



Acta Biológica Colombiana

ISSN: 0120-548X

racbiocol_fcbog@unal.edu.co

Universidad Nacional de Colombia Sede

Bogotá

Colombia

BUENO, MARTA LUCIA

CROMOSOMAS, VEHÍCULOS EN LA ORGANIZACIÓN Y TRANSMISIÓN DE LOS CARACTERES

Acta Biológica Colombiana, vol. 16, núm. 3, 2011, pp. 43-60

Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá

Bogotá, Colombia

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=319027888003>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

CROMOSOMAS, VEHÍCULOS EN LA ORGANIZACIÓN Y TRANSMISIÓN DE LOS CARACTERES

Chromosomes as Vehicle in Organization and Transmission of Characters

MARTA LUCIA BUENO. M.Sc.¹

¹Laboratorio Citogenética, Instituto de Genética. E.M., Departamento de Biología. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Colombia.
mlbuenoa@unal.edu.co

Presentado 8 de febrero de 2011, aceptado 24 de mayo de 2011, correcciones 1 de julio de 2011.

RESUMEN

Uno de los aspectos fundamentales en los genomas es la organización de los genes en paquetes conocidos como cromosomas. Todos los organismos, desde los más simples, hasta los más complejos tienen estas estructuras, siendo la morfología y número de estos una característica de cada especie.

Las mutaciones cromosómicas son cambios, que pueden ser originados por errores en la mitosis o meiosis en un individuo, y que pueden ser fijadas en la población durante la evolución si representa alguna ventaja selectiva, en caso contrario, si tienen efectos negativos severos en el fenotipo y/o en la fertilidad de los portadores, se manifestará como una anomalía o síndrome genético que será eliminado de la población.

En este artículo de reflexión se muestra como a la luz de las técnicas citogenéticas clásicas y moleculares, se ha venido entendiendo el papel de los rearrreglos cromosómicos en la diferenciación de especies, así como que fallas puntuales o cambios individuales en su morfología o número pueden ocasionar serias disfunciones reconocidas como síndromes genéticos.

Palabras clave: cromosomas, organización del genoma, cambios cromosómicos, citogenética molecular, evolución cromosómica.

ABSTRACT

One of the fundamental aspects of genomes is the organization of the genes in packages known as chromosomes. All organisms from the simplest to the most complex possess chromosomes as part of their genome and they are characterized by a particular morphology and a characteristic number of each species.

Chromosome mutations induce changes that can originate in mitotic or meiotic errors in an individual, and these can become fixed in the population during evolution. This results either if the particular changes represent a selective advantage, or they may result in severe effects on the phenotype and fertility of its carriers that may be manifested as a genetic syndrome.

In this essay I demonstrate how, using conventional and recent cytogenetic and molecular techniques we have begun understanding the function of chromosome arrangements in the differentiation of species and how particular defects or individual changes in the morphology or number of chromosomes can result in serious dysfunctions that are recognized as genetic syndromes.

Key words: chromosomes, genome organization, chromosome changes, molecular cytogenetics, chromosome evolution

INTRODUCCIÓN

El genoma de todos los organismos –incluyendo por supuesto a los humanos– se encuentra empaquetado en unos corpúsculos intranucleares coloreados llamados cromosomas (cromo=color; soma=cuerpo), visibles principalmente durante el proceso de división celular (mitosis y meiosis; Bowen *et al.*, 1998). Los cromosomas se observan al microscopio durante la metafase, cuando el DNA se ha duplicado y la cromatina está muy condensada. En esta fase, las dos hebras de DNA permanecen unidas por el centrómero formando las cromátides hermanas (Fig. 1). El número, morfología y tamaño de éstos, es característica de las especies y su organización se realiza con la observación de patrones longitudinales de bandeo cromosómico, conseguidos mediante técnicas específicas de tinción, que reflejan la organización cromosómica en cuanto a las secuencias en el DNA y el contenido de genes (regiones ricas en genes con altos contenidos en guanina y citosina, o regiones pobres en genes, con secuencias ricas en adenina y timina). La organización final de los cromosomas a partir de microfotografías obtenidas en metafase mitótica, agrupando los cromosomas por parejas y teniendo en cuenta los patrones de

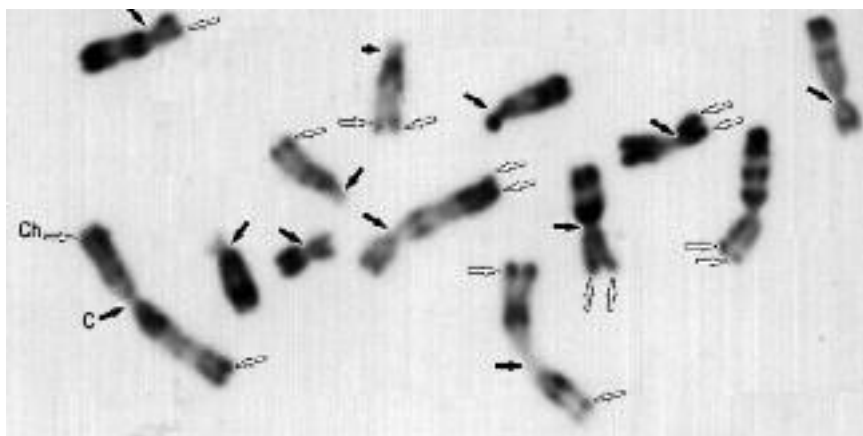


Figura 1. Vista parcial de metafase humana teñida con coloración de bandas R. Observar las diferencias en tamaño, forma, patrón de coloración de los cromosomas. Las flechas sólidas están marcando las constricciones primarias o centrómeros (C), en tanto que las blancas, evidencian la presencia de las dos cromátides hermanas (Ch) en el cromosoma. (Fotos cortesía del laboratorio de citogenética, Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia, 2009).

bandeo, conforma el cariotipo de una especie, que es común a todos los individuos de la especie. Un cambio, en la dotación cromosómica ya sea numérico o estructural, determina a su vez un cambio genómico que puede tener consecuencias fenotípicas en el individuo originando lo que conocemos como síndromes cromosómicos (como síndrome de Down, síndrome de Turner, trisomías autosómicas, translocaciones; Barber, 2005). Por otra parte, a mayor escala, en tiempo y espacio, cuando estos cambios ocurren en poblaciones y se fijan en ellas, pueden marcar el inicio de un proceso evolutivo dentro de la especie. Tenemos un ejemplo en la rápida evolución en el genoma de équidos (*Equus*) donde los números diploides que van desde $2n=32$ a $2n=66$, con extensos rearreglos cromosómicos. Se ha estimado que los cambios en este género pueden ser hasta ochenta veces más rápidos que en otros miembros del orden Perissodactyla como en rinocerontes y tapires (Piras *et al.*, 2009).

Los cromosomas en el núcleo, son los portadores de la mayor parte del material genético y condicionan la organización de la vida y la mayoría de características hereditarias de cada especie, complementado por los cromosomas circulares mitocondriales y cloroplastidiales en donde se localizan algunos genes (67 genes en mitocondrias y hasta 210 genes en cloroplastos de *Chlorella vulgaris*; NCBI, 2010).

Desde los experimentos de Mendel, 1865, se puso de manifiesto, que muchos de los caracteres del guisante dependen de dos factores (hoy llamados genes), que cada individuo recibe uno procedente del padre y otro de la madre aunque en esta época no se conocía de la existencia del DNA, ni, por lo tanto que este se encontraba en los cromosomas. En 1902, Sutton y Boveri, fueron los primeros en observar que había un paralelismo entre la herencia de los factores hereditarios y el comportamiento de los cromosomas durante la meiosis y la fecundación, por lo que dedujeron que los factores hereditarios residían en los cromosomas, afirmación que sirvió de base para la formulación de la teoría cromosómica de la herencia unos años más tarde. Solo hasta el principio del siglo XX Johanssen, 1909, acuña el término de genes para denominar a los factores hereditarios mendelianos. En relación con los cromosomas, los primeros en ser visualizados fueron los de la mosca de la fruta, *Drosophila* por Morgan, en 1910, observando que en esta especie los machos tenían tres pares de cromosomas homólogos, llamados autosomas, y un par de cromosomas parecidos, pero no idénticos, a los que designó con las letras X e Y, y denominó heterocromosomas o cromosomas sexuales. Después de efectuar numerosos cruces comprobó que había cuatro grupos de genes que se heredaban ligados que correspondían a los tres autosomas y al par heteromórfico sexual.

Con respecto a los cromosomas humanos solo hasta 1956, Tjio y Levan establecieron definitivamente la dotación cromosómica, y hubo que esperar hasta el período comprendido entre los años 1969 y 1970 para identificar plenamente todo el complemento por su patrón longitudinal de bandas, y definir claramente cada uno de los grupos en el cariotipo humano.

En la mayoría de los eucariota con reproducción sexual, se encuentran dos cromosomas de cada tipo, llamados pares homólogos, en donde cada uno de ellos proviene de uno de los parentales de modo que el número de cromosomas es de $2N$ (esta propiedad se denomina diploidía), y cada homólogo puede portar diferentes alelos. Cuando un organismo posee dos copias idénticas para un gen específico, se dice que es homocigoto con respecto al gen, lo que significa que los dos parentales eran portadores del mismo alelo, por ejem-

plo, longitud del pelo en mamíferos está regulada por el gen L con dos alelos. Si el carácter es dominante, se emplean letras mayúsculas, (L = pelo corto), y minúsculas para el gen recesivo (l = pelo largo). Por lo tanto, si los dos cromosomas homólogos portan el mismo gen, y el organismo es homocigoto (Fig. 2a; Fig. 2c). Cuando el atributo es dominante (pelo corto, LL), se denomina homocigoto dominante (Fig. 2a), o cuando los dos alelos del atributo son recesivos (pelo largo= ll), homocigoto recesivo (Fig. 2c). En el caso de que el organismo porte en cada uno de los homólogos un alelo diferente, se denomina heterocigoto y expresará el fenotipo dominante, (pelo corto, Ll; Fig. 2b).

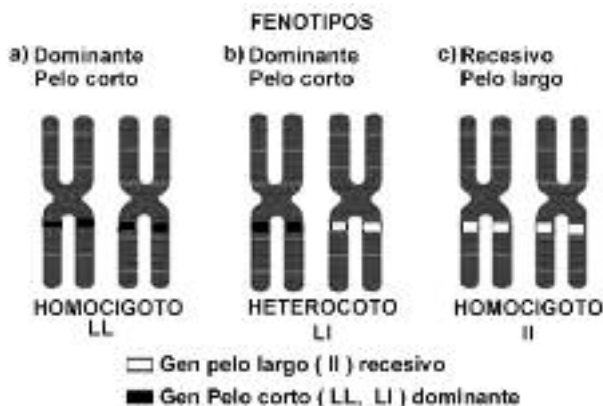


Figura 2. Representación gráfica en diploides (dos homólogos) de la característica de longitud de pelo en mamíferos. a) Homocigotos dominantes, los dos homólogos portan el alelo dominante L; b) Heterocigoto, los dos homólogos portan alelos diferentes, L y l; c) los dos homólogos portan el alelo recesivo ll.

Los genes, están sometidos a procesos de mutación y otros procesos de reorganización que provocan cambios reflejados en la expresión fenotípica de éstos, originando diferentes formas con variaciones en su secuencia denominadas alelos. Cuando la expresión de un alelo concreto provoca un cambio en el individuo, que induce a su muerte, se denomina alelo letal. Si este alelo es dominante, será eliminado rápidamente dado que se expresa tanto en homocigotos como en heterocigotos; en tanto que si el alelo letal es recesivo, solo se expresa causando la muerte en condición homocigota, por lo que los heterocigotos serán portadores sanos, escapando a la selección. Dado que estas mutaciones son esporádicas, aparecen en los linajes (familias), y permanecen en los individuos heterocigotos, reapareciendo solo en casos de matrimonios consanguíneos (endogámicos: unión o reproducción entre individuos de ascendencia común), que permite la formación de individuos homocigotos recesivos, con la expresión del carácter letal. Es interesante anotar, que en todas las poblaciones existe una carga genética definida como el número de genes letales o perjudiciales para los organismos, que en su mayoría son recesivos y por la condición diploide muy generalizada en muchas especies, pasan inadvertidos de generación en generación en los heterocigotos. Tal vez el ejemplo más conocido de esta situación es los matrimonios consanguíneos en las casas reales de Europa con la presencia de hemofilia. Esta enfermedad es originada por una mutación en uno de los factores proteínicos (factor VIII) involucrado en la cascada de eventos im-

plificados en el proceso de coagulación de la sangre. Los portadores de este gen defectuoso, localizado en el cromosoma X, no pueden coagular su sangre tan rápidamente como una persona normal. Durante siglos las casas reales de Europa mantuvieron la costumbre de casarse con miembros de otras cortes, de modo que la enfermedad portada por la reina Victoria I de Inglaterra se extendió a miembros varones de las principales cortes de Europa. Dado que el gen de hemofilia es un gen recesivo y está en el cromosoma X, las mujeres XX, pueden ser portadoras de la mutación, sin presentar la enfermedad, pero la transmiten a sus hijos varones y ellos la sufren y hasta pueden morir por una simple herida. Desde el punto de vista poblacional, cuando éstas se ven reducidas en el número de individuos, por ejemplo en poblaciones que entran en cuellos de botellas (por reducción o fragmentación de sus hábitats), la endogamia es un fenómeno frecuente, que puede llevar a dos situaciones: extinción de la población y/o especie (por reducción de la viabilidad y la fertilidad originada por el incremento de los homocigotos recesivos para los genes letales o, una restitución de la población en el tiempo con una reducción importante de la carga genética por la purga de alelos letales en los sobrevivientes (Charlesworth y Charlesworth, 1987; Willis, 1999).

Para el estudio de la herencia de características en las diferentes generaciones, los genetistas emplean estudios de pedigrí familiar que es una forma de análisis genético en donde el genetista elabora un diagrama siguiendo unas convenciones universales (Fig. 3A) que representa a cada uno de los individuos conocidos de la familia con respecto a la característica estudiada. En la figura 3B se muestra un pedigrí en el cual el probando IV 1,

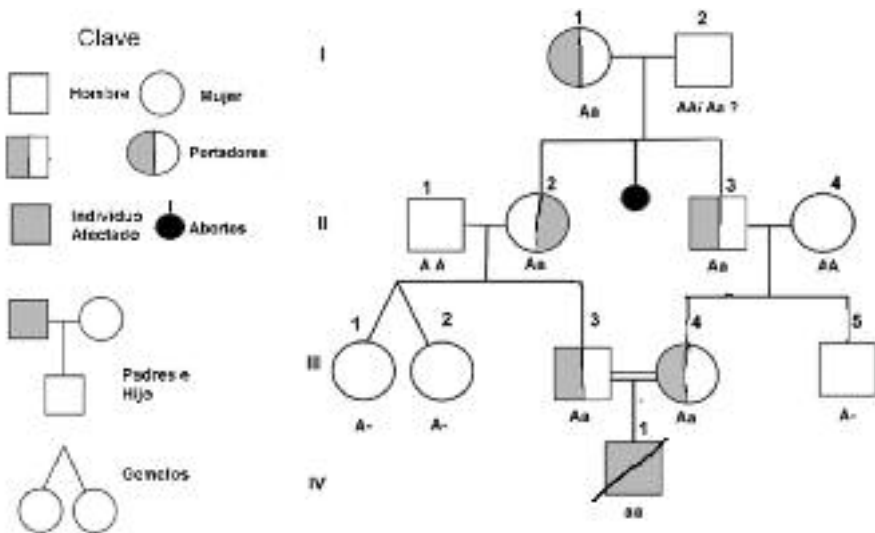
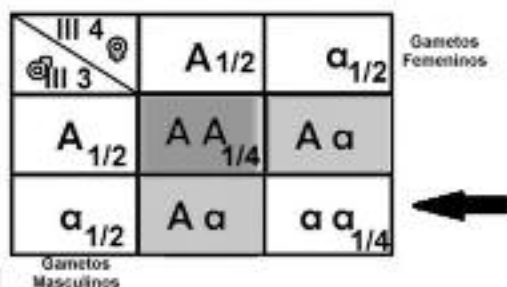


Figura 3. Pedigrí. A. principales convenciones empleadas en los pedigrís. Los números romanos indican las generaciones. Los números arábigos los miembros de la familias en cada generación. B. Pedigrí de un carácter recesivo letal I 1 y I 2, ancestros no emparentados, con dos hijos vivos, sin expresar la característica II 2 y II 3, y un aborto que puede estar relacionado con el carácter e implica que ambos son portadores del alelo letal a. Los individuos ajenos II 1 y II 4 tienen baja posibilidad de portar el alelo letal por no estar emparentados. III 3 y III 4 son primos hermano y tienen un hijo, con la característica que muere al nacer, VI 1, lo que los confirma como heterocigotos y portadores del gen, así como al menos uno de sus padres (I 1 y I 2).

muere al presentar múltiples fallas sistémicas. En el pedigrí se evidencia, que este es un carácter letal recesivo, transmitido en las distintas generaciones sin manifestarse (generaciones I y II) y solo aparece a consecuencia de una unión consanguínea (primos hermanos III 3 y III 4). En esta pareja, la probabilidad de que en un próximo embarazo, este evento se repita es de $\frac{1}{4}$, en tanto que $\frac{1}{2}$ de su descendencia serán portadores sanos del gen letal y solo $\frac{1}{4}$ para un descendiente homocigoto dominante - no portador de la característica (Fig. 4).



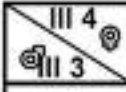
	A $\frac{1}{2}$	a $\frac{1}{2}$	Gametos Femeninos
A $\frac{1}{2}$	AA $\frac{1}{4}$	Aa	
a $\frac{1}{2}$	Aa	aa $\frac{1}{4}$	
Gametos Masculinos			

Figura 4. Cuadro de Punnett que muestra la probabilidad (flecha negra) de un descendiente homocigoto para un gen letal en un matrimonio consanguíneo entre heterocigotos que no muestran la característica (III 3 y III 4).

DIVISIÓN CELULAR, MITOSIS, MEIOSIS

En la interfase del ciclo celular (Bowen *et al.*, 1998) los cromosomas se encuentran descondensados y forman parte de la cromatina nuclear; es en esta conformación en donde los procesos de síntesis de proteínas y replicación de DNA son posibles (Fig. 5). La interfase está dividida en tres etapas bien caracterizadas, G1, con gran actividad en síntesis de proteínas, responsable del crecimiento celular, reposición de organelos y de la energía requerida en la célula postmitótica. Muchas células diferenciadas, son acíclicas, es decir que pierden la capacidad de dividirse, como neuronas, y permanecen indefinidamente en esta etapa hasta su muerte por apoptosis. En células cíclicas, que mantienen su capacidad de división, cuando adquieren el tamaño apropiado y reciben los estímulos adecuados (hormonas, nutrientes, factores de crecimiento), superan el punto de control en G1, e inician la síntesis de todos los componentes requeridos para iniciar la replicación de DNA, etapa que se conoce como fase S y conduce a la continuación del ciclo a través de G2, con la activación de la síntesis de toda la maquinaria mitótica. El ciclo se cierra con una nueva división celular (mitosis), en donde los cromosomas duplicados durante la fase S se segregan sus cromátidas hermanas, conservando el estado de ploidía original (Hartwell y Weinert, 2003).

La meiosis es un tipo de división celular especial, que solo se presenta en gónadas con el fin de producir gametos en organismos con reproducción sexual. En este proceso a partir de una célula con un número diploide de cromosomas ($2n$), se obtienen cuatro células hijas haploides (n), cada una con la mitad de cromosomas que la célula madre o inicial. Este tipo de división reduccional es necesaria para evitar que el número de cromosomas se vaya duplicando en cada generación (Hirano, 2000; Page y Hawley, 2003).

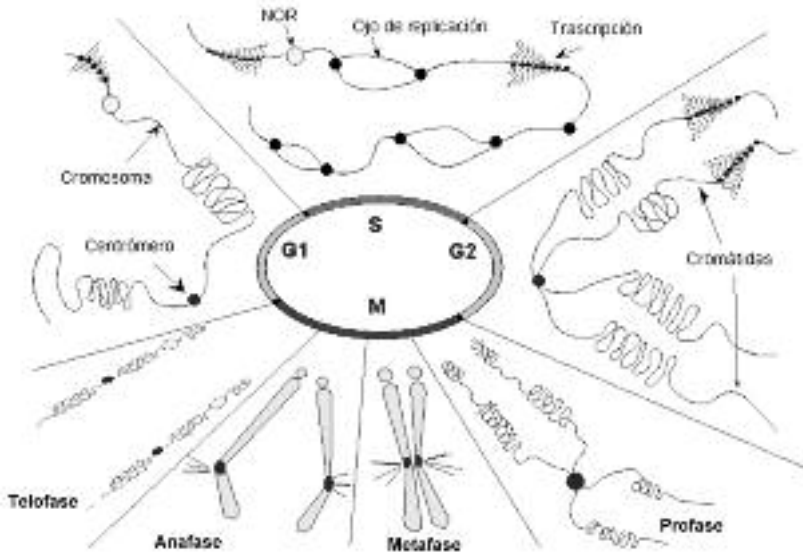


Figura 5. Esquema del comportamiento de la cromatina y cromosomas durante el ciclo celular.

En la meiosis, ocurren dos divisiones sucesivas, después de un periodo de replicación cromosómica: 1. En la primera división meiótica, la célula inicial o germinal diploide ($2n$) se replica ($4n$), recombina los cromosomas homólogos y se divide en dos células hijas segregando los homólogos recombinados. 2. En la segunda división meiótica, las dos células procedentes de la primera fase, son haploides con cromosomas duplicados y recombinados, se dividen originando cada una de ellas dos células hijas haploides (n). En síntesis, en la meiosis se observan tres procesos esenciales: la reducción del número de cromosomas, la segregación al azar de los homólogos y la recombinación genética por intercambio de segmentos cromosómicos, lo que lleva a que cada uno de los cuatro gametos producidos en una división meiótica sean todos diferentes. La reproducción sexual ocurre solo en eucariotes, y con la fertilización del óvulo por el espermatozoide se restaura el número diploide de cromosomas a $2n$, de los cuales $1n$ es de origen paterno y el otro n , materno. Errores en la meiosis y/o mitosis pueden originar cambios en el número cromosómico, ocasionando pérdidas o ganancias en ellos, lo que conduce a desbalances en la información genética que tiene efectos severos sobre el fenotipo, y que se describen como síndromes cromosómicos (Ford y Hamerton, 1956).

LOS CROMOSOMAS

Los cromosomas solo pueden ser estudiados en metafases mitóticas o meióticas, después de haber pasado por la fase de síntesis de DNA, por lo que se observan cromosomas con dos cromátidas. El centrómero divide el cromosoma en dos brazos: un brazo corto (brazo p) y un brazo largo (brazo q). De acuerdo con Levan *et al.*, 1964, el tamaño de los brazos del cromosoma es usado para la clasificación de los cromosomas en: metacéntricos (brazos cromosómicos iguales), submetacéntricos (diferencias significativas entre los dos brazos), acrocéntricos (brazo corto muy pequeño) y telocéntricos,

con centrómero terminal y sin brazos corto. Por convención, en los diagramas, el brazo que se coloca en la parte superior siempre es el corto (Fig. 6; ISCN, 1978)

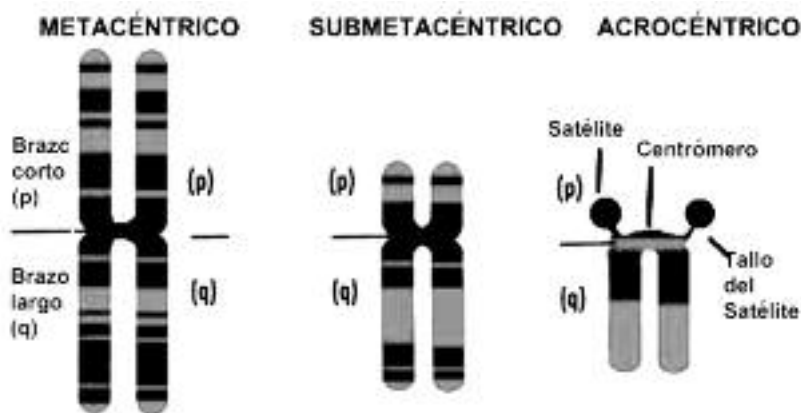


Figura 6. Clasificación de los cromosomas de acuerdo a la posición del centrómero de acuerdo con Levan *et al.*, 1964.

El complemento cromosómico en la especie humana es 46 cromosomas, 22 pares de autosomas y un par sexual, XY. En la figura 7A, se presenta un cariotipo normal femenino humano con bandas G, donde el grupo A está compuesto por tres pares de cromosomas metacéntricos (pares 1 y 3) y submetacéntricos (par 2); los del grupo B son submetacéntricos grandes (pares 4 y 5), los del grupo C son submetacéntricos (pares 6-12), en tanto que los grupos D (pares 13, 14 y 15) y G (pares 21 y 22) son cromosomas acrocéntricos. Los cromosomas sexuales son dismórficos, siendo X, un submetacéntrico de mayor tamaño que Y, las hembras presentan dos copias del cromosoma X, mientras que los varones tienen solo un cromosoma X. El cromosoma Y, es un cromosoma pequeño y acrocéntrico, como se muestra en el recuadro de la figura 7A (Archidiacono *et al.*, 1998; Ayling y Griffin, 2002).

El tamaño, número, morfología y patrón de bandas de los cromosomas es una característica propia de cada especie. Como se mostró, la especie humana tiene 46 cromosomas, con 22 pares de autosomas y un par sexual (Fig. 7A), en tanto que el gorila y el chimpancé poseen 48 cromosomas (23 pares de autosomas y un par sexual), un par más que el humano. Las diferencias entre estos cariotipos, ha sido atribuida a una fusión de dos pares acrocéntricos en primates, para constituir el cromosoma 2 de humanos (Fig 7B; Seuánez, 1979). Este rearrreglo que nos diferencia de nuestros ancestros, ha sido plenamente demostrado por la homología observada en las bandas cromosómicas, así como mediante técnicas moleculares de hibridización sobre cromosomas (ZooFISH) y de secuenciación de segmentos cromosómicos (Wienberg *et al.*, 1994; Chowdhary *et al.*, 1998).

ESTUDIOS CITOGENÉTICOS: APLICACIONES CLÍNICAS

Es conocido que entre 3 y 5% de los niños nacidos en una población y período dado, presentan una anomalía congénita, que puede ser detectada al nacimiento. Sin em-

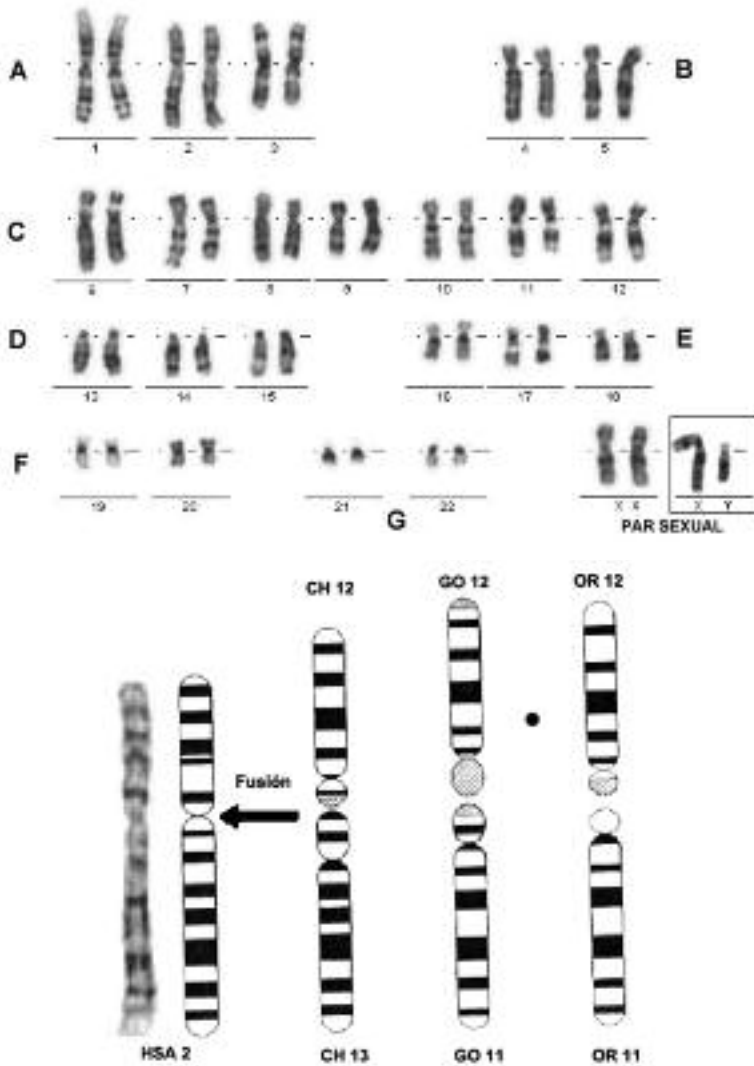


Figura 7. A) Cariotipo de una mujer, normal coloreado con bandas G. Las letras laterales (A-G) muestran los siete grupos de cromosomas en el cariotipo humano. A la derecha, está el par sexual, XX. En el recuadro a la derecha se muestra el par sexual para los machos, notar cromosoma Y, pequeño y acrocéntrico. B). Origen y formación del cromosoma 2 humano (H, cromosoma 2) en humanos a partir de la fusión robertsoniana de un par de acrocéntricos que se encuentran en Chimpacé (CH, cromosomas 13 y 12), Gorila (Go, cromosomas 11 y 12) y Orangután (OR, Cromosomas 11 y 12). (Adaptado de Mac Gregor, 1993, Figs. 2-7).

bargo, la fracción que se manifiesta en recién nacidos es pequeña, y después de un año de vida, su incidencia aumenta hasta 10%. La gran mayoría de embriones con anomalías cromosómicas (con cromosomas de más o de menos) no concluyen con embarazo o bien acaban en aborto; si consiguen evolucionar, lo cual ocurre en pocos casos, dan lu-

gar a un niño afectado de alguna patología. Los defectos cromosómicos tienen una cuota importante de responsabilidad en las muertes perinatales así como en otras patologías (Castro-Volio, 2004). Las anomalías cromosómicas son la principal causa de aborto y retraso mental en humanos. Pacientes que presentan retraso mental, rasgos dismórficos y otras características, son sugerentes de cromosomopatía. Por tanto, en ellos debe realizarse el cariotipo de alta resolución, mediante el cual se puede conocer si el paciente presenta una anomalía cromosómica numérica o estructural. La especie humana tolera mejor las trisomías que las monosomías, no obstante, solo sobreviven parte de aquellos individuos que tienen trisomías de los cromosomas más pequeños (trisomías 21, 18, 13). Las aneuploidías por no disyunción son más frecuentes en los cromosomas sexuales que en los autosomas (Galán Gómez, 2002).

Dentro de las cromosomopatías, se distinguen dos grandes grupos: 1. anomalías constitucionales, con las que la persona nace; 2. anomalías adquiridas, que surgen en algún momento después del nacimiento. Las primeras, se asocian a malformaciones congénitas de todo tipo, y además el retardo mental es invariable, excepto para las aberraciones que afectan el número de cromosomas sexuales, en las cuales predominan los problemas de infertilidad. Entre las anomalías constitucionales numéricas, el defecto cromosómico más frecuente en recién nacidos es la trisomía 21 que origina el síndrome de Down; este se presenta en 1:600 a 1:800 bebés. El síndrome de Down es la causa más común de retardo mental severo.

Cabe resaltar, que las monosomías autosómicas ($2n-1$, ausencia de uno de los cromosomas) solo han sido observadas en abortos del primer trimestre, por lo que se consideran no viables. Se han planteado dos hipótesis que tratan de explicar esta baja viabilidad en monosómicos. La primera, sostiene que esta condición permitiría la expresión de alelos letales recesivos presentes en copia única en los monosómicos, que pasarían inadvertidos en heterocigotos, que llevan un alelo normal en uno de los cromosomas. La segunda sostiene que, es la necesidad de tener dosis de productos génicos equilibrados, que están descompensadas en los monosómicos. Sin embargo, algunas monosomías parciales son viables, entre ellas la que se presenta en mayor frecuencia en nacidos vivos, es la pérdida de un corto fragmento del brazo corto del cromosoma cinco ($5p-$), que origina una gama particular de anomalías que se conoce como síndrome de maullido de gato, caracterizado por generar retardo mental severo, microcefalia y un aspecto facial específico con notable hipertelorismo (Thompson y Thompson, 1979).

La translocación es una anomalía estructural que consiste en la transferencia de parte de un cromosoma a otro no homólogo. Casi siempre, son recíprocas, y en el caso de translocaciones robertsonianas (también conocidas como fusiones céntricas), es común no tener efectos fenotípicos notables, por lo que pueden pasar inadvertidas en los portadores, y solo ser detectadas por el nacimiento de hijos con complementos no balanceados, que presentan múltiples anomalías. Son frecuentes entre los cromosomas acrocéntricos (grupos D y G) y pueden dar lugar a la formación de gametos desequilibrados y por ello implican riesgo de descendencia anormal. Por lo tanto, los portadores de translocaciones balanceadas, sin signos ni síntomas específicos, son diagnosticados en la consulta genética por presentar problemas de infertilidad, abortos recurrentes o por el nacimiento de un hijo multimalformado (Ciccone *et al.*, 2005). En la figura 8 se presenta el caso de un niño con trisomía 13 por translocación, hijo de un portador de

la translocación balanceada. Las cromosomopatías constitucionales de cualquier tipo afectan a 1:156 recién nacidos, y 1:500 personas son portadoras sanas de algún tipo de rearreglo cromosómico balanceado, que no le ocasiona problema a ella misma, pero sí puede ser grave para su descendencia (Castro-Volio, 2004).

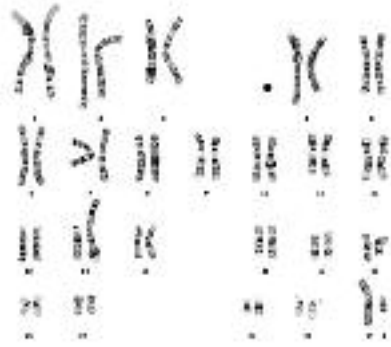


Figura 8. Cariotipo de un paciente con trisomía 13 (síndrome de Patau) por translocación robertsoniana de un cromosoma 13 a los brazos cortos del cromosoma 14, resultando un cromosoma 14 casi metacéntrico en donde los brazos cortos (p) son el cromosoma 13 adicional: 46 XY t(14;13). Fotografía cortesía del laboratorio de citogenética, Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia, 2009.

Sin embargo, se han reportado casos de translocaciones recíprocas, aparentemente balanceadas, bajo la óptica de la citogenética clásica, en individuos con anomalías fenotípicas y retardo mental. En estos casos, se debe sospechar la presencia de rearreglos complejos desbalanceados, que con citogenética clásica no pueden ser detectados, por lo que estudios de citogenética molecular deben ser recomendados (Ciccone *et al.*, 2005). Por otro lado, las anomalías cromosómicas adquiridas son causa de gran variedad de cánceres. El análisis citogenético de células tumorales ha revelado la presencia de alteraciones cromosómicas clonales en más de 30.000 neoplasias humanas. Hoy sabemos que la presencia de determinadas alteraciones cromosómicas aporta información importante con valor diagnóstico y pronóstico en neoplasias hematológicas y tumores sólidos (Patel, 2000; Rowley, 2000). Desde la observación de Nowell y Hungerford, 1960, en pacientes con leucemia mieloide crónica de un pequeño cromosoma al que denominó *Philadelphia* (Ph), originado por una translocación entre los cromosoma 9 y 22, asociando su presencia a un pronóstico muy desfavorable en pacientes diagnosticados con leucemia aguda linfoblástica. Esta observación llevaría a una actitud terapéutica distinta y más agresiva, que si se detectara en el mismo diagnóstico una alteración cromosómica de buen pronóstico, como por ejemplo un cariotipo hiperdiploide de más de 50 cromosomas (Calasanz, 2001).

El análisis citogenético convencional para tumores sólidos presenta un alto nivel de complejidad, fundamentalmente por aspectos metodológicos que han frenado la incorporación de este estudio en la rutina diagnóstica como complemento al diagnóstico anatómopatológico (Galán Gómez, 2002). Entre los problemas que se presentan en el procesamiento de muestras de tumor, cabe destacar la baja viabilidad celular debido a necrosis

de la muestra, necesidad de disgregación enzimática del tejido, contaminación microbiana, contaminación con células normales y baja calidad y cantidad de metafases analizables entre otros. Adicionalmente, debido al tiempo de manifestación clínica de la mayor parte de tumores, es común encontrar en ellos la ocurrencia de alteraciones cromosómicas muy complejas y variables, con la presencia de varios clones, lo que hace difícil determinar cambios y la secuencia de éstos para definir la línea principal y las derivadas.

Indudablemente las técnicas de citogenética molecular e interfásica, son una herramienta fundamental para definir rearrreglos complejos adquiridos en la evolución de líneas tumorales. La lista completa de alteraciones cromosómicas y genes implicados en leucemias y neoplasias puede ser consultada en (NCBI, 2010: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cancerchromosomes>). Actualmente es muy importante la colaboración entre citogenética y biología molecular, con el fin de encontrar un mayor número de regiones genómicas que puedan ser candidatas de tener actividad oncogénica (Espinete *et al.*, 2011).

ESTUDIOS CITOGÉNÉTICOS: APLICACIONES EVOLUTIVAS

Desde que Michael White escribió en 1978 su libro *Modes of Speciation* (White, 1978), una amplia gama de trabajos se han publicado para entender este proceso. Dentro de estas contribuciones, las de mayor valor en aras de comprender los mecanismos genéticos en la especiación, provienen fundamentalmente de dos áreas. En primer lugar, los estudios sobre los efectos en la fertilidad y viabilidad de los rearrreglos cromosómicos estructurales en híbridos interraciales y/o interespecíficos, que han proveído evidencias directas del papel de las reorganizaciones cromosómicas en la especiación. En segundo lugar, están los estudios en áreas como bioquímica o técnicas moleculares recientemente desarrolladas para abordar problemas de especiación en plantas o animales (King, 1993).

Hay varios ejemplos que muestran que los rearrreglos cromosómicos están asociados a especiación. Se mencionó anteriormente la fusión cromosómica que origina el cromosoma 2 en humanos. Bowers *et al.*, 2003, asoció este rearrreglo con la adquisición del bipedismo característico de Homínidos, que están regulados por genes homeóticos (HOXD9-D10), localizados en el cromosoma dos, lo que sugiere una fuerte presión de selección en los portadores de la fusión y una rápida separación (especiación) de las poblaciones. Adicionalmente, en varios grupos de primates del nuevo mundo particularmente en los géneros *Aotus* y *Callicebus*, se ha demostrado que cambios drásticos en los números cromosómicos entre las especies del género, han sido originados por múltiples rearrreglos cromosómicos, que modifican los números cromosómicos entre las especies, ha acompañado los procesos de especiación, acompañados de una baja diferenciación morfológica, por lo que el estudio cromosómico constituye una herramienta indispensable para la clasificación de estos organismos (Bueno *et al.*, 2004; Bueno *et al.*, 2006; Defler y Bueno, 2003; Defler y Bueno, 2007; Defler *et al.*, 2010).

La familia Equidae (caballos) es notable por la rápida tasa de evolución cromosómica (Bush *et al.*, 1977). El caballo doméstico tiene 64 cromosomas, en tanto que *Equus ferus przewalskii* (una especie de caballo mongoliano, hoy en peligro de extinción) tiene 66 cromosomas. La diferencia entre estos dos cariotipos es una simple fusión-fisión de dos cromosomas acrocéntricos del caballo mongoliano (cromosomas 23 y 24) para formar el cromosoma cinco de los caballos domésticos. Es común encontrar híbridos entre las diferentes especies de equinos, pero todos los híbridos son estériles, siendo el

ejemplo más conocido las mulas, producto del cruce entre un caballo y una burra (*Equus asinus*). Adicionalmente según Yang *et al.*, 2003, se pueden documentar numerosas translocaciones robertsonianas, fusiones repetidas (en tándem) y varias inversiones al comparar el cariotipo de caballos con el de zebras (*Equus burchelli*, $2n=44$).

O'Brien *et al.*, 2006, reportan que en ciervos de la india (género *Muntiacus*) es posible encontrar especies con 44 autosomas acrocéntricos y un par sexual (*M. reevesi*), y otras especies del género con números muy reducidos $2n=6$ en hembras y $2n=7$ en machos con una translocación del cromosoma Y a un autosoma (*M. muntjak*). Adicionalmente, aun en los mismos grupos, géneros con muy baja tasa de rearrreglos cromosómicos manteniendo así una relativa homogeneidad en los complementos, pero con buena diferenciación morfológica y ecológica en su especiación, lo que ha llevado a que exista una amplia controversia, aun no completamente resuelta en cuanto al papel que tienen los rearrreglos en los procesos de especiación (Reig, 1989; Rieseberg, 2001; Forsdyke, 2004).

Desde los años 90 se han desarrollado técnicas que unen citogenética clásica con nuevas tecnologías de genómica comparativa entre las cuales se encuentra el pintado cromosómico, que se basa en hibridación *in situ* fluorescente con sondas de cromosomas de una especie determinada sobre preparaciones cromosómicas de otra especie diferente. Por Zoo-FISH, se entiende la aplicación de sondas de pintado cromosómico de una especie, que en muchos casos la más empleada es humana, sobre metafases de otras especies, con el fin de establecer las reorganizaciones intercromosómicas e intra-cromosómicas ocurridas en la evolución (Ruiz, 2003). Los análisis comparativos por pintado cromosómico, detectan homologías a nivel molecular y permiten la comparación rápida y eficiente entre muchas especies (Graphodatsky, 2007). Se han realizado comparaciones por hibridación Zoo-FISH en diferentes especies, de primates, encontrando, por ejemplo homología completa entre humanos y micos capuchinos (Platyrrhini) en las regiones eucromáticas (Richard *et al.*, 1996).

Los ejemplos anteriores, muestran como el barajamiento de información genética, originada por cambios de posición de segmentos cromosómicos con los rearrreglos cromosómicos (inversiones, translocaciones, fusiones céntricas), han sido un agente importante en la diversificación de especies, como lo evidencia la comparación del cariotipo humano con el de sus ancestros primates y/o estudios filogenéticos en diferentes grupos (White, 1969; White, 1975; Carbone *et al.*, 2002; Wienberg, 2004).

El genoma de aproximadamente 150 especies de mamíferos ha sido estudiado mediante pintado cromosómico, para lo que se han empleado sondas humanas, identificando en estas especies por lo menos 70 cromosomas positivos para las sondas humanas. El pintado cromosómico permite detectar homologías a nivel molecular, por lo que es un método rápido y eficiente para la comparación interespecífica. Lo anterior ha permitido acumular información suficiente para realizar una discusión comprensiva de cómo ha ocurrido la organización y evolución de los genomas de mamíferos, confirmando las observaciones realizadas en estudios anteriores con bandas cromosómicas, en los que se encontraron segmentos cromosómicos conservados por varios millones de años, como el cromosoma X, ancestral en todos los mamíferos (Graphodatsky, 2007).

Sin duda el análisis genómico comparativo en mamíferos es complejo, mostrando importantes diferencias en los patrones de cambio entre diferentes especies, por lo que se espera que, los análisis genómicos comparativos sean clave para dilucidar la

organización de los genomas, la distribución de los genes en los cromosomas y la distribución y composición de los sitios de ruptura y las fuerzas que dirigen la evolución de los genomas (Murphy *et al.*, 2001)

NUEVAS HERRAMIENTAS EN ESTUDIOS CROMOSÓMICOS

Esta era posgenómica, también ha incidido en las herramientas citogenéticas para el estudio y la evaluación de cromosomas, fundamentalmente con la integración de herramientas derivadas de los avances en genética molecular, que sin duda, han incrementado la resolución de este tipo de estudios, hasta el punto en que se ha planteado si la citogenética molecular puede remplazar la citogenética clásica y su abordaje clásico de evaluación de bandas (Salman *et al.*, 2004). Desde la década de 1980 a 1990 se desarrolló la citogenética molecular, que se considera una revolución al descubrir alteraciones submicroscópicas, con sondas específicas de genes, segmentos cromosómicos, regiones centrómeras o telómeras cromosoma específico, que detectan fusiones de regiones cromosómicas particulares comprometidas en translocaciones, que permiten resolver preguntas, incluso a veces en ausencia de metafases, observando las señales en núcleos interfásicos por lo que se ha denominado citogenética interfásica (Gray, 1992).

En los laboratorios de citogenética hoy en día son fundamentales las técnicas de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) e hibridación genómica comparativa (CGH), que permiten identificar anomalías cromosómicas muy pequeñas no observables con otras metodologías clásicas.

Adicionalmente, la técnica de múltiple FISH (M-FISH) o hibridación *in situ* con fluorescencia de todos los cromosomas, se está utilizando en el mundo en la última década, lo que ha causado revuelo por la introducción de colores en la citogenética tradicionalmente gris (Castillo *et al.*, 2002). Sin duda esta técnica facilita de forma importante la resolución de rearrreglos complejos, de forma clara y simple e inequívoca, pero aún está un poco fuera del alcance del común de laboratorios de citogenética, principalmente por costo de la prueba y, porque requiere la actualización de los equipos, en materia de filtros requeridos para poder identificar cada uno de los homólogos. Se necesitan cinco fluorocromos (con capacidad combinatorial de 31) para distinguir los 24 cromosomas, por hibridación de juegos de sondas de DNA cromosoma-específicas (Castillo *et al.*, 2002).

El desarrollo de técnicas de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) ha supuesto un enorme avance en la citogenética clínica, particularmente en cáncer, especialmente en la evaluación de tumores sólidos. En la actualidad la técnica FISH tiene numerosas variantes tecnológicas como hibridación genómica comparada (CGH), cariotipo espectral (SKY-FISH) o multiplex FISH (M-FISH), entre otras. Todas ellas, y otras más, constituyen una nueva disciplina denominada citogenética molecular y proporcionan nuevos métodos, más precisos, de detección de alteraciones cromosómicas en células tumorales (Calasanz, 2001).

CONCLUSIONES

El estudio de los cromosomas ha contribuido a la comprensión de la herencia de los genes, mostrando claramente como se presenta la segregación de éstos en la meiosis.

Estudios citogenéticos comparativos han mostrado que numerosos rearrreglos cromosómicos han ocurrido en los procesos de diversificación evolutiva de los diferentes grupos y estos pueden ser evidenciados mediante técnicas de citogenética convencional y/o molecular (ZooFISH- hibridización genómica comparativa).

En humanos, los estudios cromosómicos permiten diagnosticar un conjunto de síndromes genéticos, originados por errores mitóticos o meióticos (en la disyunción cromosómica), que originan individuos portadores de fórmulas cromosómicas anómalas en estructura y número, que en general originan severas fallas en el crecimiento, desarrollo mental o con fallas funcionales en diferentes órganos, por exceso de genes (trisomía) o déficit de información cuando hay monosomías totales (no viables) o parciales, como es el caso del síndrome de maullido de gato (5p-).

La exposición a agentes clastogénicos y mutágenos ambientales puede originar anomalías cromosómicas adquiridas, características de numerosos cánceres. El diagnóstico citogenético de los distintos clones celulares presentes en neoplasias, es una herramienta importante en el diagnóstico, pronóstico, y ha permitido identificar subgrupos clínicos asociados a cambios cromosómicos específicos particularmente en hemopatías malignas. Desde el punto de vista clínico, se puede ver claramente que la utilización de las técnicas citogenéticas puede tener ventajas e inconvenientes (resolución) en los análisis genéticos, contribuyendo con los diagnósticos y pronósticos de varias neoplasias. Puede concluirse que actualmente las numerosas técnicas citogenéticas son complementarias y nunca excluyentes de otros análisis moleculares.

Indudablemente, los avances recientes en el campo de la genética molecular, constituyen un complemento importante para citogenetistas, ya que enriquecen la información que aporta el estudio citogenético. Por otro lado, el desarrollo de técnicas moleculares ha introducido una nueva dimensión en el estudio y comprensión del papel de los cambios cromosómicos, tanto en estudios evolutivos y comparativos de especies, como en la génesis de tumores, por lo que en un futuro próximo citogenetistas y genetistas moleculares deberán trabajar coordinados para aportar una mayor información sobre el origen y desarrollo de los diferentes rearrreglos.

AGRADECIMIENTOS

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

BIBLIOGRAFÍA

- ARCHIDIACONO N, STORLAZZI CT, SPALLUTO C, RICCO AS, MARZELLA R, ROCCHI M. Evolution of Chromosome Y in Primates. *Chromosoma*. 1998;107:241-246.
- AYLING LJ, GRIFFIN DK. The Evolution of Sex Chromosomes. *Cytogenet Genome Res*. 2002;99:124-140.
- BARBER JCK. Directly Transmitted Unbalanced Chromosome Abnormalities and Euchromatic Variants. *J Med Genet*. 2005;42:609-629.
- BOWEN ID, BOWEN SM, JONES AH. The Cell Cycle. En: *Mitosis and Apoptosis: matters of life and death*. (Eds. Bowen ID, Bowen SM). London, New York: Chapman & Hall; 1998. p. 28-59.

BOWERS EJ, NAVARRO A, RIEESEBERG L, LIVINGSTONE K, BARTON NH. Chromosomal Speciation. *Science*. 2003;301:764-768.

BUENO ML, RAMIREZ-ORJUELA C, LEBOVICI M, TORRES OM. Información cariológica del género *Callicebus* en Colombia. *Rev Acad Colomb Cienc*. 2006;30:109-115.

BUENO ML, TORRES OM, LEBOVICI M, RAMIREZ C, BERNAL J. Valoración cariológica de animales silvestres decomisados: Una herramienta más para el conocimiento, manejo y conservación de especies sometidas a comercio. *Conservación Ex situ*; 2004;1:12-20.

BUSH GL, CASE SM, WILSON AC, PATTON JL. Rapid Speciation and Chromosomal Evolution in Mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74:3942-3946.

CALASANZ MJ. Revisión de técnicas de citogenética convencional y molecular y su implicación en el diagnóstico y pronóstico del cáncer. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 2001;24;S1:17-30.

CARBONE L, VENTURA M, TEMPESTA S, ROCCHI M, ARCHIDIACONO N. Evolutionary History of Chromosome 10 In Primates. *Chromosoma*. 2002;111:267-272.

CASTILLO TAUCHER S, FUENTES SAM, PAULO M A, PARDO VA. Múltiple FISH y múltiple BAND: Técnicas de citogenética molecular en cinco casos. *Rev Méd Chile* [online]. 2002;130,(5): 511-518. Disponible Enero 2010 en: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872002000500005&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0034-9887. doi: 10.4067/S0034-98872002000500005

CASTRO VOLIO I. Pasado, Presente y Futuro de la Citogenética En Costa Rica. *Rev Biol Trop*. 2004;52:537-544.

CHARLESWORTH D, CHARLESWORTH B. Inbreeding Depression and its Evolutionary Consequences. *Annu Rev Ecol Syst*. 1987;18:237-268.

CHOWDHARY BP, RAUDSEPP T, FRÖNICKE L, SCHERTHAN H. Emerging Patterns of Comparative Genome Organization in Some Mammalian Species as Revealed by Zoo-FISH. *Genome Res*. 1998;8:577-589.

CICCONE R, GIORDA R, GREGATO G, GUERRINI R, GIGLIO S, CARROZZO R, *et al*. Reciprocal Translocations: A Trap for Cytogenetists? *Hum Genet*. 2005;117:571-582.

DEFLER TR, BUENO ML, GARCIA J. *Callicebus caquetensis*: A New and Critically Endangered Primate From Southern Caquetá, Colombia. *Primate Conservation* 2010(25): Published electronically prior to print publication 12 August 2010.

DEFLER TR, BUENO ML. *Aotus* Diversity and the Species Problem. *Primate Conservation*. 2007;22:55-70.

DEFLER TR, BUENO ML. Karyological Guidelines for *Aotus* Taxonomy. *Am J Primatol*. 2003;60:134-135.

ESPINET B, SALIDO M, SOLÉ F. Técnicas de citogenética molecular y sus aplicaciones. Tomado web, Enero, 2011. http://www.cekm.unlugar.com/tec_cit_mol.pdf.

FORSDYKE DR. Chromosomal speciation: A reply. *J Theor Biol*. 2004;(230):89-196.

FORD CE, HAMERTON JL. The Human Chromosomes of Man. *Nature*. 1956;178:1023.

GALÁN GÓMEZ E. Aplicaciones del Laboratorio de Citogenética a la Clínica. *Pediatría Integral*. 2002;16:820-830.

GRAPHODATSKY AS. Comparative Chromosomics. *Mol Biol*. 2007;41:361-375.

GRAY JW. Molecular Cytogenetics: Diagnostic and Prognostic Assessment. *Curr Opin Biotech*. 1992;3:623-631.

HARTWELL LH, WEINERT TA. Checkpoint: Controls that Ensure the Order of Cell Cycle Events. *Science*. 2003;(246):629-635.

HIRANO T. Chromosome Cohesion, Condensation and Separation. *Annu Rev Biochem*. 2000;69:15-144.

ISCN An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Birth Defect: Original Article Series, 14(8) (The National Foundation, New York, 1978); *Cytogenetic Cell Genet*. 1978;21:309-404.

JOHANNSEN FA. La Théorie de la Chiasmotypie Nouvelle Interprétation de Cinèses de Maturation. *La Cellule*. 1909;25:387-406.

KING M. Species Evolution: The Role of Chromosome Change. Cambridge: Cambridge University Press; 1993.

LEVAN A, FREGA K, SANDBERG AA. Nomenclature For Centromeric Position On Chromosomes. *Hereditas*. 1964;52:201-220.

MENDEL G. Versuche über Pflanzen hybriden. *Verhandlungen des Naturforschenden Vereines im Brünn*. 1865;4:3-47.

MURPHY WJ, STANYON R, O BRIEN SJ. Evolution of mammalian genome organization inferred from comparative gene mapping. *Genome Biol*. 2001;2(6):1-8

NCBI. National Center for Biotechnology Information. 2010 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/genlist.cgi?taxid=2759&type=4&name=EukaryotaeOrganelles>

NOWELL PC, HUNGERFORD DA. A Minute Chromosome In Human Granulocytic Leukemia. *Science*. 1960;132:1497.

O'BRIEN SJ, MENNINGER JC, NASH WG. Atlas of Mamalian Chromosomes. New York: Wiley Liss; 2006.

O'BRIEN SJ, MENNINGER JC, NASH WG. Ed. Atlas of Mammalian Chromosomes. Wiley & Sons, INC., Hoboken NJ; 2006. p. 614.

PAGE SL, HAWLEY RS. Chromosome Choreography: the Meiotic Ballet. *Science*. 2003;301:785-798.

PATEL AS, HAWKINS AL, GRIFFIN CA. Cytogenetics and Cancer. *Curr Opin Oncol*. 2000;12:62-67.

PIRAS FM, NERGADZE SG, POLETO V, CERUTTI F, RYDER OA, *et al*. Phylogeny of horse chromosome 5q in the genus *Equus* and centromere repositioning. *Cytogenet Genome Res*. 2009;126:165-172

REIG O. Karyotypic Repatterning as One Triggering Factor in Case of Explosive Speciation. In: *Evolutionary Biology of Transient Unstable Population*. (Ed. Fontdevila A). Berlin: Springer-Verlag; 1989. p. 246-289.

RICHARD F, LOMBARD M, DUTRILLAUX B. ZOO-FISH Suggests a Complete Homology between Human and Capuchin Monkey (*Platyrrhini*) Euchromatin. *Genomics*. 1996;36:417-423.

RIESEBERG LH. Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends Ecol Evol*. 2001;16:351-357

ROWLEY JD. Cytogenetic Analysis in Leukemia and Lymphoma: An Introduction. *Semin Hematol*. 2000;37:315-319.

RUIZ A. Implicaciones de los lugares frágiles y las secuencias teloméricas intersticiales en la evolución cromosómica de los primates. 2003. Tesis Doctorales en Red: http://www.tdr.cesca.es/TESIS_UAB/AVAILABLE/TDX-0621104-192757/arhm1de4.pdf.

SALMAN M, JHANWAR SC, OSTRER H. Will The New Cytogenetics Replace Old Cytogenetics? Clin Genet. 2004;66:265-275.

SEUÁNEZ HN. The Phylogeny of Human Chromosome. New York: Springer-Verlag, Heidelberg; 1979.

THOMPSON JS; THOMPSON MW. Genética Médica. 2.º Barcelona: Ed. Salvat Editores, S.A.; 1979.

WHITE MJD. Chromosomal Rearrangements and Speciation in Animals. Annu Rev Genet. 1969;3:75-98.

WHITE MJD. Chromosomal Repatterning: Regularities and Restrictions. Genetics. 1975;79:63-72.

WHITE MJD. Modes of Speciation. W. H. Freeman and Company; San Francisco; 1978

WIENBERG J. The Evolution of Eutherian Chromosomes. Curr Opin Genet Dev. 2004;14:657-666.

WIENBERG J, JAUCH A, LÜDECKE HJ, SENGEL G, HORSTHEMKE B, CLAUSSEN U, CREMER T, ARNOLD N, LENGAUER C. The Origin of Human Chromosome 2 Analyzed by Comparative Chromosome Mapping with a DNA Microlibrary. Chromosome Res. 1994;2(5):405-410.

WILLIS, JH. The Role of Genes of Large Effect on Inbreeding Depression in *Mimulus guttatus*. Evolution. 1999;53:1678-1691.

YANG F, FU B, O'BRIEN PCM, RYDERD OA, FERGUSON-SMITH MA. Karyotypic Relationships of Horses and Zebras: Results of Cross-Species Chromosome Painting. Cytogenet Genome Res. 2003;102:235-243.