

## 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 *Obtención de células metafásicas*

Las células metafásicas se obtuvieron de un cultivo celular de células HeLa, el cual había crecido las últimas doce horas en presencia de colcemida (ver sección 2.1.4). El objetivo principal de este cultivo era obtener el mayor número posible de células en metafase, ya que en los posteriores pasos de aislamiento y purificación (2.2.2) el rendimiento acumulado de obtención de cromosomas iba disminuyendo progresivamente.

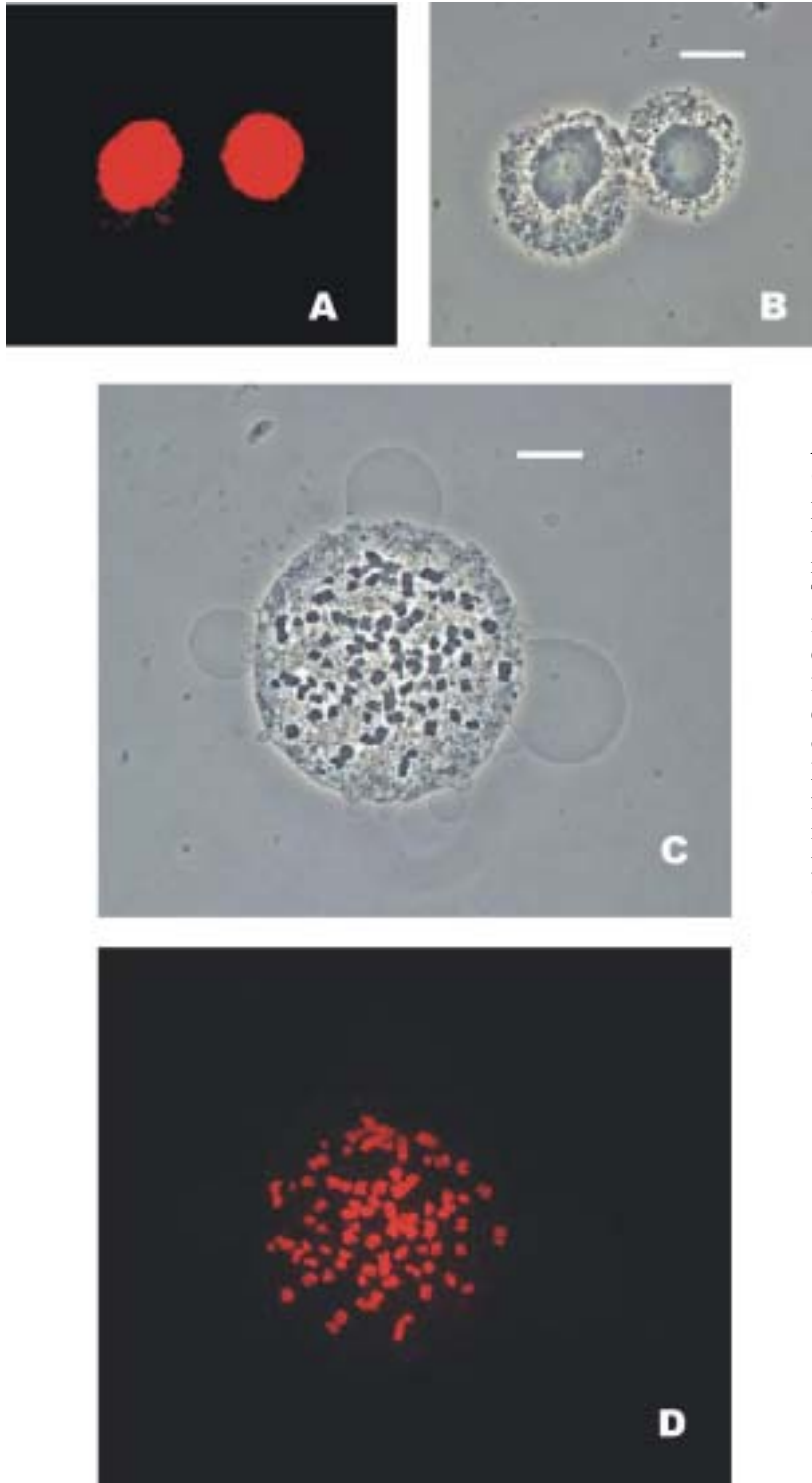
Como primer criterio para saber la cantidad de células metafásicas obtenidas, nos basamos en la cantidad de células en división. Observadas en el microscopio óptico a 40 aumentos, las células en división flotaban, eran redondas y refringentes. En cambio, las células que no se dividían tenían su aspecto estrellado y permanecían unidas a la superficie del frasco de cultivo. Teniendo en cuenta este criterio visual calculamos que el 80-90% de las células se estaban dividiendo cuando procedíamos a su extracción del frasco de cultivo (sección 2.2.1).

Como segundo criterio, durante el proceso de extracción de células se efectuaba un recuento de éstas (sección 2.1.3). De esta manera podíamos saber con bastante exactitud el número de células totales extraídas, las cuales en su mayoría deberían estar en metafase.

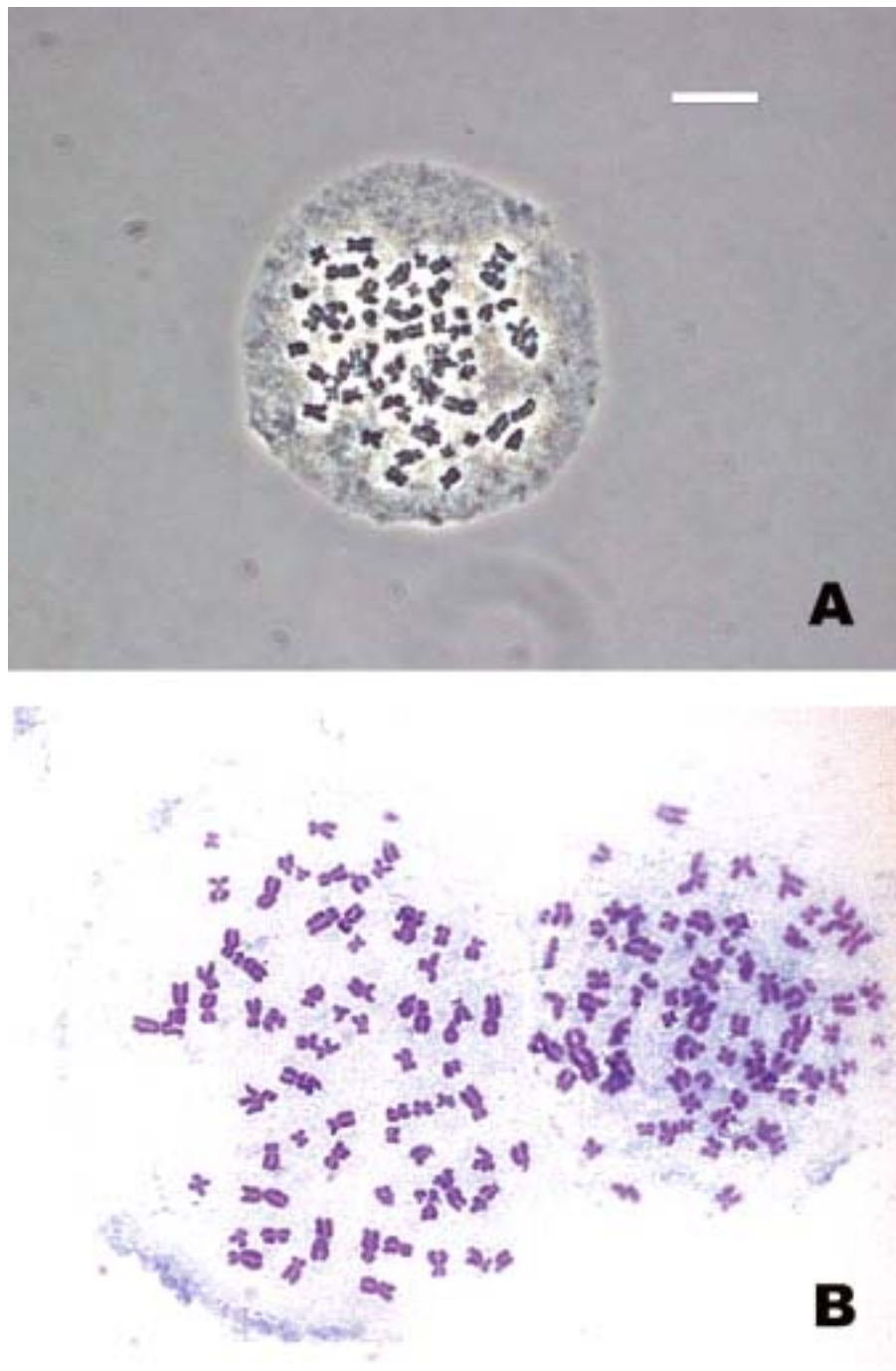
En ocasiones, como último criterio, se extraían alícuotas de las células obtenidas y se preparaban para su observación por microscopía óptica (sección 2.2.3.1). De esta manera pudimos constatar que aproximadamente el 65-75% de las células estaban paradas en metafase. Es decir, que en nuestra extracción final aún teníamos una cierta población de células interfásicas (figura 3.1.1A y B). La observación de estas mismas alícuotas a 100 aumentos nos sirvió para comprobar el buen estado de los cromosomas metafásicos antes de su aislamiento y purificación (figura 3.1.1C y D). Estas células también se observaron al microscopio óptico, utilizando técnicas más clásicas mediante fijación en metanol ácido acético y tinción con Giemsa (sección 2.2.3.2) para corroborar la buena calidad de los cromosomas obtenidos (figura 3.1.2).

Finalmente, en la figura 3.1.3, se muestra a modo comparativo una célula preparada de forma clásica (A) (medio hipotónico, fijación en metanol-ácido acético y tinción con

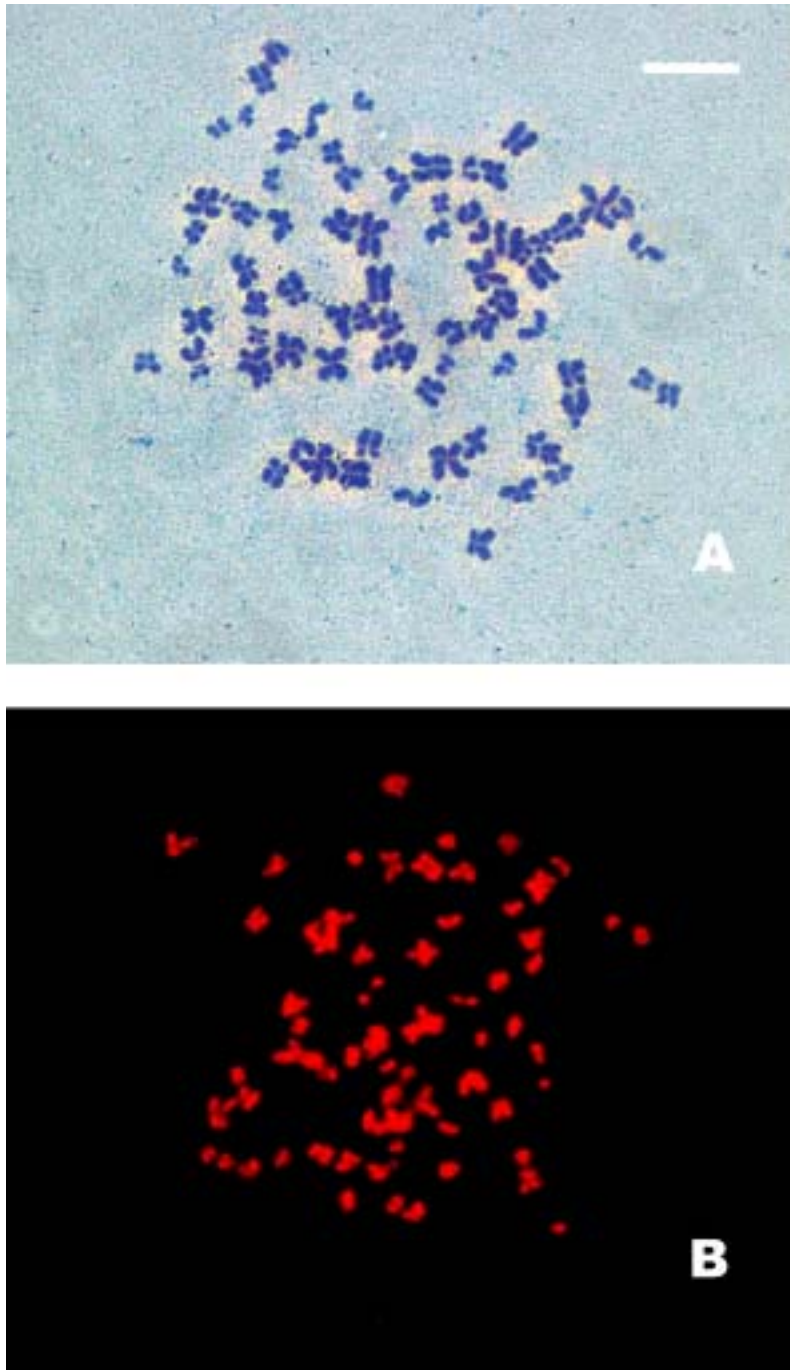
Giemsa) y otra teñida con yoduro de propidio (**B**). En ambas se puede apreciar el buen estado de los cromosomas.



**Figura 3.1.1.** Células interfásicas (**A**) y (**B**) y metafásicas (**C**) y (**D**) procedentes de la extracción de un cultivo celular (sección 2.2.1), resuspendidas directamente en TeaKMC-MgCl<sub>2</sub> 5 mM (sección 2.2.2.3) y posteriormente teñidas con Yoduro de propidio (sección 2.2.3.1). El medio de las células en los paneles **A** y **B**, en esta ocasión además contenía Tritón X-100 al 0.5% (p/v). Las células fueron observadas por microscopía de fluorescencia (**A**) y (**D**) y de contraste de fases (**B**) y (**C**). Las barras representan 10  $\mu$ m.



**Figura 3.1.2.** Células metafásicas resuspendidas directamente en medio TeaKMC-MgCl<sub>2</sub> 1.7 mM (sección 2.2.2.3). A continuación, en ambos paneles las células fueron fijadas en metanol ácido acético (2.2.3.2.1) y en caso de la figura **B**, teñidas con colorante Giemsa (sección 2.2.3.2.2). Estas imágenes fueron obtenidas mediante microscopía óptica de contraste de fases. Barra 10  $\mu$ m.



**Figura 3.1.3.** Células metafásicas resuspendidas en medio hipotónico, fijadas con metanol-ácido acético y teñidas con Giemsa (sección 2.2.3.2) (A). Células resuspendidas directamente en TeaKMC-MgCl<sub>2</sub> 5 mM (sección 2.2.3.2) y teñidas con yoduro de propidio (sección 2.2.3.1) (B). Estas imágenes fueron tomadas por microscopía óptica de contraste de fases (A) y de fluorescencia (B). Barra 10  $\mu$ m.

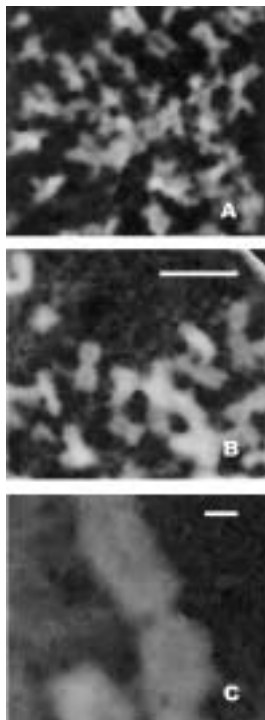
### 3.2 Obtención de cromosomas metafásicos

Se emplearon diferentes técnicas y medios para la obtención, purificación y preparación de los cromosomas para su observación al microscopio electrónico. Según el tipo de técnica utilizada, los resultados fueron más o menos adecuados para nuestros objetivos.

#### 3.2.1 Cromosomas observados en el interior de las células metafásicas

En primer lugar se intentó observar los cromosomas metafásicos en su medio natural, es decir, en el interior de la célula. De esta manera pensábamos que lograríamos visualizar su estructura intacta y en unas condiciones similares a la fisiológicas.

Con este objetivo, las células obtenidas directamente en TeaKMC-MgCl<sub>2</sub> 5 mM y posteriormente resuspendidas en TeaKMC-MgCl<sub>2</sub> 1.7 mM (sección 2.2.2.3.2) se extendieron sobre rejilla (sección 2.3.5.1) sin romper previamente las membranas celulares. Después de fijar la muestra (sección 2.3.8.2) y platinarla (sección 2.3.9.1), se observaron los cromosomas al microscopio electrónico.

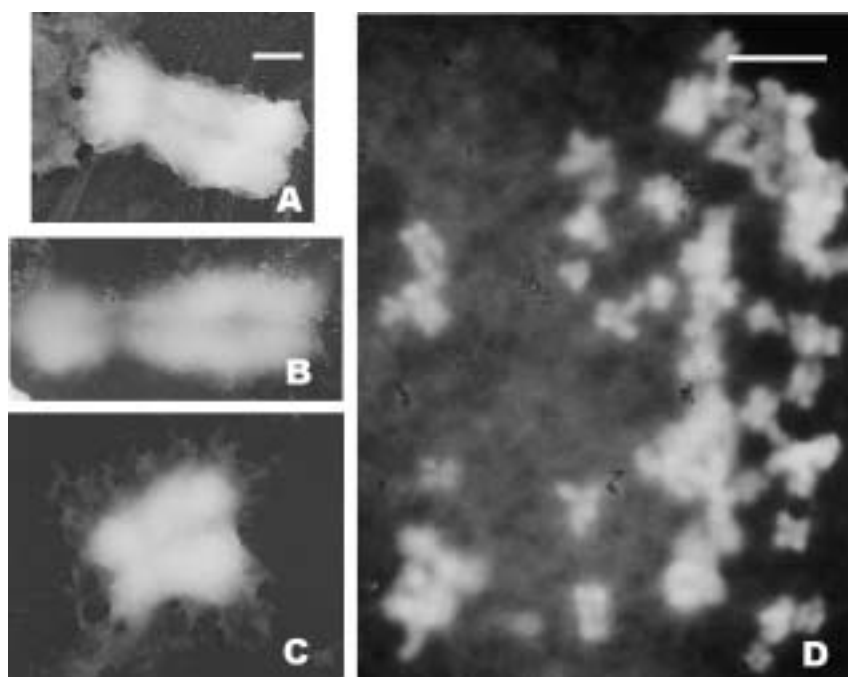


**Figura 3.2.1.** Cromosomas metafásicos en el interior de células intactos. Los cromosomas fueron obtenidos directamente en medios TeaKMC-MgCl<sub>2</sub> 5 mM y posteriormente resuspendidos en TeaKMC-MgCl<sub>2</sub> 1.7 mM (sección 2.2.2.3.2). La extensión de la muestra sobre las rejillas, en esta ocasión se efectuó sin la previa rotura de las membranas celulares (sección 2.3.5.1). A continuación las células fueron fijadas (sección 2.3.8.2) y finalmente platinadas (sección 2.3.9.1) para su observación al microscopio electrónico. La barra en los paneles **A** y **B** corresponde a 5 µm, mientras que en el panel **C** equivale a 600 nm.

En la figura 3.2.1 se puede observar claramente la existencia de un elevado número de cromosomas en el interior de las células. Sin embargo en estas condiciones la presencia de un velo formado por material celular dificulta considerablemente la observación de las estructuras cromosómicas, incluso cuando se utilizaban magnificaciones elevadas (figura 3.2.1C).

### 3.2.2 Cromosomas fijados con metanol-ácido acético

Después de observar mediante microscopía óptica las células metafásicas obtenidas en metanol-ácido acético (sección 2.2.3.2.1 y figuras 3.1.2 y 3.1.3A) y comprobar la excelente calidad de los cromosomas obtenidos en este tipo de preparaciones clásicas, decidimos también intentar observar estos mismos cromosomas en el microscopio electrónico.



**Figura 3.2.2.** Cromosomas resuspendidos en medio hipotónico y fijados en metanol ácido acético (sección 2.2.3.2.1). A continuación fueron extendidos en rejilla (sección 2.3.5.2), fijados con gluteraldeído al 2% y deshidratados a través de un gradiente de acetona (A) y (B) (ver sección 2.3.8.3). Los cromosomas en (C) y (D), además tuvieron un tratamiento adicional con tetróxido de osmio (ver sección 2.3.8.3). En las muestras de la figura B y D, además se aplicó la técnica de *Critical Point Drying* (sección 2.3.8.3). Únicamente en la figura A los cromosomas fueron platinados. En los paneles A, B y C la barra representa 600 nm, mientras que en el panel D corresponde a 5  $\mu$ m.

Los cromosomas obtenidos en este medio fueron extendidos en rejilla y fijados por los procedimientos descritos en las secciones 2.3.5.2 y 2.3.8.3, respectivamente. La figura 3.2.2 muestra el resultado de estos experimentos. En ella se puede apreciar una mejora en la observación de los cromosomas obtenidos, respecto a la figura 3.2.1 (comparar con 3.2.2B y C). Sin embargo, en ocasiones todavía se aprecia la presencia de material celular (figura 3.2.2D). Cuando estos cromosomas además eran platinados (figura 3.2.2A) la resolución era buena, pudiéndose apreciar claramente algunos detalles de la estructura global de éstos.

Aunque los resultados obtenidos con este sistema fueron, en general buenos, y nos permitieron visualizar cromosomas con una buena integridad física, pensamos que sería más interesante intentar observar cromosomas obtenidas en condiciones más fisiológicas y que no hubieran pasado por medios tan poco naturales como es el tratamiento con metanol-ácido acético.

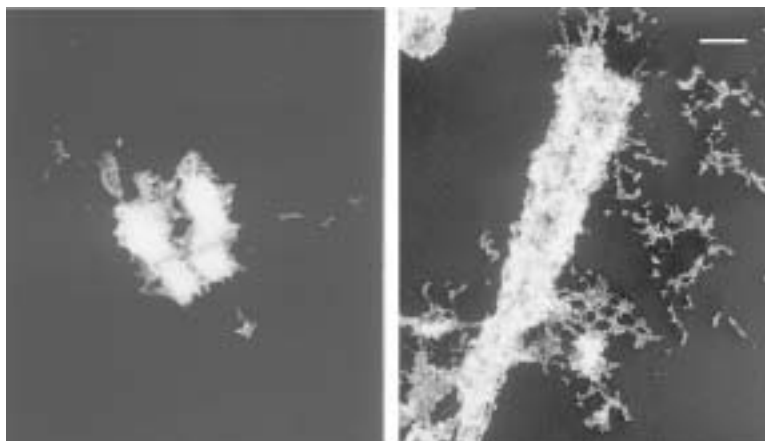
### **3.2.3 Cromosomas obtenidos en *hexylene glycol***

Diversos autores han utilizado el *hexylene glycol* para la obtención y aislamiento de los cromosomas metafásicos (Paulson, 1982; Wray *et al.*, 1972; Marsden y Laemmli, 1979). Bak *et al.* en 1977 observaron mediante microscopía óptica la formación de tubos cilíndricos de 400 nm de diámetro, a partir de cromosomas metafásicos parcialmente desintegrados obtenidos en este tipo de medios (*hexylene glycol* 1 M, CaCl<sub>2</sub> 20 mM, Pipes 0.1 mM).

Con el fin de intentar observar estas estructuras por microscopía electrónica se obtuvieron y aislaron cromosomas en un medio con *hexylene glycol* (descrito en la sección 2.2.2.1). Una vez obtenidos, los cromosomas se fijaron (sección 2.3.8.4) y finalmente se platinaron (sección 2.3.9.1).

Las muestras obtenidas en este tipo de medio, resultaron tener un rendimiento muy bajo de cromosomas. Además, los pocos cromosomas observados se encuentran muy desestructurados y resultan apenas reconocibles (figura 3.2.3). Tampoco apreciamos ningún tipo de estructura similar a las descritas por Bak *et al.* (1977).

Los cromosomas obtenidos presentan una estructura global granulada con cuerpos de 30-40 nm de diámetro. Este tipo de estructura es típica de los cromosomas en medios de baja concentración iónica (ver más adelante sección 3.3.2).



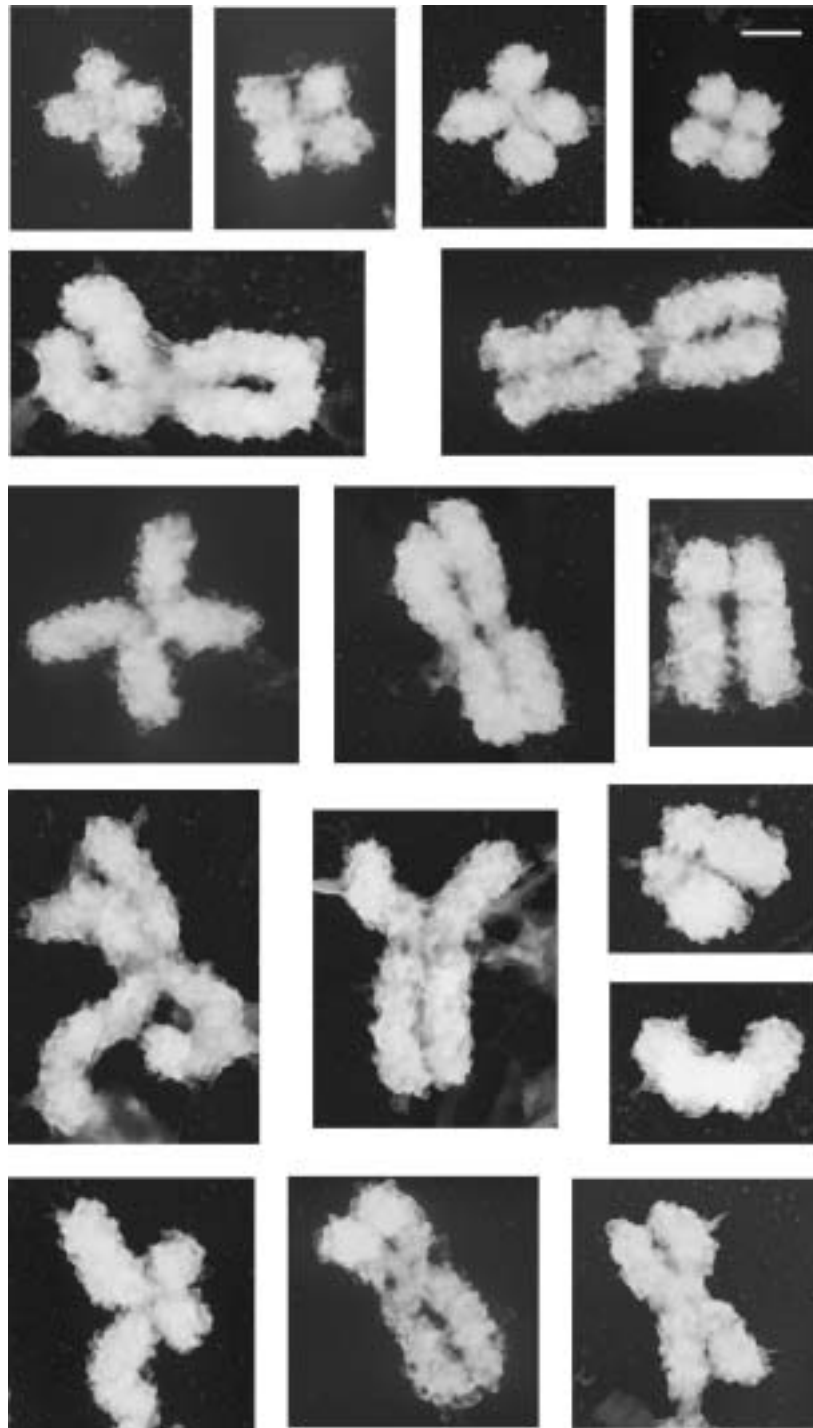
**Figura 3.2.3.** Cromosomas metafásicos obtenidos en medio de *hexylene glycol* (sección 2.2.2.1), extendidos en rejilla (sección 2.3.5.3), fijados (sección 2.3.8.4) y platinados rotacionalmente (sección 2.3.9.1). La barra representa 600 nm.

### 3.2.4 Cromosomas obtenidos en presencia de poliaminas

Uno de los mayores problemas en la purificación de cromosomas, se produce en el momento de romper la célula y liberar los cromosomas al medio exterior. Diversos autores expertos en la preparación de cromosomas para microscopía óptica y electrónica han utilizado medios para la obtención de éstos que contenían poliaminas (ver por ejemplo Adolph, 1980; Gray y Langlois, 1986; Gasser y Laemmli 1987). Las poliaminas contienen tres o cuatro grupos amino (espermidina y espermina, respectivamente) que confieren a estas moléculas cargas positivas. Gracias a estas cargas, las poliaminas estabilizan a los cromosomas cuando éstos salen al medio externo.

Como se puede ver en la figura 3.2.4, los cromosomas obtenidos mediante este medio de aislamiento presentan un estado perfectamente íntegro. Una prueba evidente de esta integridad es que se puede distinguir las cuatro cromátidas para cada cromosoma. Este hecho nos han permitido estudiar con claridad la estructura global de los cromosomas aislados mediante este procedimiento (ver próxima sección).





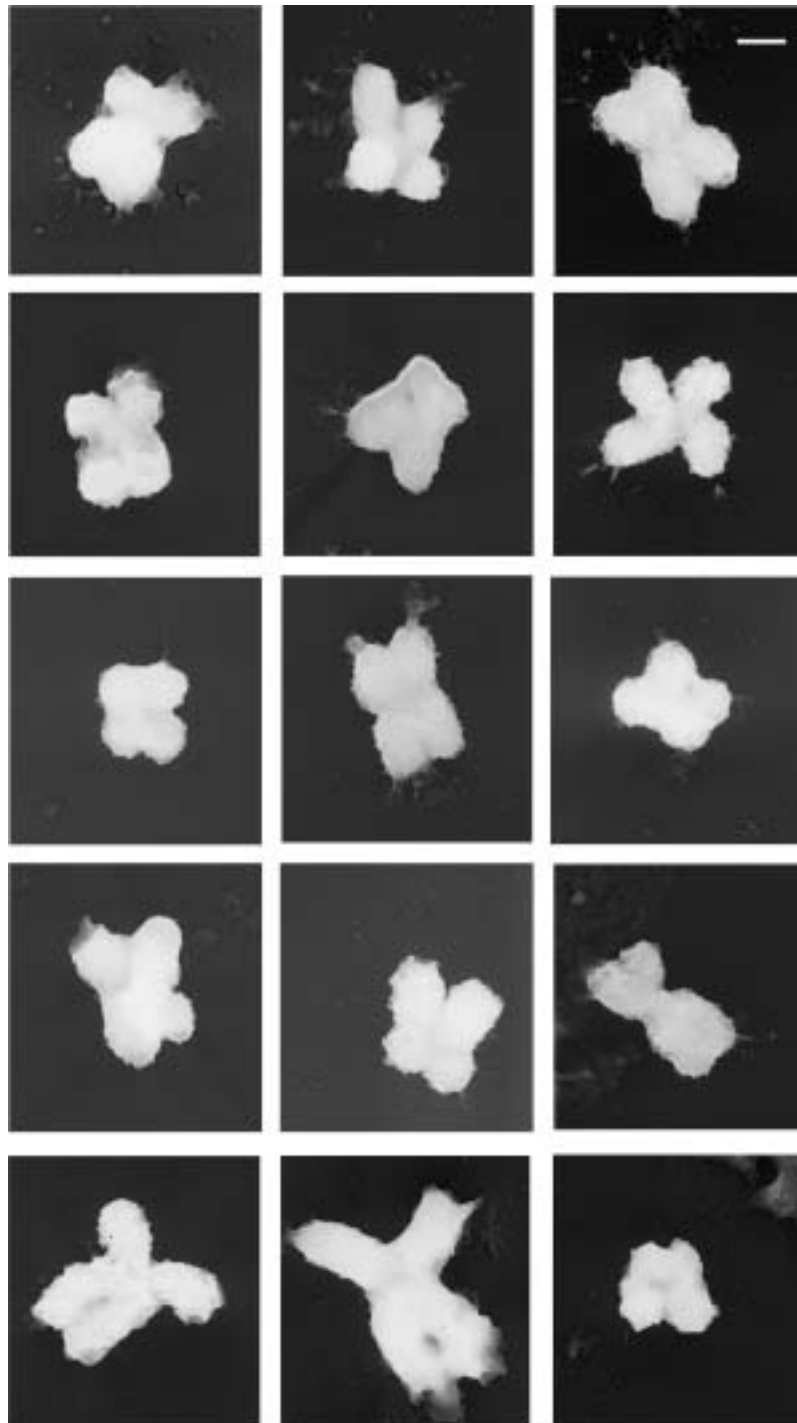
**Figura 3.2.4.** Selección de cromosomas metafásicos obtenidos en medio de poliaminas (sección 2.2.2.2). Estos cromosomas fueron extendidos sobre rejilla (2.3.5.1), fijados (sección 2.3.8.2) y finalmente platinados rotacionalmente (sección 2.3.9.1) para su posterior observación al microscopio electrónico. La barra representa 600 nm.

Otra ventaja de la utilización de estos medios, fue el número elevado de cromosomas obtenido en comparación con los anteriores procedimientos.

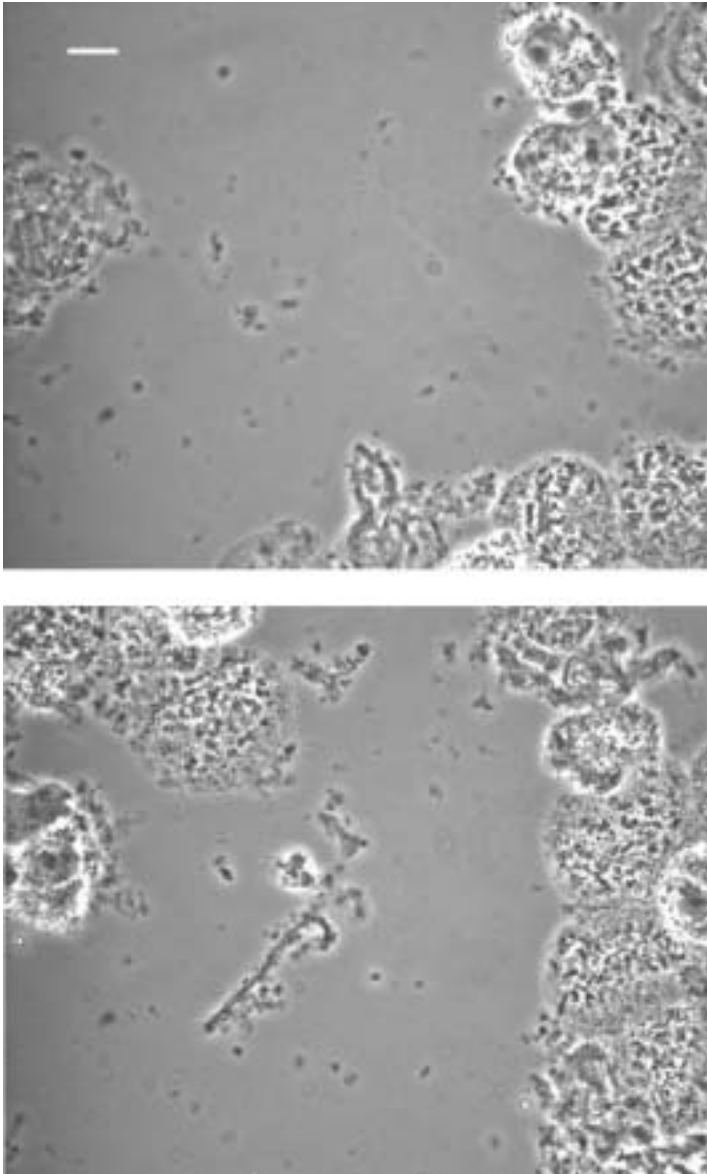
### **3.2.5 Cromosomas purificados mediante gradiente de sacarosa**

El principal inconveniente de las muestra obtenidas con poliaminas, es la elevada cantidad de material no cromosómico (restos de células y cromatina procedente de núcleos interfásicos) que se encuentra en la rejilla junto con los cromosomas. En ocasiones este material contaminante nos impedía distinguir las posibles estructuras procedentes de cromosomas.

Por tanto se decidió aplicar un paso de purificación del cromosoma. La técnica de purificación consistió en hacer pasar la mezcla de cromosomas y restos celulares a través de un gradiente escalonado de sacarosa (sección 2.2.2.5). Se utilizaron diversos medios para formar el gradiente (ver tabla 2.2.1), sin embargo, el medio más empleado fue el PME-MgCl<sub>2</sub> 5 mM. La figura 3.2.5 muestra una selección de cromosomas purificados mediante este tipo de gradiente. En ella podemos ver el estado íntegro de los cromosomas observados así como la buena calidad de las micrografías obtenidas. También se pudo observar como el material procedente de restos celulares y núcleos interfásicos disminuye considerablemente en la rejilla. Estos dos factores junto con el hecho de mantener el buen rendimiento de obtención de cromosomas que teníamos en la sección anterior, hizo que escogiéramos este método como procedimiento estándar para purificar cromosomas. Sin embargo, pese a ser suficiente la cantidad de cromosomas obtenidos para su observación por microscopía electrónica, pensamos que el rendimiento de esta técnica aún podría mejorarse más, sobretodo en el momento de la rotura de células metafásicas para liberar los cromosomas al medio de aislamiento. La figura 3.2.6 corresponde a una alícuota de cromosomas obtenida durante la realización de la lisis celular. En esta figura se puede observar, como gran parte de los cromosomas aún permanecen en el interior de las células, incluso después de que éstas hayan sido homogenizadas exhaustivamente en un Dounce en un medio que contenía el detergente digitonina. Únicamente una pequeña fracción de los cromosomas aparece libre en el medio.



**Figura 3.2.5.** Selección de cromosomas metafásicos aislados mediante un gradiente de sacarosa escalonado en PME-MgCl<sub>2</sub> 5 mM (sección 2.2.2.5). A continuación fueron extendidos en rejilla (sección 2.3.5.1), fijados (sección 2.3.8.1) y platinados rotacionalmente (sección 2.3.9.1). La barra representa 600 nm.



**Figura 3.2.6.** Rendimiento de los cromosomas después de la lisis celular mediante homogenización en Dounce en presencia de digitonina en medio de poliaminas, antes de pasar por el gradiente de sacarosa (sección 2.2.2.5). Estas imágenes fueron obtenidas mediante microscopía óptica de contraste de fases. Barra 10  $\mu\text{m}$ .

### **3.2.6 Observación de cromosomas digeridos mediante diferentes enzimas**

Los cromosomas obtenidos mediante un gradiente de sacarosa, en ocasiones fueron sometidos a digestiones con tripsina (sección 2.3.7.1), RNAsa (sección 2.3.7.2) o nucleasa micrococcal (sección 2.3.7.3). El objetivo de estos tratamientos era provocar una desestructuración parcial de los cromosomas para descubrir posibles elementos

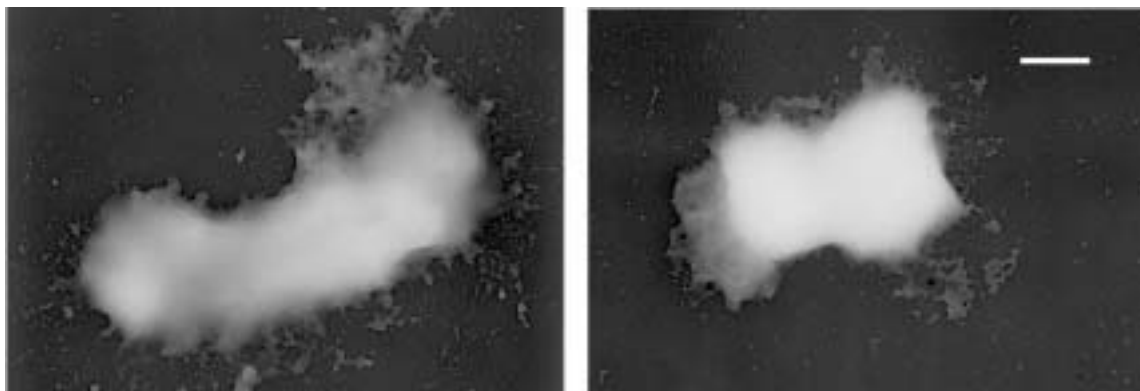
estructurales. Por ejemplo, es conocido que la clásica tripsinización de los cromosomas para la obtención de bandas Giemsa, causa una progresiva degradación de las proteínas no histona (Burkholder y Duczek, 1980), que origina una relajación en la integridad de la estructura cromosómica (Harrison *et al.*, 1982). La digestión con RNAsa tenía como objeto degradar la capa periférica de los cromosomas, la cual se cree que está formada en parte por RNA y riboproteínas (Hernandez-Verdún y Gautier, 1994).

Sin embargo, nuestros métodos indican que los cromosomas sometidos a estas digestiones, prácticamente no se desestructuran. Únicamente a elevadas concentraciones de tripsina (1 mg/ml), pudimos apreciar un cierto grado de desestructuración (datos no mostrados). Esta gran resistencia es debida a las condiciones iónicas de los medios donde se efectuaron las reacciones. Se trataba de condiciones lo suficientemente estructurantes como para mantener la integridad de los cromosomas.

### **3.2.7 Resolución y contraste de cromosomas sin platinar**

La excelente resolución y contraste de los cromosomas mostrados en este trabajo es debida principalmente a la aplicación de la técnica de tinción por platinado rotacional o unidireccional (sección 2.3.9). La importancia de la platinación para la correcta observación de los cromosomas y sus detalles estructurales, puede constatarse cuando se comparan muestras platinadas con otras muestras sin efectuar el paso final de platinado.

Las muestras no platinadas observadas en el microscopio electrónico pierden mucho contraste y resolución (ver figura 3.2.7).



**Figura 3.2.7.** Cromosomas aislados y purificados mediante un gradiente de sacarosa escalonado en PME-MgCl<sub>2</sub> 5 mM (sección 2.2.2.5). A continuación fueron depositados por centrifugación en rejillas (sección 2.3.5.1), sometidos a un cambio de medio en Pipes 0.1 mM pH 7.2 (punto 12.1 de la tabla 2.3.6) y finalmente fijados (sección 2.3.8.1). En este caso los cromosomas no fueron platinados. La barra representa 600 nm.

### 3.2.8 Características estructurales de los cromosomas obtenidos

#### 3.2.8.1 Diámetro de las cromátida

Una de las características estructurales de los cromosomas que nos permiten apreciar su integridad estructural, es el diámetro de sus cromátidas. Por este motivo intentamos medir todos los diámetros de todas las cromátidas posibles para cada uno de los experimentos efectuados en presencia de poliaminas y PME-MgCl<sub>2</sub> 5 mM. En la tabla 3.2.1, se muestran como ejemplo los datos obtenidos para un experimento concreto de poliaminas. En esta tabla se detallan los diámetros obtenidos para las cromátidas q<sub>1</sub>, q<sub>2</sub> (cromátidas largas) y p<sub>1</sub>, p<sub>2</sub> (cromátidas cortas) de cada cromosoma. Después de medir 226 cromátidas de un total de 61 cromosomas, se obtuvo un promedio final de  $0.51 \pm 0.04 \mu\text{m}$ .

La tabla 3.2.2 muestra como ejemplo los datos hallados para un experimento en PME-MgCl<sub>2</sub> 5 mM. En este caso, después de medir 98 cromátidas en 25 cromosomas, el diámetro promedio final para este experimento fue de  $0.53 \pm 0.06 \mu\text{m}$ .

Finalmente, la tabla 3.2.3 engloba todos los promedios finales de diámetro obtenidos para cada uno de los experimentos efectuados en poliaminas y PME-MgCl<sub>2</sub> 5 mM. El

promedio final para cada condición fue de  $0.50 \pm 0.05 \mu\text{m}$  en poliaminas, y de  $0.53 \pm 0.06 \mu\text{m}$  en PME-MgCl<sub>2</sub> 5 mM.

Estos valores, si bien concuerdan con los conseguidos por otros laboratorios (Pienta y Coffey, 1984; Strukov et al, 2003; Maeshima y Laemmler, 2003), denotan una cierta compactación de las cromátidas (ver más adelante en discusión general).

**Tabla 3.2.1**

### **Cromosomas en presencia de poliaminas <sup>a</sup>**

**Medidas en  $\mu\text{m}$  y desviación estándar del diámetro de las cromátidas en el experimento 2 (tabla 3.2.3 de la sección 3.2.8.1)**

<b>Micrografía</b>	<b>q<sub>1</sub></b>	<b>q<sub>2</sub></b>	<b>p<sub>1</sub></b>	<b>p<sub>2</sub></b>	<b>Promedio</b>
5249a	0.40	0.42	0.42	0.50	0.44
5249b	n.d	n.d	0.50	0.48	0.50
5249c	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55
5256	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
5259	0.50	0.50	0.47	0.45	0.48
5260	0.50	0.50	0.63	0.60	0.56
5261	0.43	0.45	0.45	0.45	0.45
5262a	0.55	0.54	0.5	0.48	0.52
5262b	0.47	0.50	0.55	0.50	0.51
5266	0.47	0.45	0.45	0.48	0.46
5270	n.d	n.d	0.55	0.51	0.53
5273	0.53	0.45	0.51	0.50	0.50
5360	0.50	0.45	0.50	0.55	0.50
5370	0.45	0.43	0.50	0.50	0.47
5373	0.55	0.55	0.51	0.55	0.54
5374	0.50	0.50	n.d	n.d	0.50
5379	0.43	0.41	0.40	0.40	0.41
5382	0.55	0.60	0.56	0.66	0.60
5385	0.51	0.55	0.53	0.52	0.53
5386	0.47	0.50	0.49	n.d	0.49
5393	n.d	n.d	0.51	0.56	0.54
5398	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
5411a	0.45	0.51	0.52	0.53	0.50
5411b	0.52	0.54	0.55	0.52	0.53
5415	0.45	0.45	0.42	0.45	0.44
5416	0.65	0.60	0.58	0.60	0.61

5418	0.46	0.46	0.45	0.46	0.46
5424	0.48	0.47	0.54	0.54	0.51
5426	0.55	0.55	0.55	n.d	0.55
5427	0.43	0.42	0.47	0.50	0.46
5428	0.47	0.48	0.51	0.50	0.49
5430	0.51	0.54	0.56	0.55	0.54
5433	0.50	0.50	0.48	0.50	0.50
5435	0.51	0.51	0.55	0.50	0.52
5436	n.d	0.53	0.49	0.51	0.51
5437	0.50	0.51	0.55	0.55	0.53
5438	0.49	0.50	0.57	0.50	0.52
5448	n.d	n.d	0.49	0.51	0.50
5449	0.52	0.49	0.56	0.54	0.53
5451	0.50	0.53	0.55	0.47	0.51
5455	0.54	0.55	0.57	0.55	0.55
5456	0.47	0.49	0.48	0.48	0.48
5461	0.49	0.47	0.56	0.56	0.52
5485	0.50	0.55	0.55	0.55	0.54
5486	0.51	0.46	n.d	n.d	0.49
5488	0.53	0.50	0.55	0.55	0.53
5491	0.55	nd	0.48	0.45	0.49
5494	0.75	0.60	0.50	0.60	0.61
5499	n.d	n.d	0.53	0.55	0.54
5500	n.d	n.d	0.53	0.55	0.54
5501	0.46	0.50	0.50	0.46	0.48
5502	0.50	0.50	0.47	0.46	0.48
5505	0.54	n.d	0.57	0.55	0.55
5506	0.57	0.57	n.d	n.d	0.57
5510	0.50	0.50	0.55	0.55	0.53
5511	0.52	0.51	0.60	0.65	0.57
5514	0.65	nd	0.54	0.56	0.58
5516	0.46	0.47	n.d	n.d	0.47
5518	0.46	0.47	n.d	n.d	0.47
5677	0.60	0.57	0.53	0.51	0.55
5678	0.47	0.45	0.55	0.52	0.50

**Promedio final y desviación estándar: 0.51 ± 0.04**

---

<sup>a</sup> Cromosomas obtenidos en poliaminas (sección 2.2.2.2), depositados sobre rejilla (sección 2.3.5.1), fijados (sección 2.3.8.2) y finalmente platinados rotacionalmente (sección 2.3.9.1).

**n.d.** No determinado.

**q<sub>1</sub> y q<sub>2</sub>.** Cromátidas largas del cromosoma.

**p<sub>1</sub> y p<sub>2</sub>.** Cromátidas cortas del cromosoma.



Tabla 3.2.2

**Cromosomas control en presencia de  
MgCl<sub>2</sub> 5 mM<sup>a</sup>**

**Medidas en  $\mu\text{m}$  y desviación estándar del diámetro  
de las cromátidas cromosómicas en el experimento 1  
(tabla 3.2.3 de la sección 3.2.8.1)**

Micrografía	q <sub>1</sub>	q <sub>2</sub>	p <sub>1</sub>	p <sub>2</sub>	Promedio
6366	0.56	0.53	0.52	0.52	0.53
6373	0.40	0.40	0.45	0.45	0.43
6374	0.49	0.47	0.45	0.46	0.47
6378	0.53	0.55	0.56	0.60	0.57
6380	0.55	0.57	0.55	0.52	0.55
6382	0.62	0.60	0.58	0.60	0.60
6389	0.55	0.53	0.53	0.50	0.53
6391	0.56	0.51	0.59	0.58	0.56
6395	0.58	0.61	0.60	0.61	0.60
6397	0.45	0.40	0.46	0.43	0.44
6404	0.50	0.50	0.65	0.61	0.57
6406a	0.60	0.60	0.57	0.60	0.59
6406b	0.59	0.58	0.66	0.64	0.62
6407	0.50	0.40	0.45	0.49	0.46
6453	0.47	0.45	0.47	0.50	0.47
6456	0.50	0.50	n.d	n.d	0.50
6459	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45
6461	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60
6462	0.57	0.55	0.57	0.55	0.56
6465	0.53	0.55	0.46	0.50	0.51
6466	0.48	0.48	0.50	0.50	0.49
6468	0.60	0.60	0.53	0.57	0.58
6471	0.43	0.43	0.51	0.50	0.47
6472	0.45	0.43	0.45	0.45	0.45
6473	0.60	0.58	0.58	0.58	0.59

**Promedio final y desviación estándar: 0.53 ± 0.06**

<sup>a</sup> Cromosomas purificados mediante un gradiente de sacarosa en PME-MgCl<sub>2</sub> 5 mM (sección 2.2.2.5). A continuación la muestra fue depositada sobre rejilla, fijada y platinada según el procedimiento habitual (secciones 2.3.5.1, 2.3.8.1 y 2.3.9.1, respectivamente).

**n.d.** No determinado.

**q<sub>1</sub>** y **q<sub>2</sub>**. Cromátidas largas del cromosoma.

**p<sub>1</sub>** y **p<sub>2</sub>**. Cromátidas cortas del cromosoma.

Tabla 3.2.3

### Diámetro promedio y desviación estándar de las cromátidas cromosómicas en presencia de diferentes medios

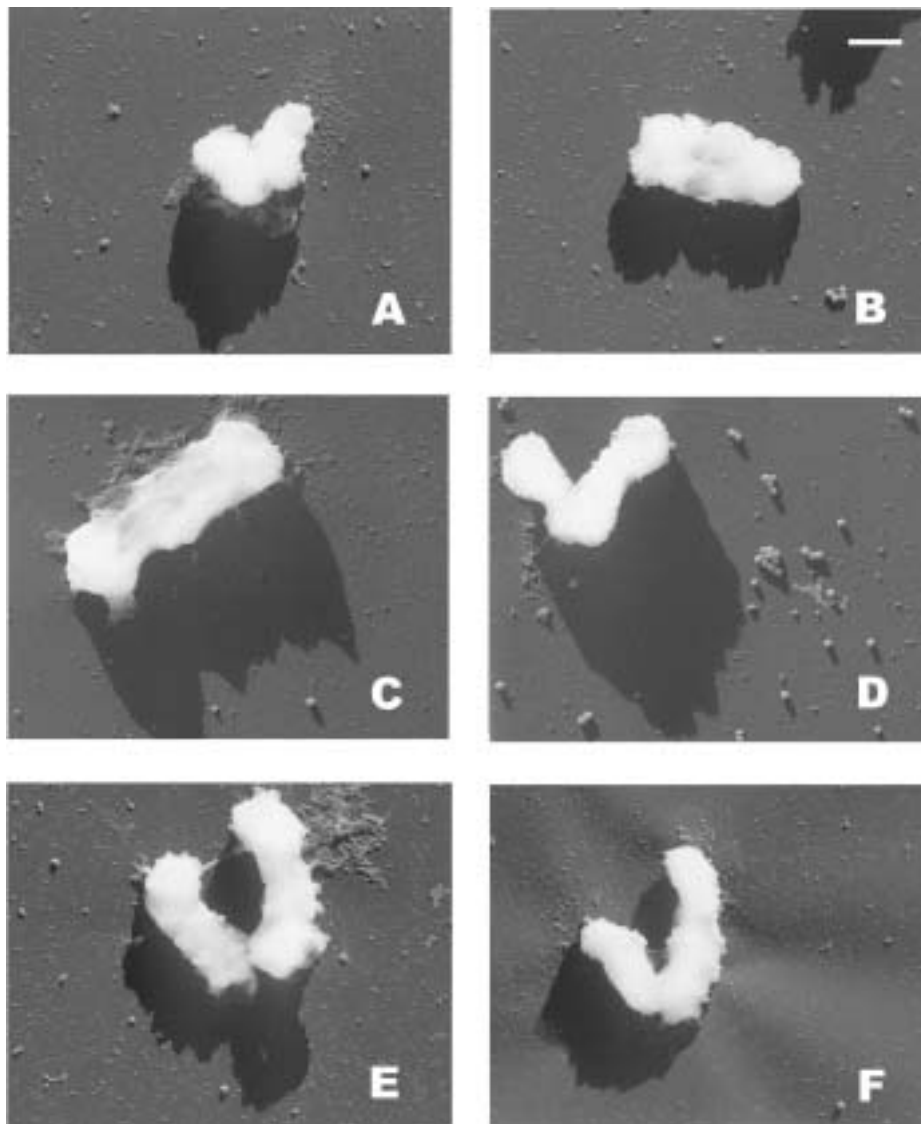
Condición	Experimento	Número de cromátidas medidas	Promedio final del diámetro de las cromátidas y desviación estándar para cada experimento ( $\mu\text{m}$ )
Poliaminas	1	58	$0.49 \pm 0.04$
	2	226	$0.51 \pm 0.04$
$\text{MgCl}_2$ 5 mM	1	98	$0.53 \pm 0.06$
	2	81	$0.53 \pm 0.04$
	3	16	$0.53 \pm 0.03$
	4	20	$0.54 \pm 0.04$
	5	58	$0.54 \pm 0.05$
	6	13	$0.61 \pm 0.05$
	7	23	$0.52 \pm 0.03$
	8	91	$0.53 \pm 0.04$
	9	23	$0.55 \pm 0.04$
	10	31	$0.54 \pm 0.04$

#### Promedio final del diámetro de las cromátidas y desviación estándar para cada condición

**Poliaminas:  $0.50 \pm 0.05$**   
 **$\text{MgCl}_2$  5 mM:  $0.53 \pm 0.06$**

#### 3.2.8.2 *Altura de las cromátidas*

Al aplicar técnicas de centrifugación para la extensión de las muestras sobre las rejillas de microscopía, teníamos la preocupación de que los cromosomas al depositarse quedarán con las cromátidas aplastadas. Para investigar esta posibilidad, se procedió a determinar la altura de las cromátidas mediante la técnica de la platinación unidireccional (sección 2.3.9.2). Las cromátidas escogidas pertenecían a cromosomas aislados y purificados mediante un gradiente de sacarosa en PME- $\text{MgCl}_2$  5 mM y a continuación sometidos a los cambios de medio indicados en la figura 3.2.8.



**Figura 3.2.8.** Cromosomas aislados a partir de un gradiente de sacarosa en PME-MgCl<sub>2</sub> 5 mM (sección 2.2.2.5) y depositados en rejilla por centrifugación (sección 2.3.5.1). A continuación, los cromosomas fueron sometidos a los siguientes cambios de medio (sección 2.3.6):

- Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM (punto 12.6 de la tabla 2.3.3)(**A**) y (**B**).
- Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM (punto 12.5 de la tabla 2.3.3) (**C**), (**D**) y (**E**).
- Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.7 mM (punto 12.4 de la tabla 2.3.3) (**F**).

Finalmente los cromosomas fueron fijados (sección 2.3.8.1) y platinados unidireccionalmente con un ángulo de inclinación de 20° (**A**), (**B**), (**E**) y (**F**) o 10° (**C**) y (**D**) (sección 2.3.9.2). La barra representa 600 nm.

La figura 3.2.8 muestra una selección de estos cromosomas platinados unidireccionalmente en las tres condiciones especificadas. Podemos ver que los cromosomas en presencia de 1.7, 5 y 10 mM de  $MgCl_2$  presentan sus cromátidas en un estado compacto muy similar. Aunque el ángulo de platinación es diferente para cada cromosoma, las sombras proyectadas de sus cuerpos nos dan una idea aproximada del buen estado de sus cromátidas, que aparentemente no presentan un aplastamiento significativo.

En la selección de imágenes mostrada, también podemos distinguir las bolas de látex de 90 nm de diámetro, que nos permitieron calcular el ángulo aparente de platinación para cada muestra (ver sección 2.4.2.1).

La tabla 3.2.4 nos indica la altura aparente calculada de forma individual para cada cromosoma. Este valor se determinó a través de la expresión (7) descrita en la sección 2.4.2.3.1. El valor promedio de todas las alturas aparentes calculadas fue de  $0.59 \pm 0.13 \mu m$ .

Si imaginamos la sección de la cromátida como una sección circular, también deberíamos tener en cuenta en el cálculo de la altura el radio de la cromátida, ya que las longitudes de las sombras proyectadas se midieron a partir de la base de la cromátida y no desde el centro (recordar sección 2.4.2.3.1). Si consideramos el radio de una cromátida en presencia de  $Mg^{2+}$  como  $0.265 \mu m$  (ver sección anterior) y aplicamos la fórmula descrita en (6) (sección 2.4.2.3.1), entonces el valor promedio de la altura de las cromátidas es de  $0.72 \pm 12 \mu m$ .

Sin embargo, lo más probable es que durante el proceso de extensión sobre las rejillas, los cromosomas se vieran un tanto aplanados y que por tanto la sección de las cromátidas tenga forma de óvalo. Entonces, aplicando la fórmula detallada en (9) de la sección 2.4.2.3.2, el nuevo valor promedio sería de  $0.62 \pm 0.11 \mu m$ .

Los valores promedio presentados hasta ahora se calcularon teniendo en cuenta el diámetro de las bolas platinadas. Aplicando los factores de corrección detallados en (12) y (13) (sección 2.4.2.3.3) los cuales tienen en cuenta el diámetro de las bolas sin platinar, los valores corregidos de la altura de las cromátidas según su sección sea circular o en forma de óvalo serían de  $0.66$  y  $0.56 \mu m$  respectivamente.

Tabla 3.2.4

<b>Determinación de la altura aparente de las cromátidas a partir de cromosomas platinados unidireccionalmente (<math>\mu\text{m}</math>)</b>							
Condición <sup>a</sup>	Micrografía	n <sup>b</sup>	Bolas de látex			Cromátidas	
			$\phi_{\text{ex}}$ <sup>c</sup>	$L_{\text{ex}}$ <sup>d</sup>	$\text{tg}\alpha_{\text{ap}}$ <sup>e</sup>	$L_{\text{ex}}$ <sup>f</sup>	$h_{\text{ap}}$ <sup>g</sup>
MgCl <sub>2</sub> 1.7 mM	3549	2	0.10	0.215	0.47	1.03 ± 0.10	0.48
MgCl <sub>2</sub> 5 mM	3558	2	0.10	0.142	0.70	0.73 ± 0.17	0.51
	3559	3	0.093 ± 0.011	0.148 ± 0.010	0.63 ± 0.08	0.85 ± 0.04	0.54
	3561	2	0.098	0.17	0.57	0.93 ± 0.08	0.54
	3562	4	0.096 ± 0.005	0.155 ± 0.010	0.62 ± 0.02	0.84 ± 0.12	0.55
	3572	7	0.098 ± 0.004	0.285 ± 0.021	0.34 ± 0.02	2.30 ± 0.19	0.79
	3573	4	0.098 ± 0.005	0.315 ± 0.035	0.31 ± 0.02	2.15 ± 0.15	0.67
	3576	4	0.099 ± 0.003	0.335 ± 0.017	0.29 ± 0.02	1.81 ± 0.11	0.53
MgCl <sub>2</sub> 10 mM	3579	4	0.099 ± 0.002	0.186 ± 0.002	0.54 ± 0.00	0.91 ± 0.12	0.49
	3582	6	0.097 ± 0.005	0.147 ± 0.023	0.67 ± 0.13	1.23 ± 0.22	0.83
<b>Promedio de la altura aparente: 0.59 ± 0.13</b>							

<sup>a</sup> Los cromosomas fueron obtenidos y tratados según el procedimiento descrito en la figura anterior. La platinación se efectuó de manera unidireccional con diferentes ángulos de inclinación.

<sup>b</sup> Número de bolas de látex examinadas.

<sup>c</sup> Promedio de los diámetros experimentales de las bolas de látex platinadas.

<sup>d</sup> Promedio de las longitudes experimentales de las sombras provocadas por la deposición unidireccional del platino sobre las diversas bolas de látex. La medida se obtuvo desde la mitad de la bola hasta el final de la sombra.

<sup>e</sup> Tangente del ángulo aparente. Cálculo realizado mediante la expresión matemática  $\text{tg}\alpha_{\text{ap}} = \phi_{\text{ex}} / L_{\text{ex}}$  (sección 2.4.2.1).

<sup>f</sup> Promedio de las longitudes experimentales de las sombras de la cromátida. En este caso, la medida se realizó desde la base de la cromátida hasta el final de la sombra, teniendo en cuenta la dirección del haz de platino.

<sup>g</sup> Altura aparente de la cromátida. El cálculo se obtuvo aplicando la expresión matemática  $h_{\text{ap}} = \text{tg}\alpha_{\text{ap}} \times L_{\text{ex, Cromátida}}$  (sección 2.4.2.3.1).

**Tabla 3.2.5**

<b>Estimación de la altura de las cromátidas a partir de los datos de la tabla anterior (<math>\mu\text{m}</math>)</b>				
	$\phi$ bolas de látex 0.1 $\mu\text{m}$		$\phi$ bolas de látex 0.09 $\mu\text{m}$	
$h_{ap}$ <sup>a</sup>	$h_c$ <sup>b</sup>	$h_o$ <sup>c</sup>	$h_c$ <sup>d</sup>	$h_o$ <sup>e</sup>
$0.59 \pm 0.13$	$0.72 \pm 0.12$	$0.62 \pm 0.11$	0.66	0.56

<sup>a</sup> Promedio de la altura aparente.

<sup>b</sup> y <sup>c</sup> Promedio de la altura de la cromátida suponiendo una sección circular (**b**) o una sección en forma de óvalo (**c**). En caso de **b** el cálculo se obtuvo aplicando la expresión matemática  $h_c = (L_{ex.Cromátida} + r) \times tg\alpha_{ap}$ , siendo  $r$  el radio de la cromátida en presencia de  $Mg^{2+}$  ( $0.265 \mu\text{m}$ ). Por lo que se refiere a **c**, se utilizó la expresión  $h_o = L_{ex.Cromátida} \times tg\alpha_{real}$ , en la cual  $tg\alpha_{real}$  fue calculada mediante un método gráfico. Tanto en **b** como en **c**, la  $tg\alpha_{ap}$  y la  $tg\alpha_{real}$  se calcularon a partir del diámetro experimental de las bolas de látex platinadas ( $\cong 0.1 \mu\text{m}$ , tabla 3.2.4). Para ver más detalles ver la sección 2.4.2.3.

<sup>d</sup> y <sup>e</sup> Altura corregida suponiendo una sección circular (**d**) o una sección en forma de óvalo (**e**), pero en este caso utilizando como diámetro, el calculado a partir de bolas sin platinar ( $\cong 0.09 \mu\text{m}$ ). En **c** y **d** se aplicaron los factores de corrección  $h_c = 0.92 h_c$  y  $h_o = 0.91 h_o$ , respectivamente. El cálculo detallado de estos factores de corrección, se indica en la sección 2.4.2.3

Las diversas estimaciones efectuadas de la altura de las cromátidas se muestran en la tabla 3.2.5. Todos estos valores, comparados con el valor promedio del diámetro de las cromátidas en presencia de  $Mg^{2+}$  ( $0.53 \pm 0.06 \mu\text{m}$ , tabla 3.2.3) nos indican que las cromátidas no se encuentran en absoluto aplastadas en nuestras preparaciones microscópicas.

### 3.2.8.3 *Concentración local de DNA*

La concentración local de DNA se define como la masa de DNA por unidad de volumen de la estructura biológica que contiene dicho DNA. En nuestro caso, la estructura biológica es el cromosoma, y para calcular su volumen se utilizó los diámetros de las cromátidas en presencia de poliaminas y de  $Mg^{2+}$  determinados en la sección 3.2.8.1 y las longitudes de las cromátidas dadas por diversos autores (ver tabla 3.2.6). En estos cálculos

se aplicó la fórmula  $V = \pi r^2 L$ , ya que las cromátidas se consideraron como cilindros regulares. En cuanto a la masa para cada cromosoma los valores se obtuvieron de Internacional Human Genome Sequencing Consortium (2001).

El promedio de la concentración local de DNA en los cromosomas humanos en presencia de poliaminas o  $Mg^{2+}$  fue de 0.21 y 0.18 g/ml respectivamente. Estos valores son un poco superiores al promedio hallado de forma experimental por diversos laboratorios (0.17 g/ml) (Daban 2000; ver sección 1.3.3).

**Tabla 3.2.6**

### Estimación de la concentración local de DNA en los cromosomas humanos

Referencia	Cromosomas	Longitud ( $\mu\text{m}$ )	Volumen ( $\mu\text{m}^3$ ) <sup>a</sup>	DNA (pg) <sup>b</sup>	Concentración de DNA (g/ml)
Lewin (2000)	n° 22	2.0	0.39-0.44	0.052	0.13-0.12
Manuelidis y Chen (1990)	n°1	7.2	1.41-1.59	0.30	0.21-0.19
Pienta y Coffey (1984)	n°4	3.15	0.62-0.70	0.21	0.34-0.30
Stryer (1995)	46 (células diploides)	200	39.3-44.1	7.08	0.18-0.16
Sumner (2003)	46 (células diploides)	200	39.3-44.1	7.08	0.18-0.16
Wagner <i>et al.</i> (1993)	n°16	3.0	0.59-0.66	0.11	0.19-0.17

**Promedio de la concentración del DNA (g/ml) : 0.21-0.18**

<sup>a</sup> Cálculos efectuados teniendo en cuenta los diámetros de las cromátidas en presencia de poliaminas (0.50  $\mu\text{m}$ ) y de  $Mg^{2+}$  (0.53  $\mu\text{m}$ ) determinados en este trabajo (ver tabla 3.2.3) y las longitudes de las cromátidas dadas por diversos autores. En estos cálculos las cromátidas se consideran cilindros regulares sin tener en cuenta los estrechamientos del centrómero ni las formas redondeadas de los extremos.

<sup>b</sup> Valores obtenidos de Internacional Human Genome Sequencing Consortium (2001).

### 3.3 Estructura global de los cromosomas en diferentes medios

Después de la observación por microscopía electrónica de los cromosomas obtenidos en diferentes medios y condiciones, nuestros resultados indican que es posible agrupar la estructura global de éstos en tres grandes categorías: compactos, granulados y fibrosos.

En muchas de las muestras observadas, los cromosomas no presentaban un solo tipo de morfología, sino que había una mezcla de estructuras globales con una cierta dominancia de alguna de las tres formas. No obstante, la dominancia de una de estas morfologías sobre las otras dos dependía del tipo de medio en el cual se hallaban.

**Tabla 3.3.1**

#### Estructura de los cromosomas en diversos medios

Estado del cromosoma	Condiciones finales típicas que producen estas estructuras
Compacto	Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl <sub>2</sub> 1.7-40 mM <sup>a</sup>
Extendido granular	Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl <sub>2</sub> 0-1.25 mM <sup>b</sup>
Muy extendido fibroso	Pipes 0.1 mM pH 7.2, MgCl <sub>2</sub> 0-0.1 mM <sup>c</sup>

<sup>a</sup> En todos los experimentos este tampón contenía además sacarosa 50 % y EGTA 1 mM. También se observan cromosomas compactos en: (1) Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.7-20 mM (o CaCl<sub>2</sub> 20 mM); (2) TEA 50 mM pH 7.5, KCl 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM; (3) TEAB 90 mM pH 8.6, NaCl 80 mM, sacarosa 50 %; (4) TEA-HCl 15 mM pH 7.5, NaCl 20 mM KCl 80 mM, espermina 0.2 mM, espermidina 0.5, EDTA-KOH 2 mM, EGTA 0.5 mM, sacarosa 50%. (5) Fosfato 5-10 mM pH 7.5, ATP 5-10 mM, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl<sub>2</sub> 3-10 mM.

<sup>b</sup> También se forman cromosomas granulados en presencia de: (1) Pipes 5 mM, NaCl 5 mM, EDTA 10 mM, 50% sacarosa; (2) Pipes 5 mM, NaCl 20 mM, KCl 120 mM; (3) TEAB 90 mM pH 8.6, MgCl<sub>2</sub> 1.7 mM; (4) TEA 7.5 mM pH 7.5, KCl 40 mM, espermina 0.1 mM, espermidina 0.25 mM; (5) Citrato sódico 26 mM pH 7.8.

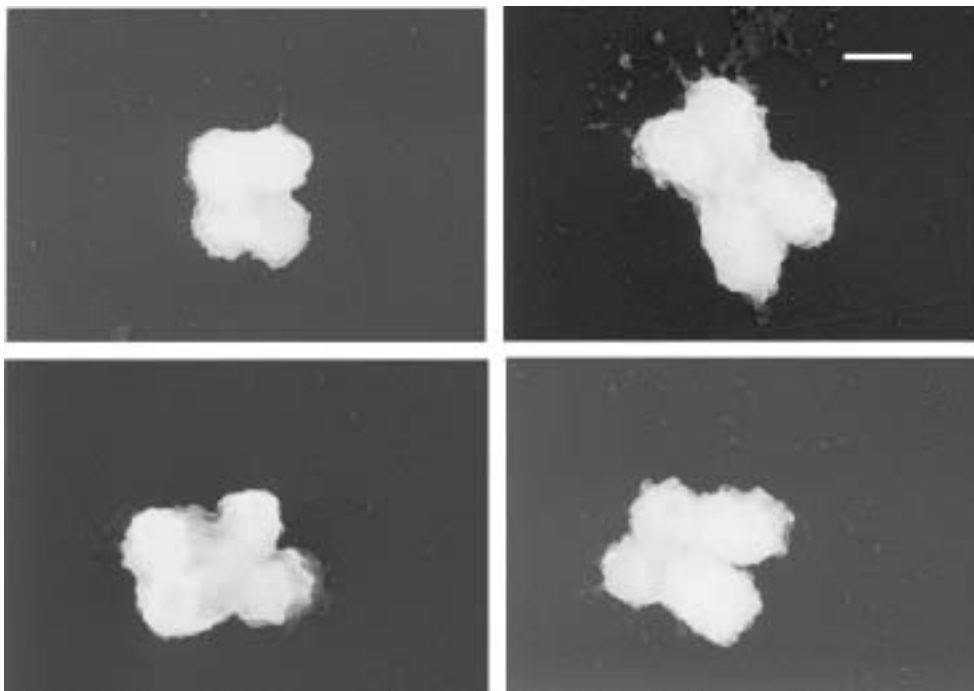
<sup>c</sup> Los cromosomas tratados con (1) H<sub>2</sub>O sin tampones, y (2) TEA 0.15 mM pH 7.5, NaCl 0.2 mM KCl 0.8 mM, espermina 0.002 mM, espermidina 0.005 mM, también producen estructuras fibrosas.



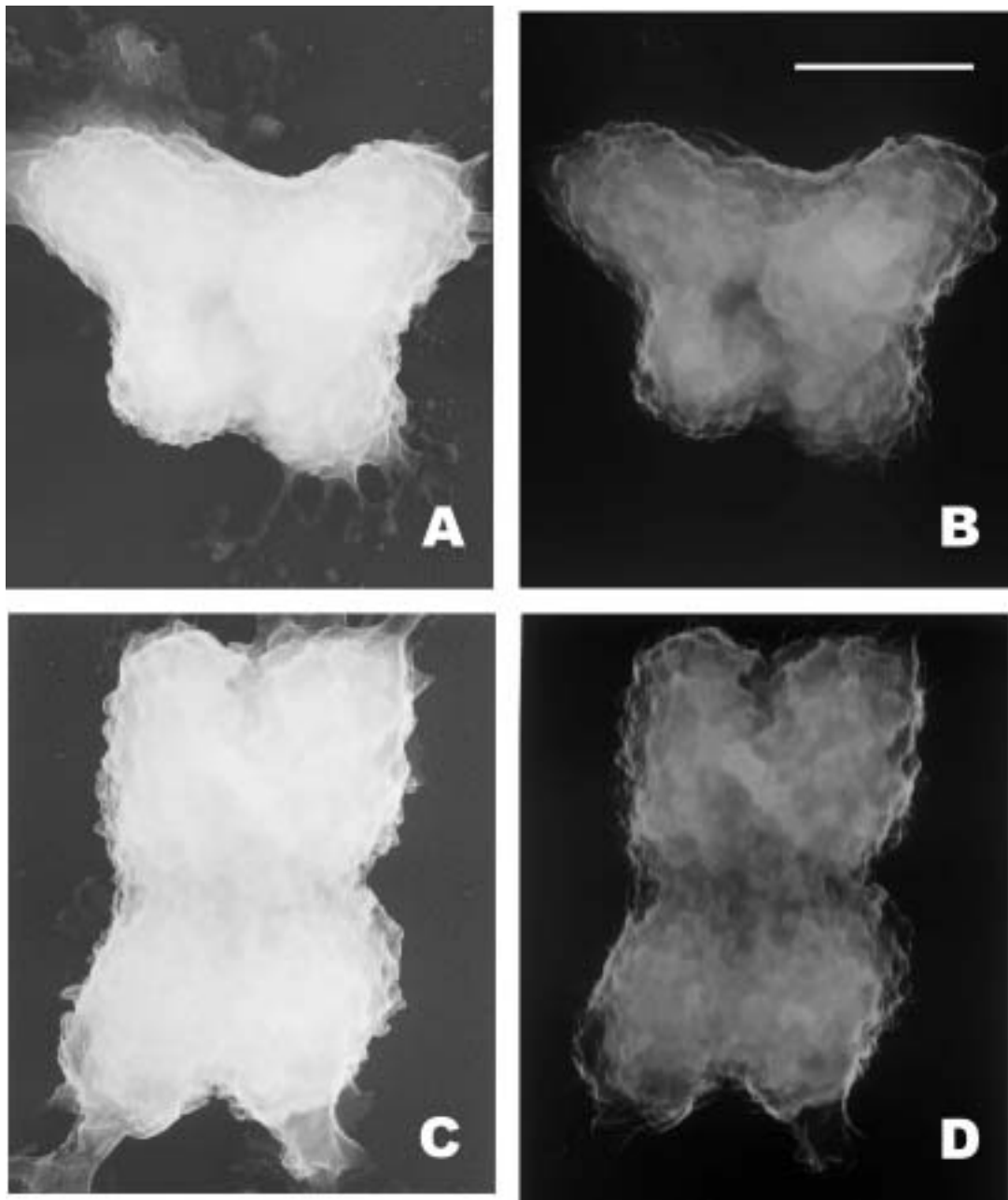
### 3.3.1 Cromosomas compactos

La morfología compacta es el tipo de estructura más abundante cuando observamos los cromosomas en condiciones iónicas similares a las fisiológicas. En estos medios estructurantes de fuerza iónica alta, con elevadas concentraciones de iones monovalentes, divalentes y/o poliaminas (ver tabla resumen 3.3.1), los cromosomas se caracterizan por tener unas cromátidas muy densas y compactas, sobretodo en la parte central (ver figuras 3.3.1, 3.3.2, 3.3.3 y 3.3.4). Debido a esta compactación el surco central entre cromátidas apenas es perceptible. El borde de los cromosomas está formado por una serie de replanos imbricados (ver figuras 3.3.2 y 3.3.3) sugiriendo que la estructura global del cromosoma está formada por agrupaciones de planos cromatínicos superpuestos los unos con los otros.

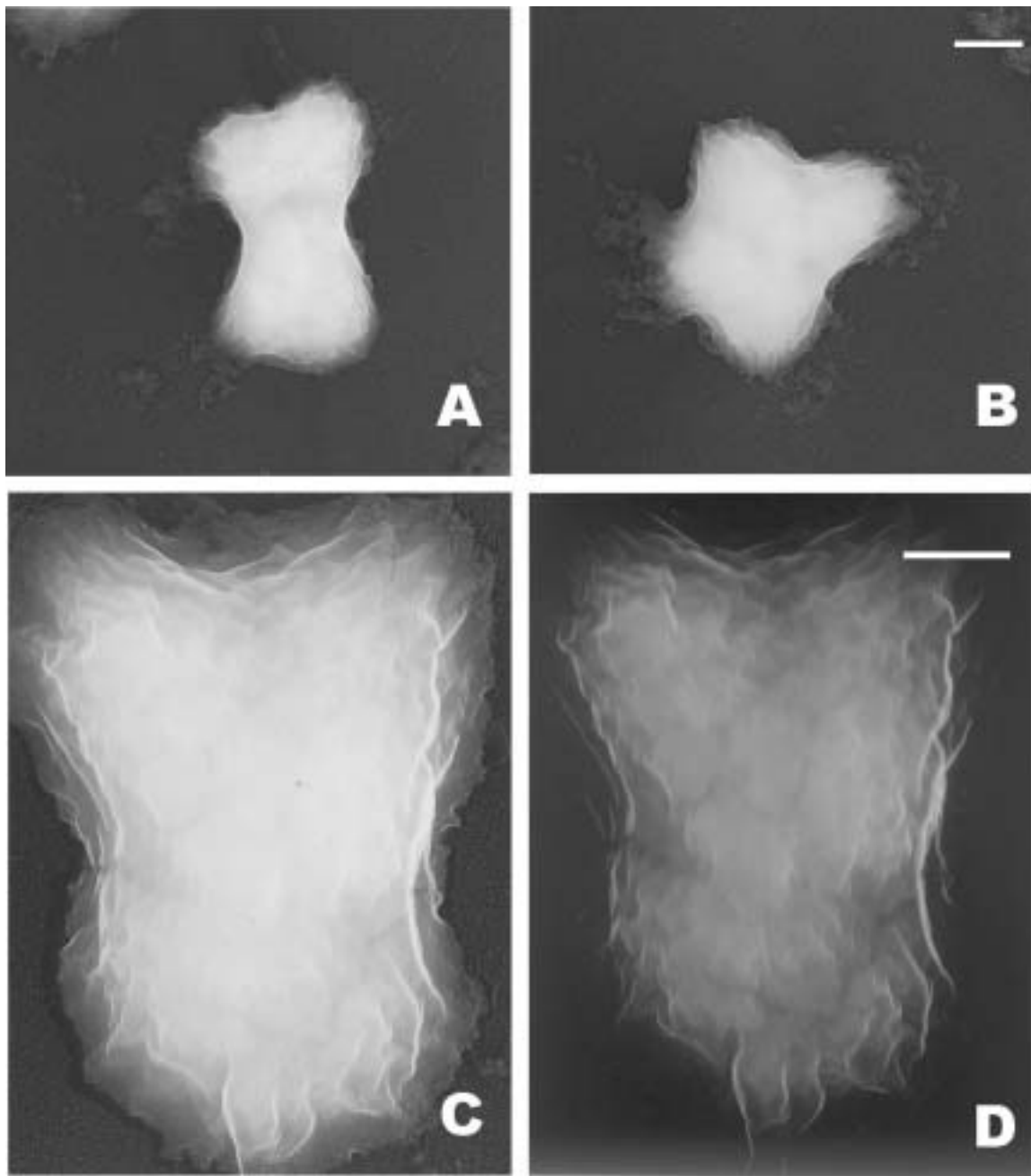
En estos cromosomas, también podemos ver la existencia de otras morfologías. Así por ejemplo, en el interior de los cromosomas de la figura 3.3.2B y D y en la periferia de los cromosomas de la figura 3.3.4 podemos apreciar la existencia de pequeños cuerpos en forma de gránulos.



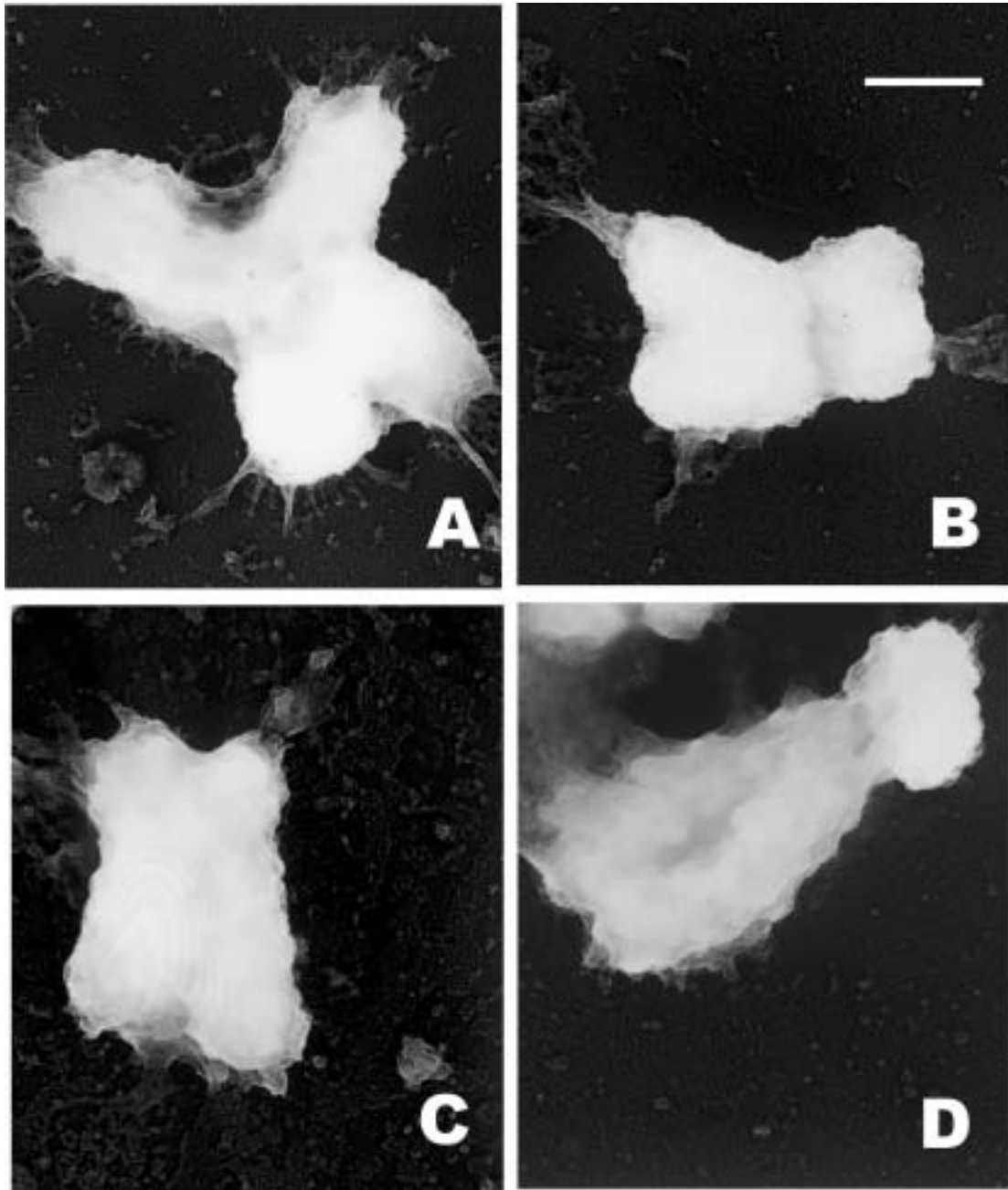
**Figura 3.3.1.** Cromosomas metafásicos aislados mediante un gradiente de sacarosa escalonado en PME-MgCl<sub>2</sub> 5 mM (sección 2.2.2.5). A continuación, la muestra fue extendida, fijada y platinada según el procedimiento habitual (secciones 2.3.5.1, 2.3.8.1 y 2.3.9.1, respectivamente). La barra representa 600 nm.



**Figura 3.3.2.** Ampliación de cromosomas obtenidos según el mismo procedimiento que el indicado en la figura anterior. El tiempo de exposición de las micrografías **B** y **D** fue superior respecto al de **A** y **C**. Barra: 600 nm.



**Figura 3.3.3.** Cromosomas aislados a partir de un gradiente de sacarosa en PME-MgCl<sub>2</sub> 5 mM (sección 2.2.2.5) y depositados en rejilla por centrifugación (sección 2.3.5.1). A continuación, los cromosomas fueron sometidos a un cambio de medio con Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, sacarosa 50% (punto 3.4 de la tabla 2.3.3 ). Los procesos de fijación y platinación se realizaron de la manera habitual (sección 2.3.8.1 y 2.3.9.1). La micrografía **D** tiene un tiempo de exposición superior a la micrografía **C**. En **A** y **B** la barra representa 600 nm mientras que en **C** y **D** representa 300 nm.



**Figura 3.3.4.** Cromosomas aislados a partir de un gradiente de sacarosa en poliaminas (A) y (B) (sección 2.2.2.5) o obtenidos en medio hipotónico y TeaKMC-MgCl<sub>2</sub> 5 mM (C) y (D) (sección 2.2.2.3.1). Después de extender la muestra en la rejilla (sección 2.3.5.1) los cromosomas fueron fijados (ver sección 2.3.8.1 en caso de A y B, o sección 2.3.8.2 para C y D) y finalmente platinados (sección 2.3.9.1). La barra representa 600 nm.

### 3.3.2 Cromosomas granulados

Cuando disminuimos la fuerza iónica del medio donde se hallan los cromosomas (ver tabla 3.3.1) estos empiezan a perder su elevado nivel de compactación y muestran una morfología más granulada.

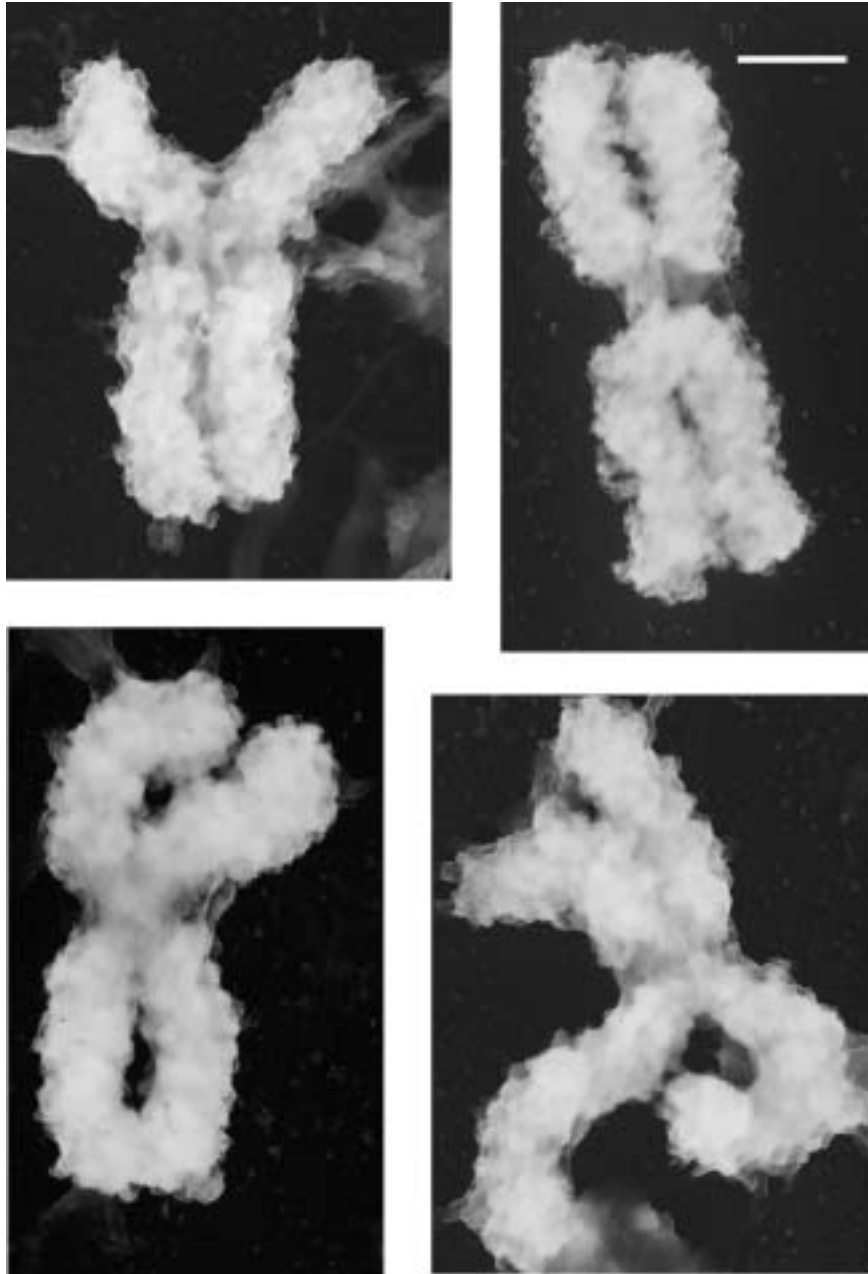
En caso de los cromosomas obtenidos en poliaminas, al bajar ligeramente la fuerza iónica, las cromátidas presentan un aspecto granuloso causado por unos corpúsculos esféricos de aproximadamente 100 nm de diámetro. A diferencia de los cromosomas compactos, en esta condición se puede distinguir el surco central entre cromátidas (figura 3.3.5).

Estos resultados indican que pequeñas diferencias en los procesos experimentales pueden dar lugar a diferencias morfológicas en el aspecto de los cromosomas. En las mismas condiciones globales de la figura 3.3.5, también obteníamos cromosomas con un aspecto como el mostrado en las figuras 3.3.6 y 3.3.7. En estos cromosomas, desaparecen los cuerpos de 100 nm de diámetro, pero aparece un tipo de granulado más periférico y de tamaño más pequeño (30-40 nm de diámetro).

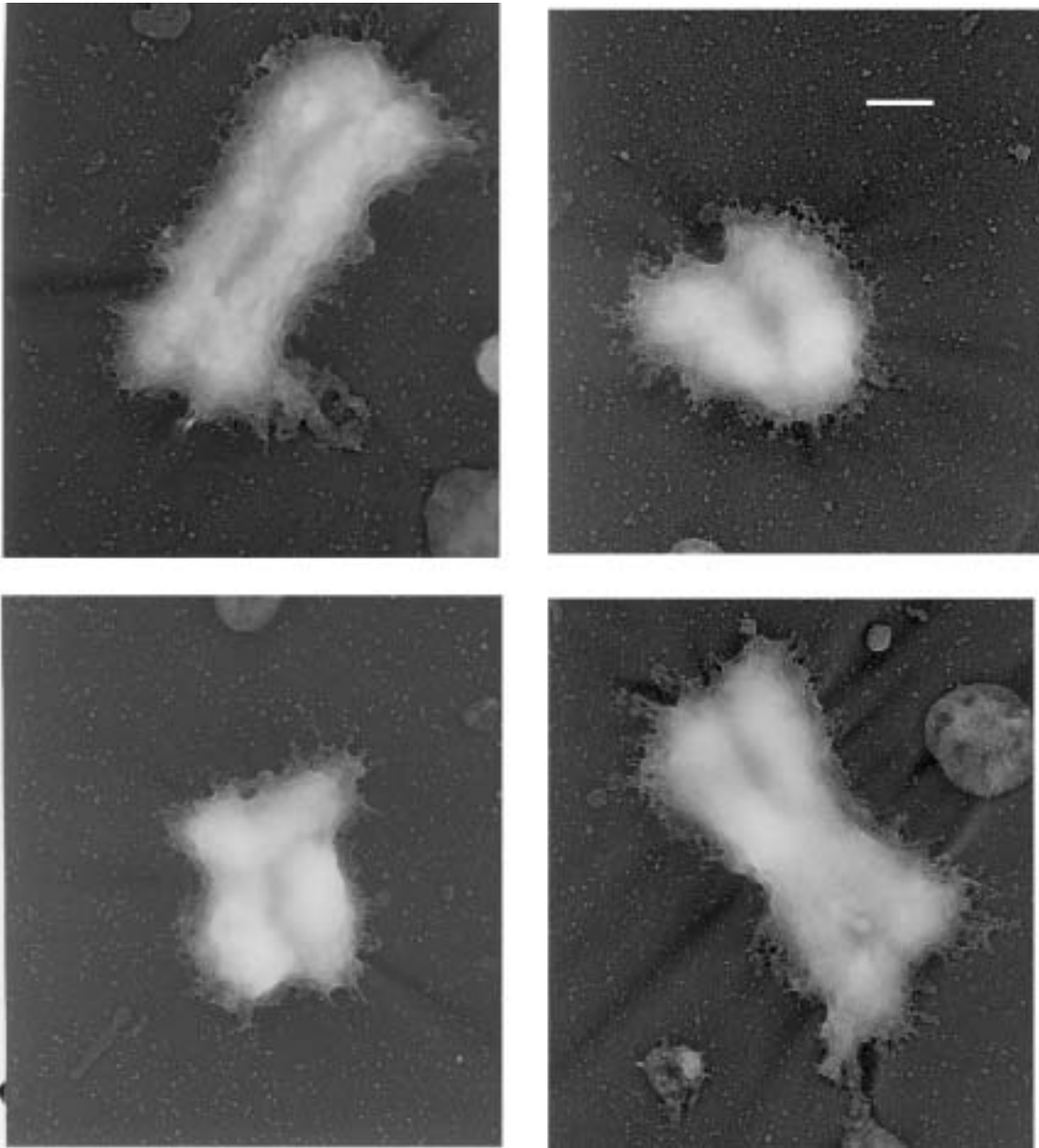
Al disminuir aún más las condiciones iónicas (ver tabla 3.3.1), la granulación en los cromosomas se vuelve muy abundante (ver figuras 3.3.8, 3.3.9, 3.3.10, 3.3.11, 3.3.12 y 3.3.13). Los gránulos de 30-40 nm, son muy evidentes sobretodo en la periferia. En el interior del cromosoma también se aprecian estos gránulos, aunque la gran cantidad de éstos hace que no los podamos ver con claridad. Estos cuerpos circulares vistos al microscopio electrónico, tienen las mismas características estructurales que las observadas con pequeños fragmentos de cromatina de eritrocitos de pollo estudiadas previamente en nuestro laboratorio (ver sección 1.2.3). En las condiciones de fuerza iónica más baja también se puede observar cuerpos del tamaño de nucleosomas (figuras 3.3.8, 3.3.9 y 3.3.12) incrementando de esta manera el aspecto granuloso de las cromátidas.

Pese a la dominancia de la morfología granulada en estas condiciones también aparecen elementos de los otros dos tipos de estructura global. Así por ejemplo es fácil encontrar elementos compactos y placas en las partes centrales de algunas cromátidas (figuras 3.3.6, 3.3.7, 3.3.8, 3.3.9, 3.3.10 y 3.3.11), y en las periferias de algunos

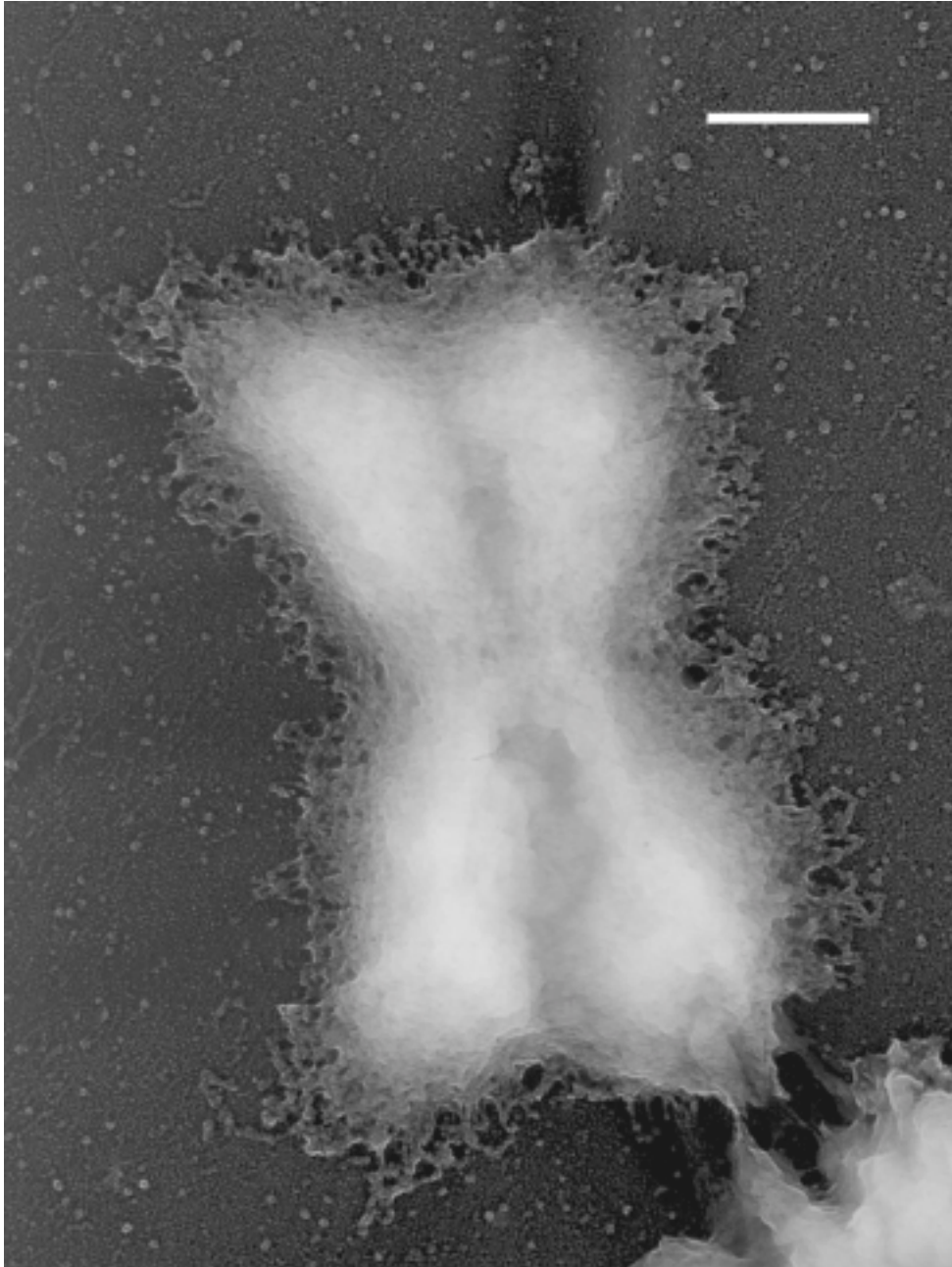
cromosomas también podemos observar la presencia de largas fibras de cromatina compuestas por cuerpos de 30-40 nm de diámetro (ver figuras 3.3.8, 3.3.9 y 3.3.12).



**Figura 3.3.5.** Cromosomas metafásicos obtenidos en medio de poliaminas (sección 2.2.2.2). La extensión de la muestra sobre rejilla, fijación y posterior platinación, se realizó según el procedimiento descrito en las secciones 2.3.5.1, 2.3.8.2 y 2.3.9.1. La barra representa 600 nm.

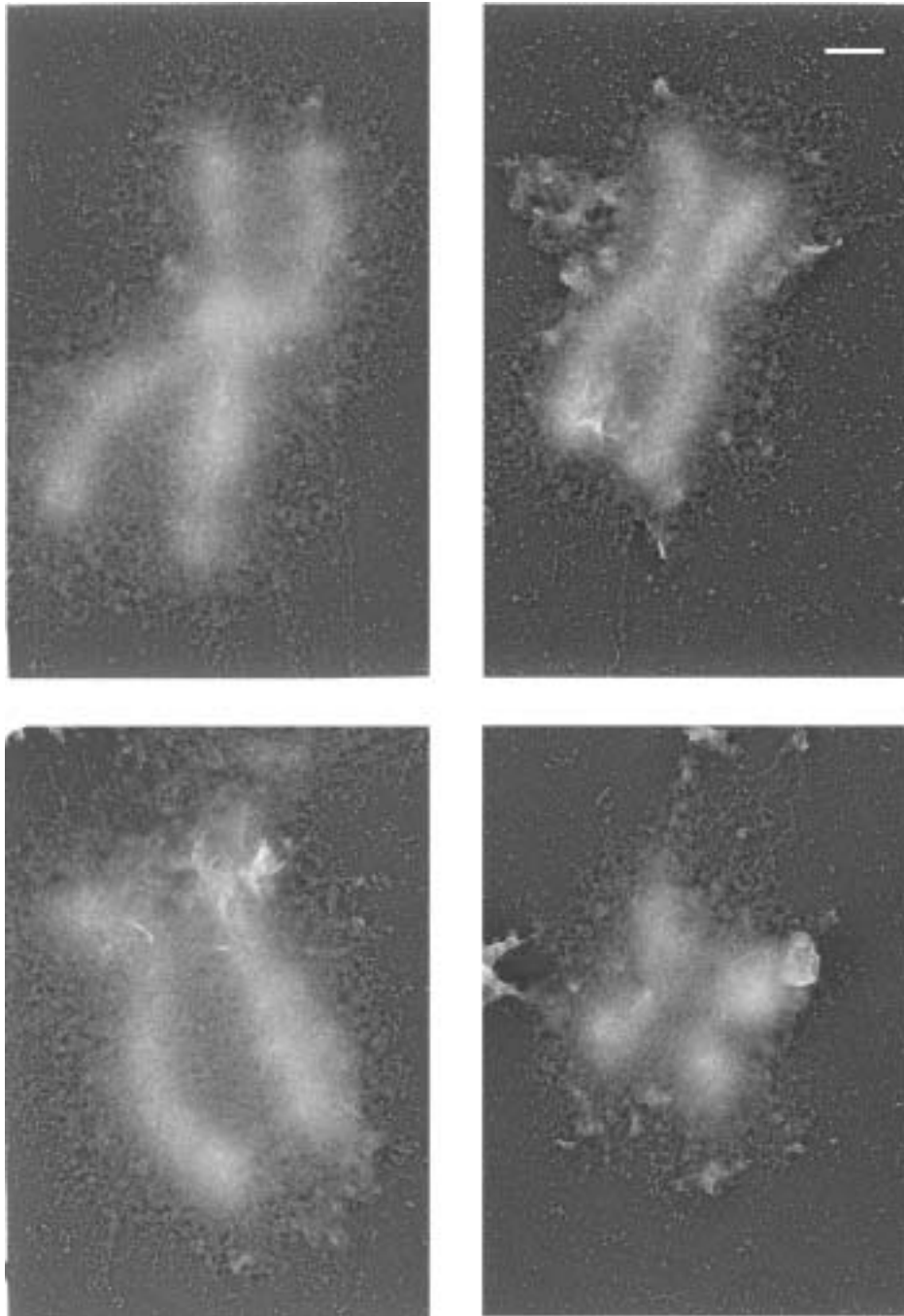


**Figura 3.3.6.** Cromosomas metafásicos obtenidos en medio de poliaminas (sección 2.2.2.2). Aunque los procedimientos de obtención y tratamiento de la muestra son los mismos que los realizados en la figura anterior, los experimentos de los cuales se obtuvieron las muestras son distintos. La barra representa 600 nm.

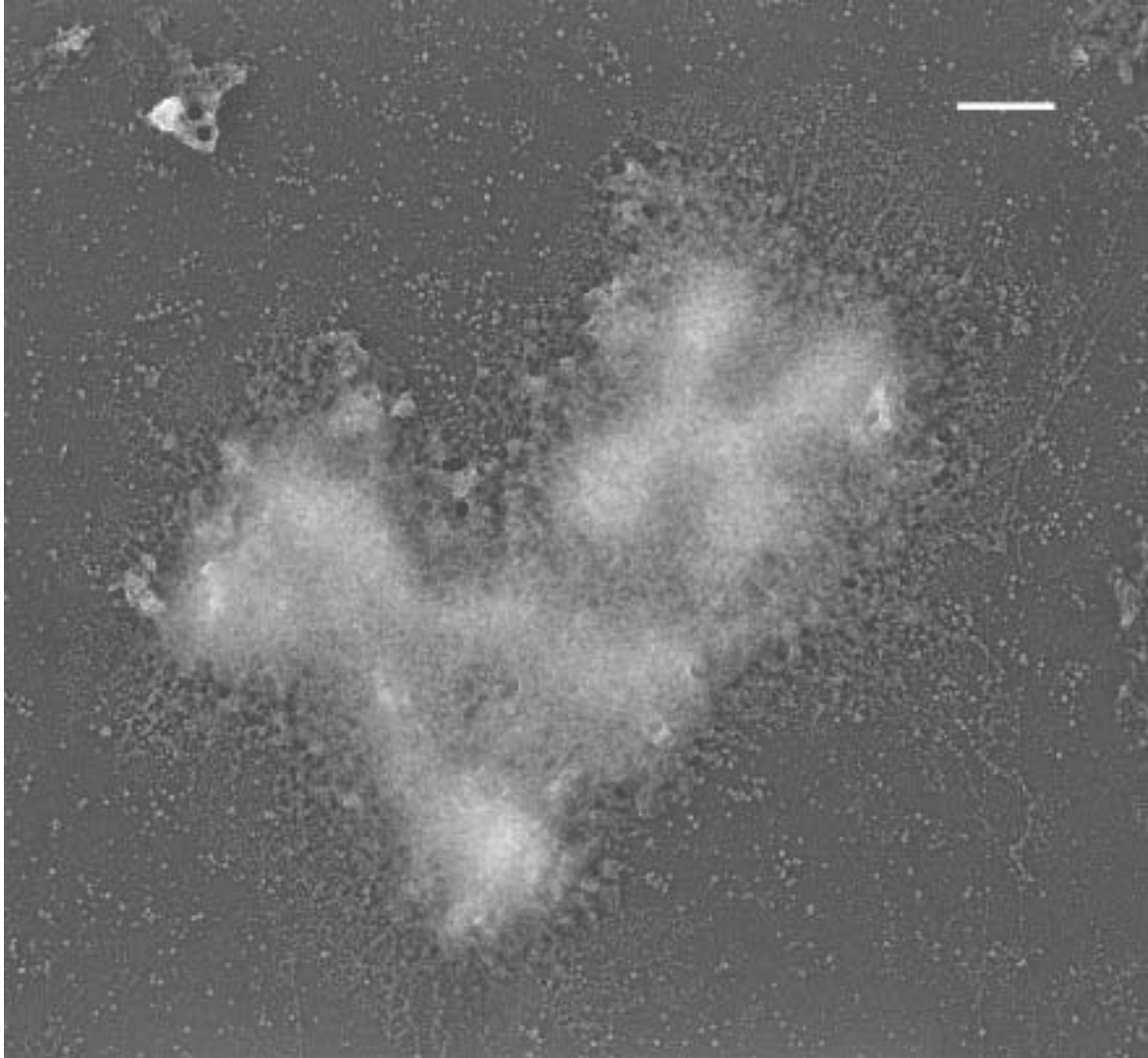


**Figura 3.3.7.** Ampliación de un cromosoma metafásico procedente de la misma rejilla que los cromosomas mostrados en la figura anterior. La barra indica 600 nm.

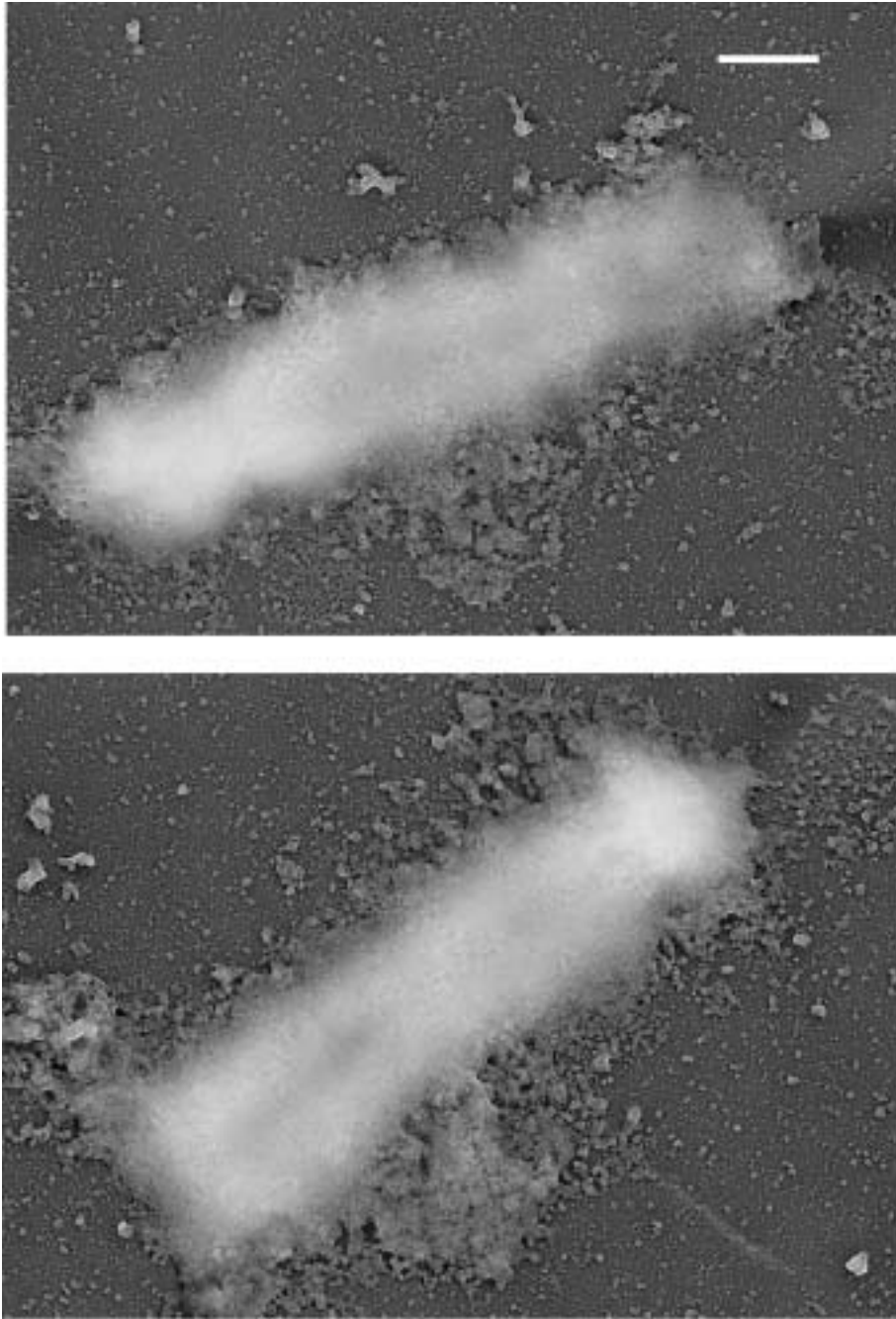




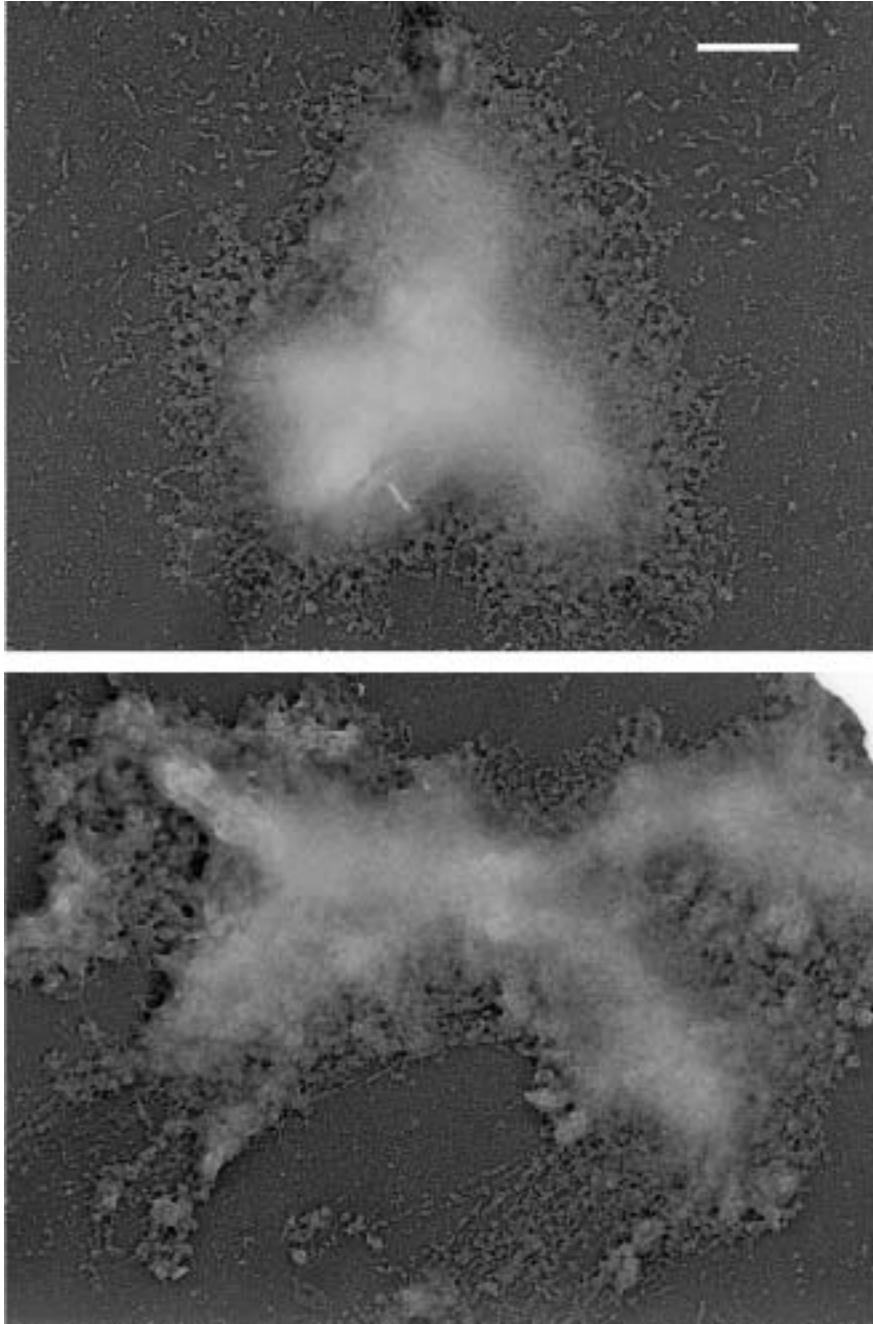
**Figura 3.3.8.** Cromosomas aislados a partir de un gradiente de sacarosa en PME-MgCl<sub>2</sub> 5 mM (sección 2.2.2.5) y depositados en rejilla por centrifugación (sección 2.3.5.1). Estos cromosomas fueron sometidos posteriormente a un cambio de medio con Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, EDTA 10 mM, sacarosa 50% (punto 3.1 de la tabla 2.3.3). La fijación y la platinación se realizó de la manera habitual (secciones 2.3.8.1 y 2.3.9.1). La barra representa 600 nm.



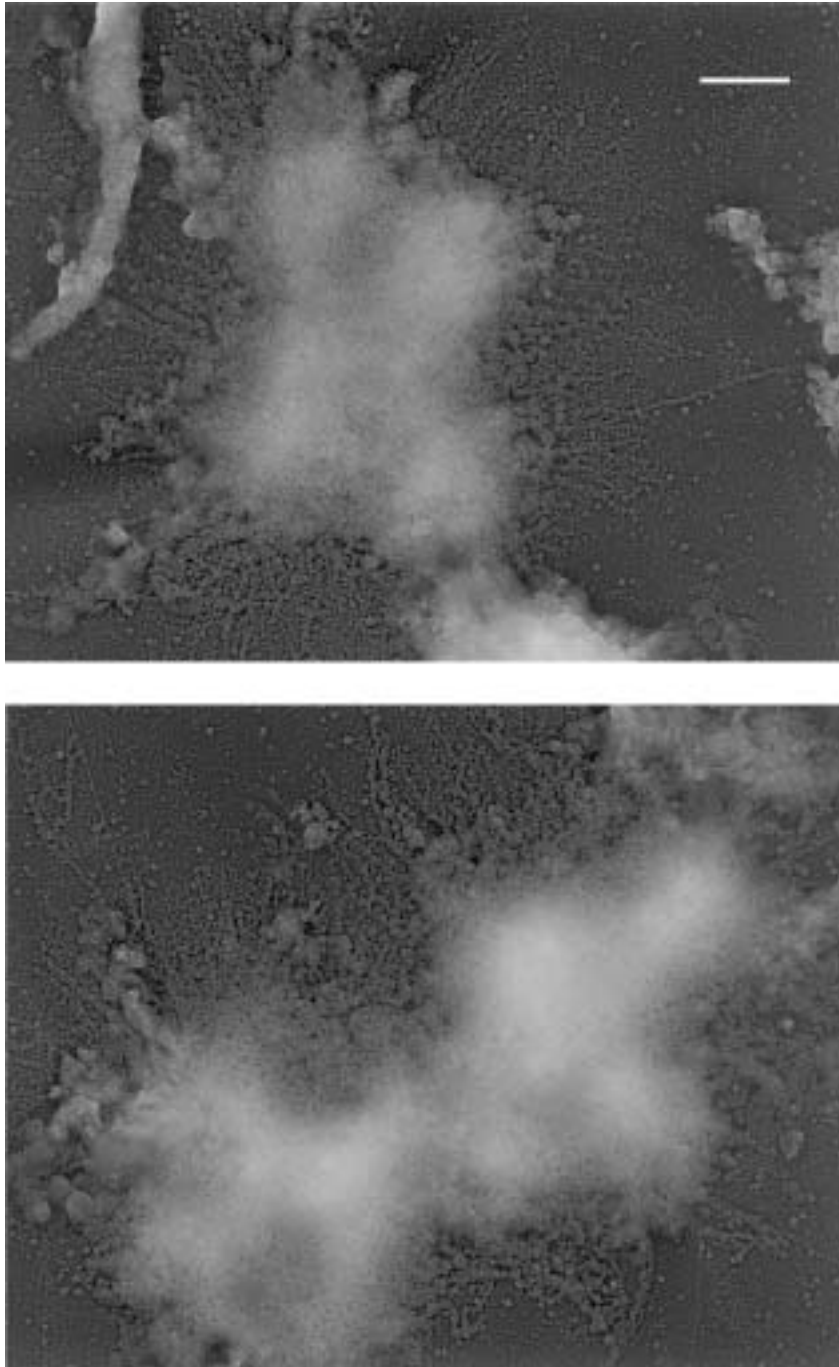
**Figura 3.3.9.** Ampliación de dos cromosomas metafásicos procedentes de la misma rejilla de microscopía electrónica, que los cromosomas expuestos en la figura anterior. Barra: 600 nm.



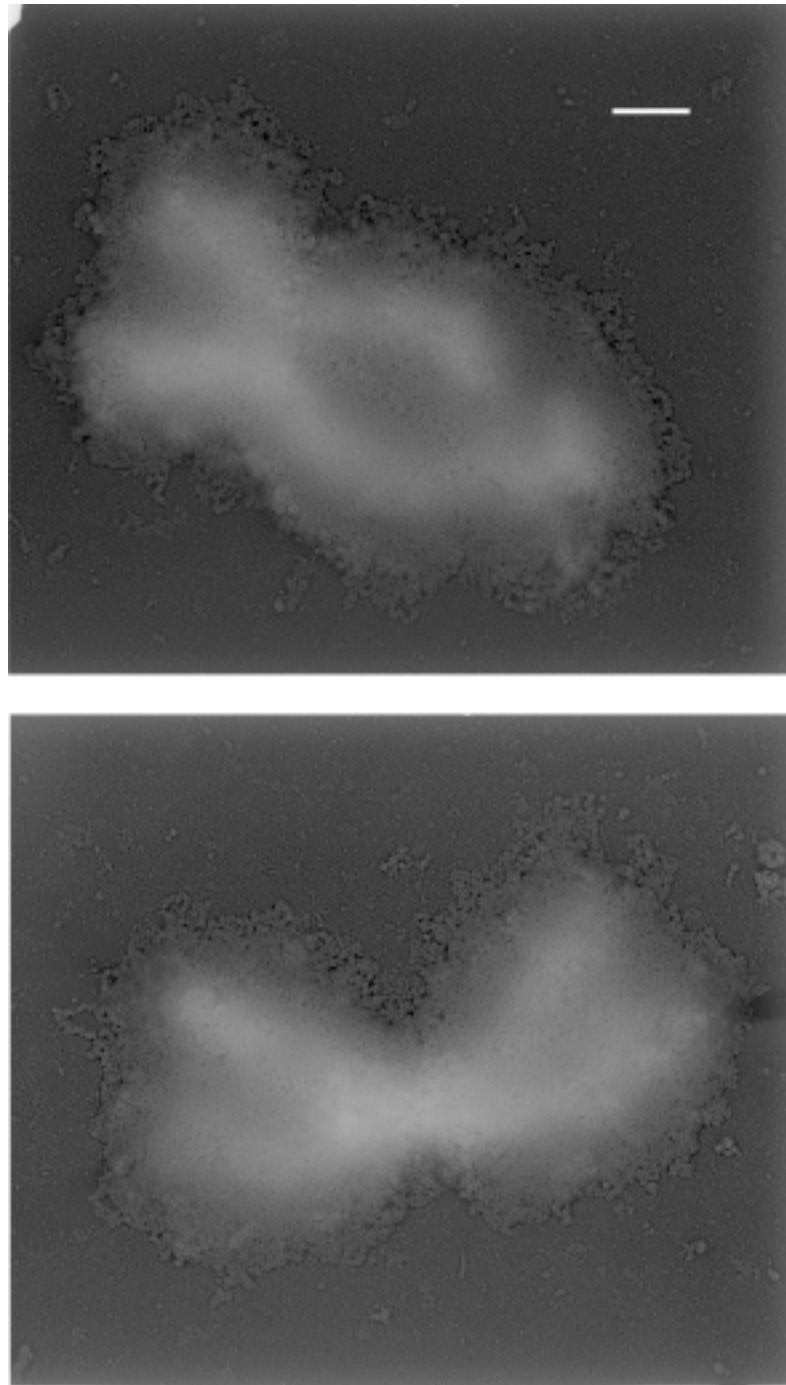
**Figura 3.3.10.** Cromosomas aislados a partir de un gradiente de sacarosa en PME-MgCl<sub>2</sub> 5 mM (sección 2.2.2.5) y depositados en rejilla por centrifugación (sección 2.3.5.1). Después de someter a los cromosomas a un cambio de medio en Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM (punto 12.3 de la tabla 2.3.3) éstos fueron fijados y platinados de la manera habitual (secciones 2.3.8.1 y 2.3.9.1). La barra representa 600 nm.



**Figura 3.3.11.** Cromosomas aislados a partir de un gradiente de sacarosa en PME-MgCl<sub>2</sub> 5 mM (sección 2.2.2.5) y extendidos en rejilla por centrifugación (sección 2.3.5.1). En esta ocasión, el cambio de medio fue con citrato sódico 26 mM pH 7.8 (punto 5.3 de la tabla 2.3.3). La fijación y platinación de las muestras de nuevo se realizó según el procedimiento habitual (secciones 2.3.8.1 y 2.3.9.1). La barra indica 600 nm.



**Figura 3.3.12.** Los cromosomas mostrados en esta figura, fueron aislados, extendidos, fijados y platinados, según el mismo procedimiento que el detallado en las últimas cuatro figuras. El cambio de medio se realizó con Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM (punto 4.1 de la tabla 2.3.3). La barra representa 600 nm.



**Figura 3.3.13.** Cromosomas metafásicos aislados, extendidos, fijados y platinados de igual modo que el descrito en las últimas cinco figuras. El cambio de medio en esta ocasión fue con TEAB 90 mM pH 8.6,  $MgCl_2$  1.7 mM (punto 4.0 de la tabla 2.3.3). La barra representa 600 nm.

### 3.3.3 Cromosomas fibrosos

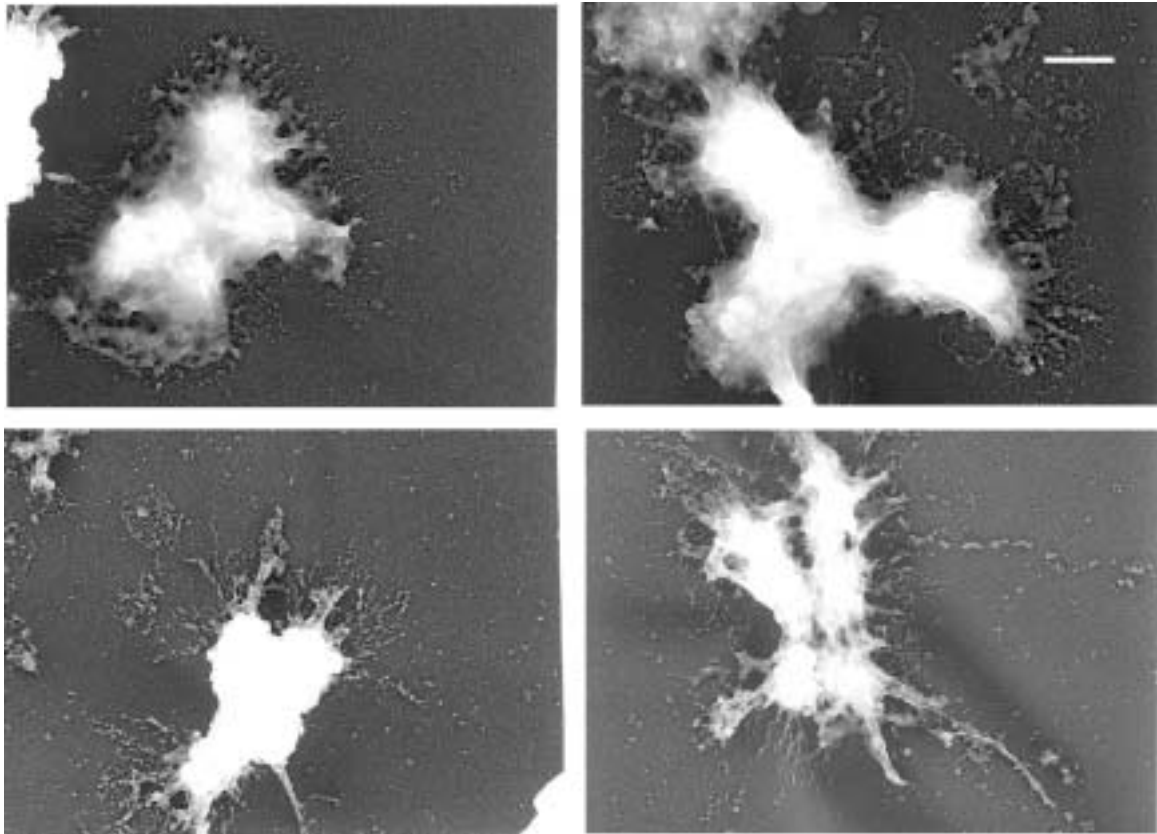
En condiciones iónicas de muy baja concentración (ver tabla 3.3.1), los cromosomas presentan un estado extendido con gran abundancia de fibras que se proyectan hacia el exterior de sus cromátidas. La gran mayoría de estas fibras tienen un diámetro de 30-40 nm y están formadas por los mismos cuerpos de 30-40 nm observados en los cromosomas granulados (ver figuras 3.3.14, 3.3.15, 3.3.16, 3.3.17, 3.3.18, 3.3.19, 3.3.20 y 3.3.21).

La frecuencia de aparición de estas fibras está directamente relacionada con la fuerza iónica del medio. Así en presencia de iones estructurantes como el  $Mg^{2+}$ , las cromátidas aún conservan un aspecto denso y compacto y en las periferias los cuerpos de 30-40 nm son muy abundantes. Sin embargo, en estas condiciones, las primeras fibras se empiezan a formar, aunque éstas no son muy abundantes y tampoco excesivamente largas (ver figuras 3.3.14 y 3.3.15).

En los medios donde no hay cationes monovalentes ni divalentes, el aspecto dominante de los cromosomas es el fibroso. Incluso también se observa una gran abundancia de nucleosomas (figuras 3.3.16, 3.3.17 y 3.3.18).

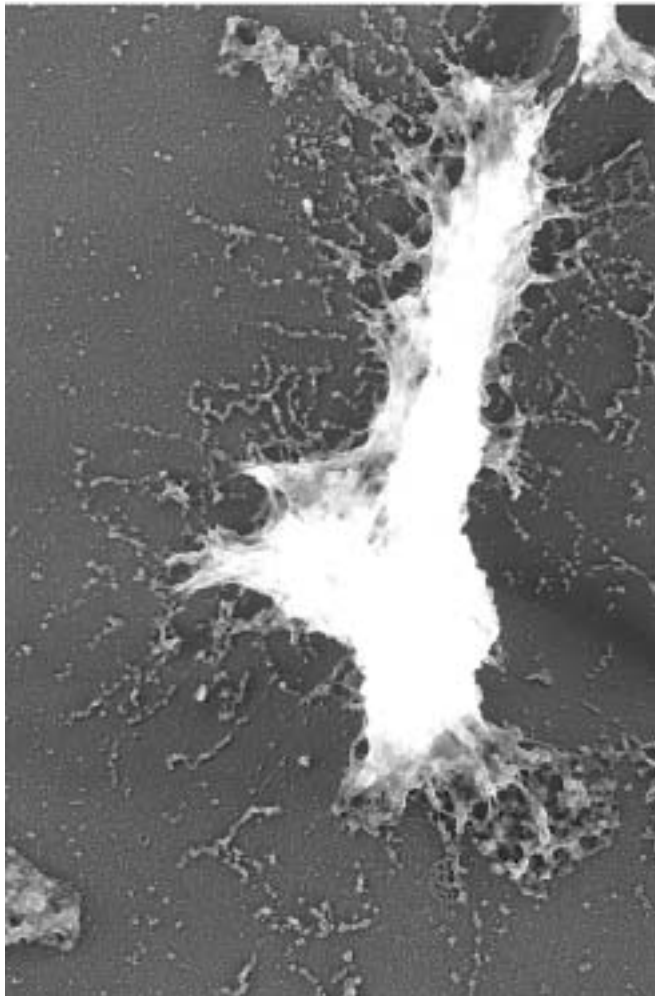
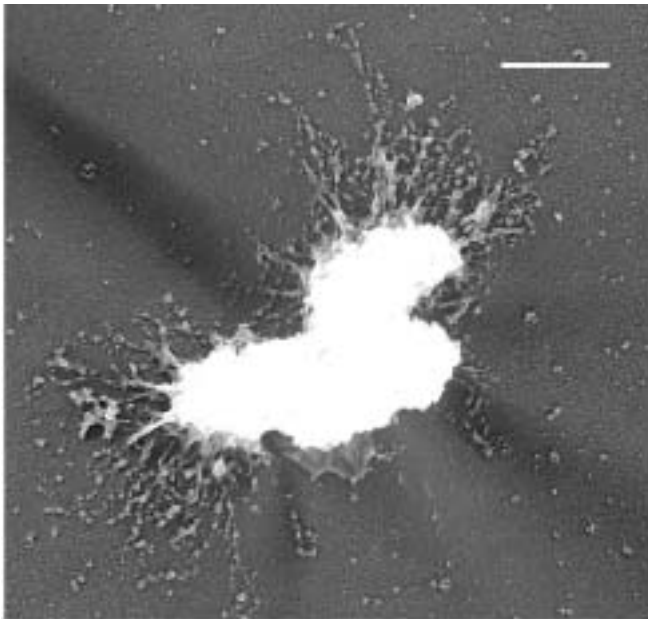
Finalmente, cuando los cromosomas se tratan con un medio exento de iones (agua milliQ) se presentan con un aspecto fibroso espectacular (ver figuras 3.3.19, 3.3.20 y 3.3.21). Se observa una multitud de fibras de 30-40 nm saliendo de las cromátidas, muy fusionadas entre ellas. Incluso los cromosomas tienen las cromátidas considerablemente alargadas en forma de fibra. Además estas estructuras fibrosas presentan un fondo muy rico en nucleosomas.

En estas condiciones de dominancia de la morfología en forma de fibra, el interior de las cromátidas tiene un aspecto muy granulado. En algunas micrografías (ver por ejemplo figura 3.3.20) incluso se pueden apreciar algunos elementos en forma de placa.

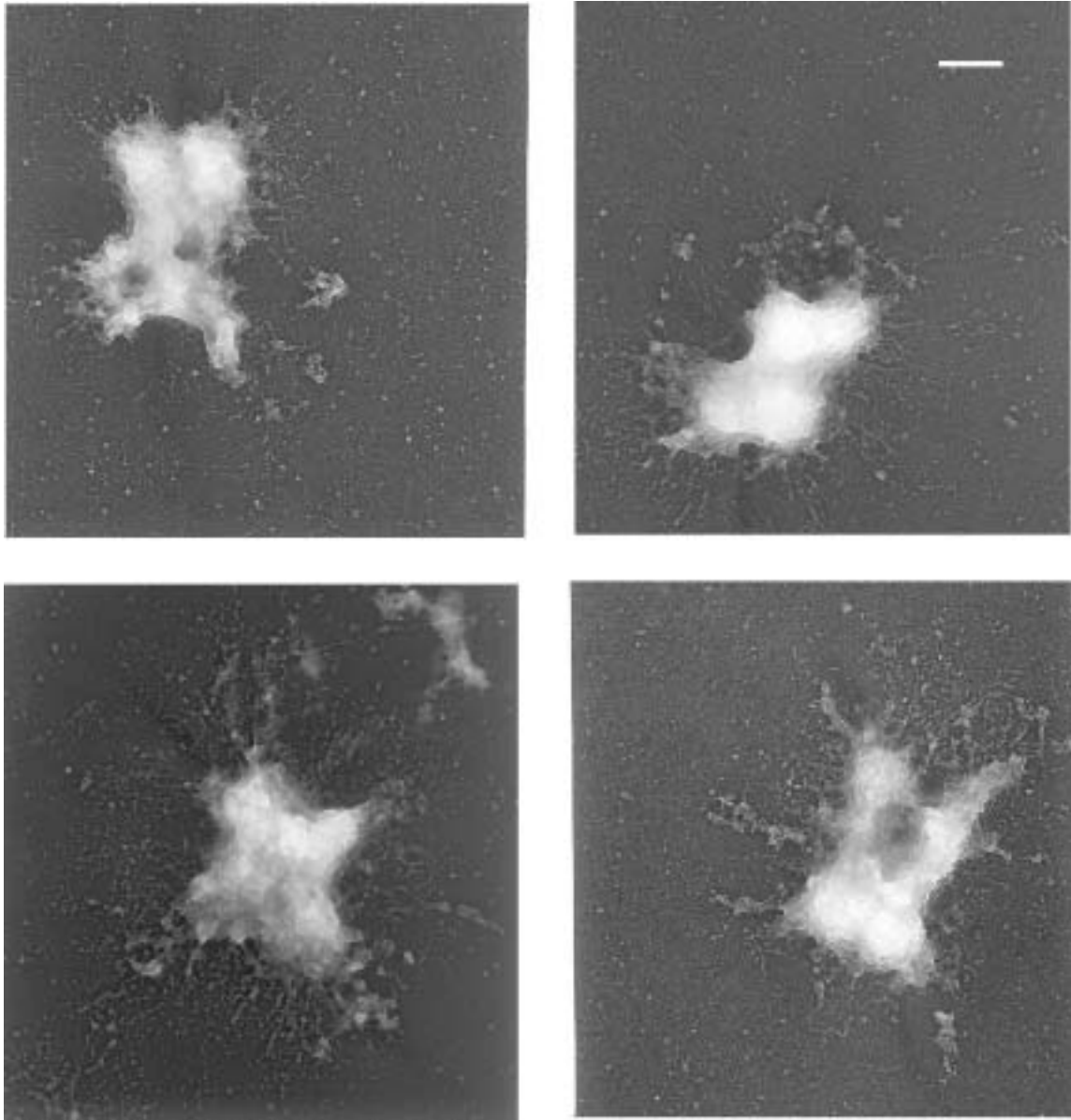


**Figura 3.3.14.** Cromosomas aislados a partir de un gradiente de sacarosa en PME-MgCl<sub>2</sub> 5 mM (sección 2.2.2.5) y depositados en rejilla por centrifugación (sección 2.3.5.1). A continuación, los cromosomas fueron sometidos a un cambio de medio con Pipes 0.1 mM pH 7.2, MgCl<sub>2</sub> 0.1 mM (punto 5.1 de la tabla 2.3.3). Finalmente fueron fijados (sección 2.3.8.1) y platinados rotacionalmente (sección 2.3.9.1). La barra representa 600 nm.

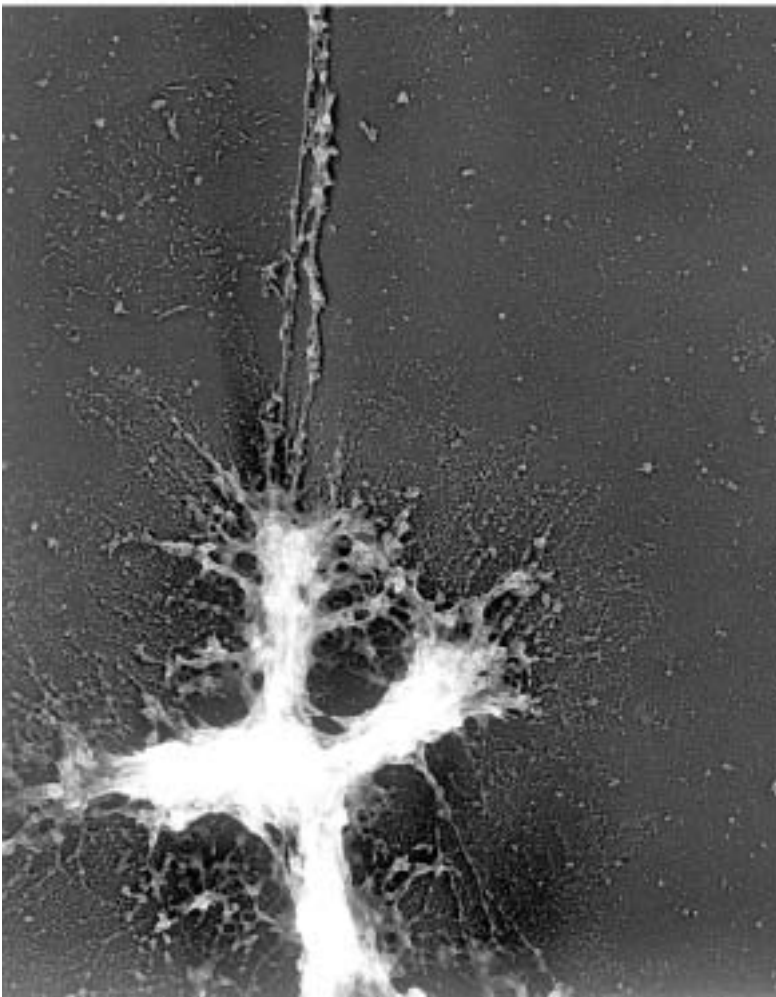
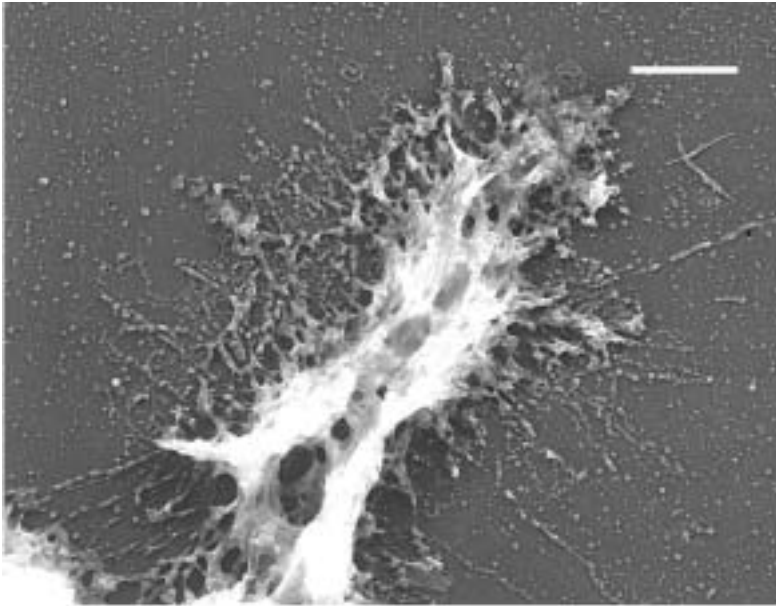




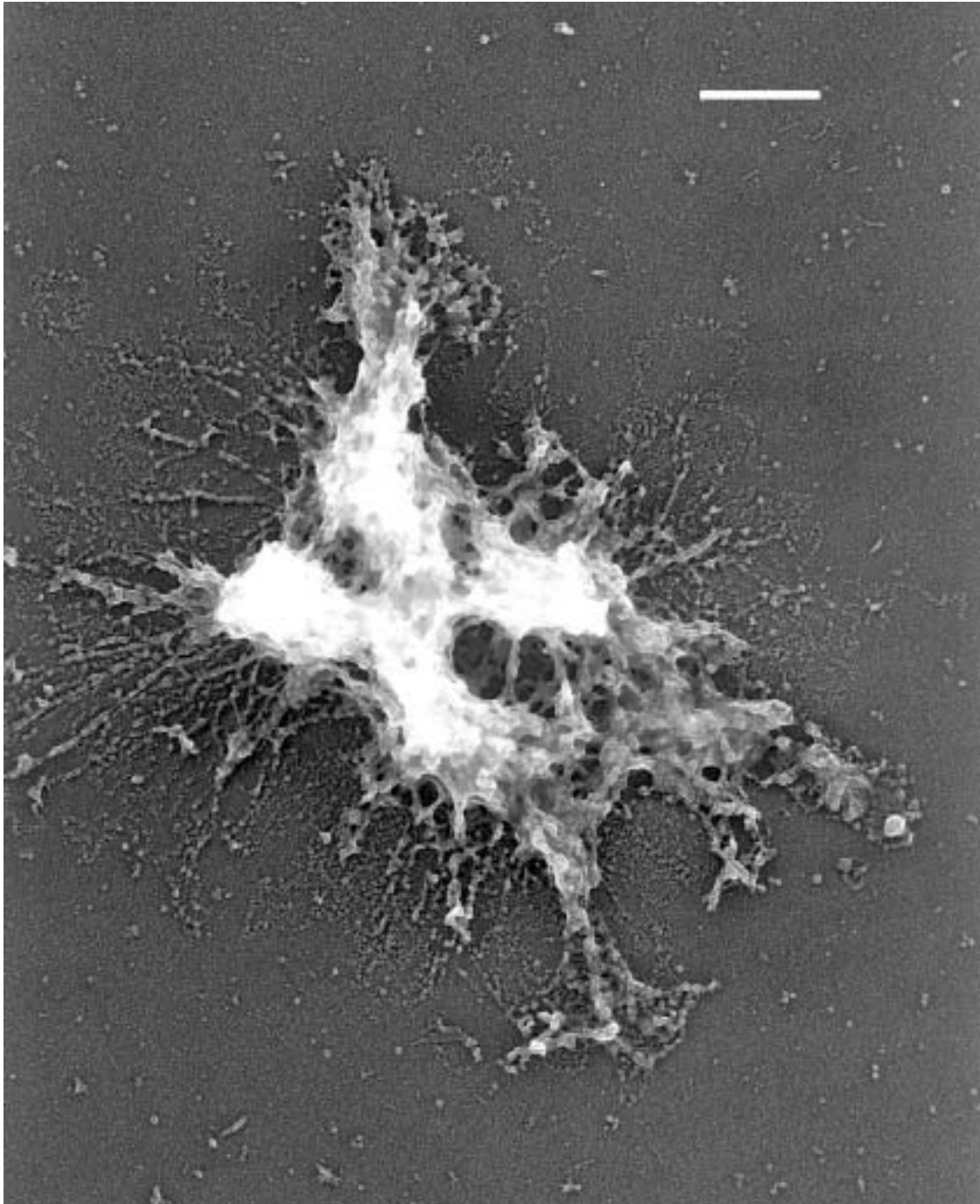
**Figura 3.3.15.** Cromosomas metafásicos aislados, extendidos, fijados y platinados de igual manera que los cromosomas de la figura anterior. El cambio de medio fue con Pipes 0.1 mM pH 7.2,  $MgCl_2$  0.1 mM (punto 5.1 de la tabla 2.3.3). La barra representa 600 nm.



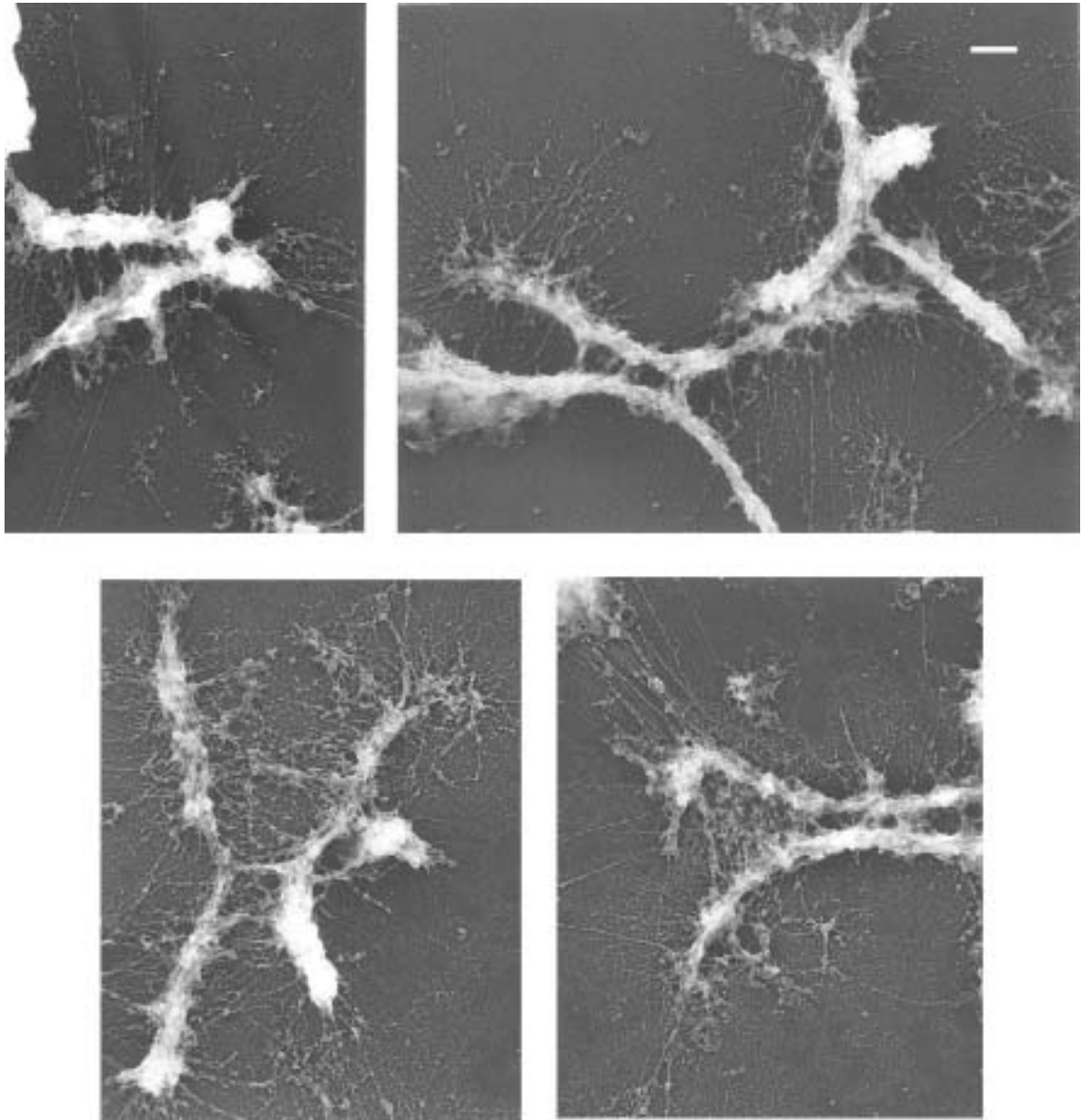
**Figura 3.3.16.** Cromosomas metafásicos aislados, extendidos, fijados y platinados de igual modo que los mostrados en la figura 3.3.14. El cambio de medio se efectuó con Pipes 0.1 mM pH 7.2 (punto 12.1 de la tabla 2.3.3). Barra: 600 nm.



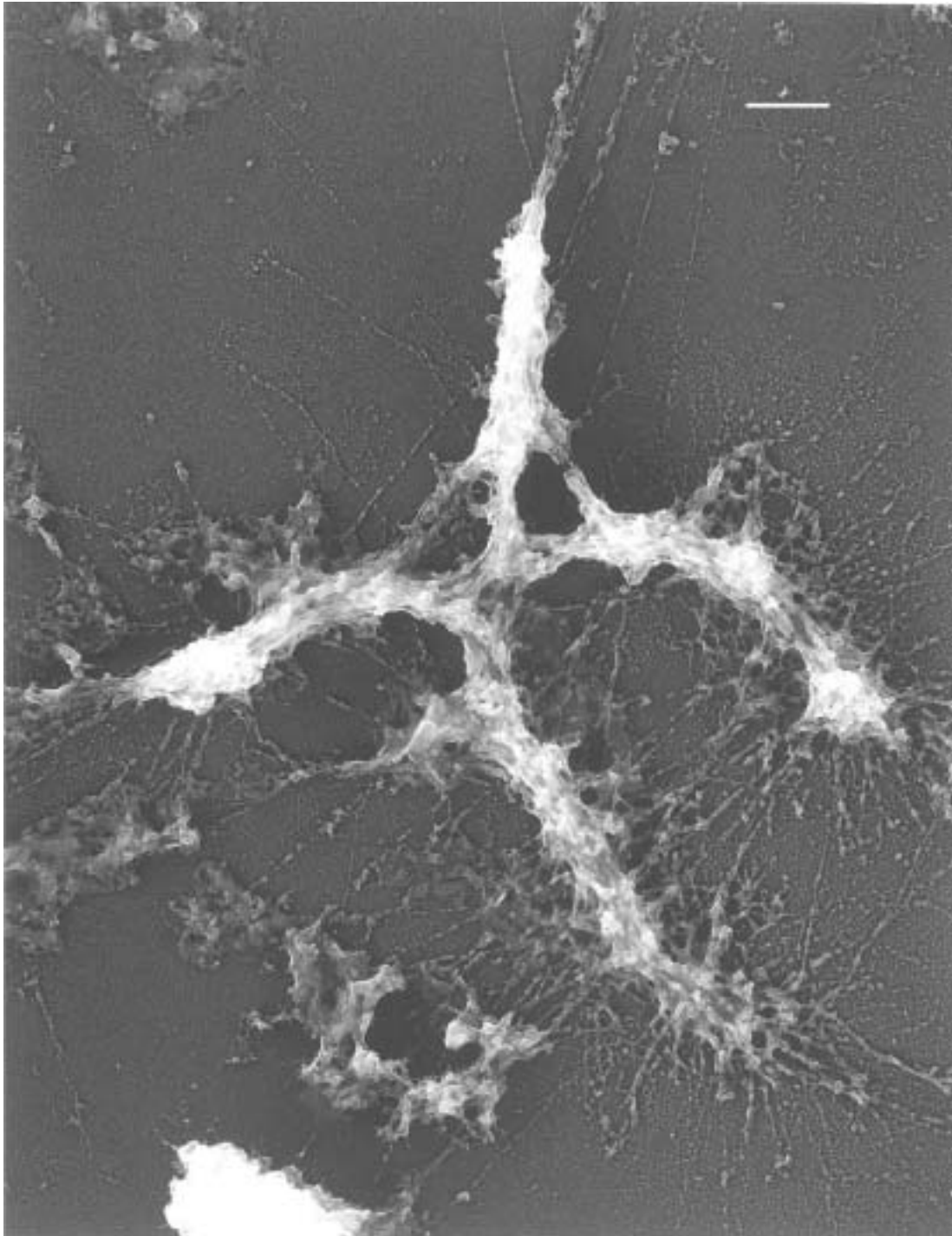
**Figura 3.3.17.** Cromosomas metafásicos obtenidos y tratados según el mismo procedimiento que el descrito en la figura 3.3.14. El cambio de medio también se realizó con Pipes 0.1 mM pH 7.2 (punto 5.0 de la tabla 2.3.3). La barra representa 600 nm.



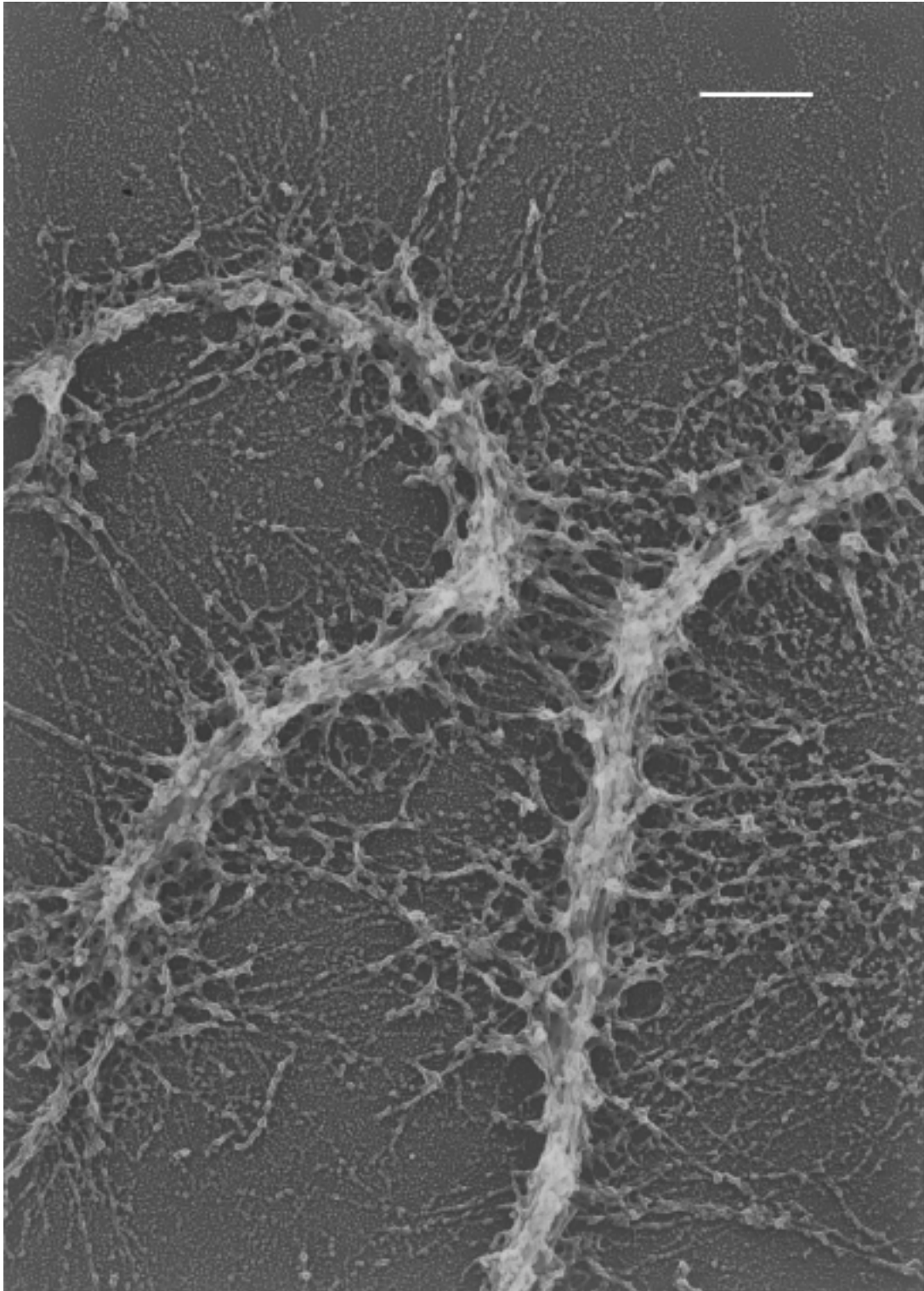
**Figura 3.3.18.** Ampliación de un cromosoma metafásico procedente de la misma rejilla que los cromosomas mostrados en la figura anterior. La barra representa 600 nm.



**Figura 3.3.19.** Cromosomas metafásicos sometidos a un cambio de medio en H<sub>2</sub>O (punto 3.0 de la tabla 2.3.3). La muestra fue obtenida, extendida, fijada y platinada según el procedimiento detallado en la figura 3.3.14. La barra representa 600 nm.



**Figura 3.3.20.** Ampliación de un cromosoma metafásico procedente de la misma rejilla que los mostrados en la figura anterior. La barra representa 600 nm



**Figura 3.3.21.** Cromosoma metafásico procedente de la misma rejilla que los cromosomas mostrados en las figuras 3.3.19 y 3.3.20. La barra representa 600 nm