replication of eukaryotic chromosomes. *Adv. Cell. Biol.*, 1, 57-117.
- 143.- PUCK, T.T. y KAO, F.T. (1967). Genetics of somatic mammalian

- cells. V. treatment with 5- Bromodeoxyuridine and visible light for isolation of nutritionally deficient mutants. Proc. Natl. Acad. Sci USA, 58, 1227-1234.
- 144.- RENZ, M.; NEHLS, P. y HOZIER, J. (1977). Involvement of histone H1 in the organisation of the chromosome fiber. Proc. Natl. Acad. Sci USA, 74, 1879-1883.
- 145.- RIS, H. (1961). Ultrastructure and molecular organization of genetic systems. Canad. J. Genet. Cytol., 3, 95-120.
- 146.- RIS, H. y KUBAI, D.F. (1970). Chromosome structure. Ann. Rev. Genet., 4, 263-294.
- 147.- ROMMELAERE, J.; SUSKIND, M. y ERREA, M. (1973). Chromosomes and chromatid exchanges in chinese hamster cells. Chromosoma, 41, 243-257.
- 148.- SAITO, M. (1961). Studies in the mitosis of Euglena. I. On the chromosome cycle of Euglena viridis. Ehrbg. J. Protozool, 8, 300-307.
- 149.- SANTI, D.V. y McHENRY, C.S. (1972). 5-Fluoro-2' deoxyuridylylate: Covalent complex with thymidilate synthetase. Proc. Natl. Acad. Sci USA, 69, 1855-1857.
- 150.- SCHEUERMANN, W. y KLAFFKE-LOBSIEN, G. (1973). Exp. Cell. Res., 76, 428.
- 151.- SCHNEDL, W.; PUMBERGER, W.; CZAKER, R.; WAGENBICHLER, P. Y SCHWARZACHER, H.G. (1976). Increased sister chromatid exchange events in the human late replicating X. Hum. Genet., 32, 199-102.

- 152.- SCHUBERT, I y RIEGER, R. (1977). On the expressivity of aberration hot spots after treatment with mutagens showing delayed and non delayed effects. *Mutat. Res.*, 44, 327-336.
- 153.- SCHUBERT, I. y MEISTER, A. (1979). Possible connections between the modes of origination of sister chromatid exchanges (SCE_s) and chromatid aberrations. *Stud. Biophys.*, 76, 211-217.
- 154.- SCHUBERT, I.; STURELID, S.; DOBEL, P. y RIEGER, R. (1979). Intrachromosomal distribution patterns of mutagen-induced sister chromatid exchanges and chromatid aberrations in reconstructed karyotypes of *Vicia faba*. *Mutat. Res.*, 59, 27-38.
- 155.- SCHUBERT, I.; KUNZEL, G.; BRETSCHNEIDER, H.; RIEGER, R. y NICOLLOFF, H. (1980). Sister chromatid exchanges in barley. *Theor. Appl. Genet.*, 56, 1-4.
- 156.- SCHUBERT, I. y RIEGER, R. (1981). Sister chromatid exchanges and heterochromatin. *Hum. Genet.*, 57, 119-130.
- 157.- SCHVARTZMAN, J.B. y CORTES, F. (1977). Sister chromatid exchanges in *Allium cepa*. *Chromosoma*, 62, 119-131.
- 158.- SCHVARTZMAN, J.B. y GUTIERREZ, C. (1980). The relationship between the cell time available for repair and the effectiveness of a damaging treatment in provoking the formation of sister-chromatid exchanges. *Mutat. Res.*, 72, 483-489.
- 159.- SCHVARTZMAN, J.B. y GOYANES, V. (1980). A new method for the identification of sister chromatid exchanges per cell cycle in BrdUrd-substituted chromosomes. *Cell. Biol. Inter. Reports*, 4, 415-423.

- 160.- SCHVARTZMAN, J.B.; CORTES, F. Y LOPEZ-SÁEZ , J.F. (1978). Sister subchromatid exchanged segments and chromosome structure. *Exp. Cell Res.*, 114, 443-446.
- 161.- SCHVARTZMAN, J.B.; POSTIGO, R. y GUTIERREZ, C. (1979). Analysis of visible light induced sister chromatid exchange in 5-bromodeoxyuridine substituted chromosomes. *Chromosoma*, 74, 317-328.
- 162.- SCHVARTZMAN, J.B.; CORTES, F.; GONZALEZ-FERNANDEZ ; GUTIERREZ, C. y LOPEZ-SÁEZ , J.F. (1979). On the nature of sister chromatid exchanges in 5-Bromodeoxyuridine substituted chromosomes. *Genetics*, 92, 1251-1264.
- 163.- SCHWEIZER, D. (1973). Vergleichende untersuchungen zur leings-differenzierung der chromosomen von *Vicia faba* L. *Verh. Naturforsch. Ges. (Basel)*, 83, 1-75.
- 164.- SHIRAICHI, Y. y SANDBERG, A.A. (1978). Effects of mitomycin C on sister chromatid exchanges in normal and Bloom's syndrome. *Mutat. Res.*, 49, 233- 238.
- 165.- SHIRAIISHI, Y.; YOSIDA, T.H. y SANDBERG, A.A. (1983). Analyses of bromodeoxyuridine-associated sister chromatid exchanges (SCE_s) in Bloom syndrome based on cell fusion. Single and twin SCE_s in endoreduplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 4369-4373.
- 166.- SKIDMORE, C.; WALKER, I.O.; PARDON, J.F. y RICHARDS, B.M. (1973). The structure of partially histone depleted nucleohistone. *FEBS lett.*, 32, 175-178.
- 167.- SOCHER, S.H. y DAVIDSON, D.J. (1971). *J. Cell. Biol.*, 48, 248.
- 168.- SOLOMON, E. y BOBROW, M. (1975). Sister chromatid exchanges. A

sensitive assay of agents damaging human chromosomes. *Mutat. Res.*, 30, 273-278.

- 169.- SONO, A. y SAKAGUCHI, K. (1978). Induction of sister chromatid exchanges in chinese hamster cells by antitumor agents and its relation to chromosome aberrations. *Cell. Struct. Funct.*, 3, 341-347.
- 170.- SONO, A. y SAKAGUCHI, K. (1980). The distribution of sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations induced by 5-Fluorodeoxyuridine and ethyl metanosulfonato in the euchromatin and heterochromatin of chinese hamster cells. *Cell. Struct. Funct.*, 5, 175-182.
- 171.- SPARVOLI, E.; GAY, H. y KAUFMAN, B.P. (1965). Number and pattern of association of chromonemata in the chromosomes of *Tradescantia Chromosoma (Berl.)*, 16, 415-435.
- 172.- SPEIT, G. y VOGEL, W. (1979). The effect on sister chromatid exchanges of drugs and dyes by intercalation and photoactivation. *Mutat. Res.*, 59, 223-229.
- 173.- STACK, S. y COMINGS, D.E. (1979). The chromosomes and DNA in *Allium cepa*. *Chromosoma (Berlin)*, 70, 161-181.
- 174.- STOCKER, J.C.; SOGO, J.M.; DIEZ, J.L. y GIMENEZ-MARTIN, G. (1969). Alteration in the SAT-chromosome of *Allium cepa* affecting the size of the nucleolus. *Experientia (Basel)*, 25, 773-774.
- 175.- STRATLING, W.; MULLER, U. y ZENTGRAF, H. (1978). The higher order repeated structure of chromatin is built up of globular particles containing eight nucleosomes. *Exp. Cell. Res.*, 117, 301-311.

- 176.- STROBEL, R.; RONZINSKY-KÜCHER, G. y ROHRBORN, G. (1979). Induction of point mutation in the Salmonella microsome test and of sister-chromatid exchanges as well as chromosomal aberrations CHO cells (CHO line). *Mutat. Res.*, 60, 349-355.
- 177.- STUBBLEFIELD, E. (1973). The structure of mammalian chromosomes. *Int. Rev. Cytol.*, 35, 1-60.
- 178.- STUBBLEFIELD, E.; KLEVECZ, R. y DEAVEN, L. (1967). *J. Cell Physiol.* 69, 345.
- 179.- SUZUKI, H.; YOSIDA, T.M. y SANDBERG, A.A. (1982). Analysis of single and twin sister chromatid exchanges in endoreduplicated normal and syndrome B-lymphoid cells. *Chromosoma*, 87, 1-8.
- 180.- SUZUKI, H. y YOSHIDA, T.H. (1983). Relation between the sister chromatid exchanges and metabolic perturbation of deoxyribonucleotide synthesis. *Jpn. J. Genet.*, 58, 369-372.
- 181.- SZYBALSKI, W. (1974). X-ray sensitization by halopyrimidines. *Cancer Chemother Rep.*, 58, 539-557.
- 182.- TAYLOR, J.H.; WOODS, P.S. y HUGHES, W.L. (1957). The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium labelled thymidine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 43, 122-128.
- 183.- TAYLOR, J.H. (1958). Sister chromatid exchanges in tritium labelled chromosomes. *Genetics*, 43, 515-529.
- 184.- TAYLOR, J.H. (1959). The organization and duplication of genetic material. *Proc. Int. Congr. Genet.*, 10th, 1, 63-78.

- 185.- THELMA, B.K. y RAO, S.R.V. (1982). In vivo sister chromatid exchanges in the euchromatin and constitutive heterochromatin of the indian mole rat, *Nesokia indica*. *Cytogenet. Cell. Genet.*, 33, 319-326.
- 186.- TICE, R.; CHAILLET, J. y SCHNEIDER, E.L. (1975). Evidence derived from sister chromatid exchanges of restricted rejoining of chromatid sub-units. *Nature*, 256, 642-644.
- 187.- TROSKO, J.E. y WOLFF, S. (1965). Strandedness of *Vicia faba* chromosomes as revealed by enzyme digestion studies. *J. Cell. Biol.*, 26, 125-135.
- 188.- TSUJI, V y KATO, H (1981). Three-way differential staining of sister chromatid in M3 chromosomes. *Exp. Cell. Res.*, 134, 433-444.
- 189.- UTSUMI, K.R. (1982). Scanning electron microscopy of Giemsa-stained chromosomes. *Chromosoma*, 86, 683-702.
- 190.- VOSA, C.G. (1976). Sister chromatid exchange bias in *Vicia faba* chromosomes. En: Jones K. Brandham P.E. (eds.). *Current chromosome research*. Elsevier/North Holland. Biomedical Press. Amsterdam. pp. 105-114.
- 191.- WHITE, W (1940). The heteropycnosis of sex chromosomes and its interpretation in terms of spiral structure. *J. Genet.*, 40, 67-82.
- 192.- WILMER, J.W.G.M. y NATARAJAN, A.T. (1981). Induction of sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations by gamma-irradiated nucleic acid constituents in CHO cells. *Mutat. Res.*, 88, 99-107.

- 193.- WOLFF, S. (1977). Sister chromatid exchanges. *Ann. Rev. Genet.*, 11, 183-201.
- 194.- WOLFF, S. (1982). Chromosome aberrations sister chromatid exchanges and the lesions that produce them. *Sister Chromatid Exchanges*, 42-54.
- 195.- WOLFF, S.L. y HEWITT, G.M. (1966). The strandedness of meiotic chromosomes from *Oncopeltus*. *J. Cell Biol.*, 31, 31-42.
- 196.- WOLFF, S. y PERRY, P. (1974). Differential Giemsa staining of sister chromatids and the study of sister chromatid exchanges without autoradiography. *Chromosoma (Berl.)*, 48, 431-353.
- 197.- WOLFF, S. y PERRY, P. (1975). Insights of chromatid structure from sister chromatid exchange ratios and the lack of both isolabelling and heterolabelling as determined by the FPG technique. *Exp. Cell. Res.*, 93, 23-30.
- 198.- WOLFF, S.; BODYCOTE, J. y PAINTER, R.B. (1974). Sister chromatid exchanges induced in chinese hamster cells by UV irradiations of different stages of the cell cycle: the necessity for cells to pass through S. *Mutat. Res.*, 25, 73-81.
- 199.- YOSIDA, T.H.; SUZUKI, H. y KUSANO, T. (1983). Sister chromatid exchanges in the Uridine requiring chinese hamster cell line, UR-216, cultured in the Uridine rich o Starved medium. *Proc. J. Acad* 59-B(7), 223-226.
- 200.- ZAKHAROV, A.F. y EGOLINA, N.A. (1972). Differential spiralization along mammalian mitotic chromosomes. I. BUdR-revealed differentiates in chinese hamster chromosomes. *Chromosoma*, 38, 341-365.

- 201.- ZAKHAROV, A.F.; BARANOVSKAYA, L.I.; IBRAIMOV, A.V.; BENJUSCH, V.A.; DEMINTSEVA, V.S. y OBLAPENKO, N.G. (1974). Differential spiralization along mammalian mitotic chromosomes. II. 5-bromodeoxyuridine and 5-bromodeoxycytidine revealed differentiation in human chromosomes. *Chromosoma (Berl)*, 44, 343-359.
- 202.- ZWIETLINSKA, Z y ZUK, J. (1978). Cytotoxic effects of maleic hydrazide. *Mutat. Res.*, 55, 15-30.

FACULTAD DE CIENCIAS BIOL.

...idó el Tribunal integrado por los...
...de la fecha, para juzgar la Tesis...

8º Pablo Escalza Ruiz

"Intercambios entre cromátidas hermanas: frecuencia, localización y asociación al estudio de la estructura del cromosoma"

...la calificación de Sobresaliente
 Cum Laude

Sevilla, 22 de Febrero

1985

El Vocal
[Signature]

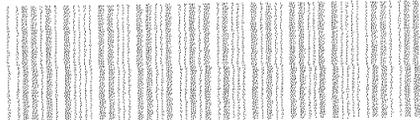
El Vocal
[Signature]

El Vocal
[Signature]

J. F. López-Sáez

El Secretario
[Signature]

El Doctor
[Signature]



500294067

FBI F TD-099

294067