

Los orígenes de la genética y la citogenética humana clínica en Uruguay

Máximo E. Drets^{1*}

Palabras clave

Trisomía 21, citómetro, historia, medicina.

Title

The origins of genetic and cytogenetic human clinics in Uruguay.

Key Words

Trisomy 21, cytometer, history, medicine.

Introducción

Los investigadores Ricardo Benavente del Departamento de Biología Celular y Desarrollo del Biocentro de la Universidad de Würzburg (Alemania) y Gustavo Folle del Departamento de Genética del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), considerando nuestra extensa formación en Citogenética Animal y Vegetal obtenida a través de décadas de enseñanzas recibidas del eminente citogenetista de Uruguay el Profesor Francisco A. Sáez como así los perfeccionamientos metodológicos en citogenética humana desarrollados por el Profesor Jérôme Lejeune de París y nuestro gran interés en contribuir en el desarrollo de la Citogenética y la Genética Humana Clínicas, nos sugirieron redactar un corto manuscrito sobre los orígenes de estas disciplinas en el Uruguay destinado a su publicación en los Anales de la Facultad de Medicina. Por tanto, la presente contribución es un breve relato de dicho proceso de aportes científicos y docentes iniciales realizados con algunos distinguidos profesores de nuestra Facultad interesados en la patología hereditaria humana como así los esfuerzos docentes realizados para difundir los métodos y diagnósticos cariológicos destinados a los jóvenes en formación en estas áreas como así a los médicos interesados en los problemas hereditarios del ser humano.

La historia de la citogenética humana en varios actos

En las primeras décadas del siglo pasado ocurrieron extraordinarios avances con respecto al conocimiento de los cromosomas humanos. Clásicamente, las técnicas de inclusión en

parafina de las muestras biológicas seguida de cortes tridimensionales con el micrótomo hacían muy difícil determinar el número de cromosomas del ser humano. Para caracterizar los cromosomas en un objeto tridimensional como la célula, el uso continuo del enfoque micrométrico del

1. Investigador Emérito del Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas, Universidad de la República y del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Uruguay. Miembro de la Academia de Ciencias de América Latina.

* Contacto: Máximo E. Drets. E-mail: gfolle@iibce.edu.uy

microscopio era fundamental para su correcta individualización. Por esa razón, Hans von Winiwarter confesó en su trabajo de 1926 que el número de 47 cromosomas que él proponía para el ser humano era dudoso por las dificultades tecnológicas de la época [1-2] (Figura 1).

El investigador estadounidense Clarence McClung (1902) creyó observar en cortes de tejidos de testículos de insectos un pequeño cromosoma no advertido en células humanas por Winiwarter al cual denominó “accesorio” [3]. Basado en estos estudios Theophilus Painter describió en 1921 la presencia de un pequeño cromosoma en marsupiales que denominó “Y” y que más tarde (1923) observó en células humanas. Con este hallazgo la fórmula cromosómica del ser humano cambió de 47 cromosomas, aceptada sin discusión durante muchas décadas, a 48 cromosomas [4].

En 1956 Jo Hin Tjio y Albert Levan investigaron, en Suecia, cariotipos obtenidos de cultivos de tejido embrionario de pulmón humano empleando todos los avances tecnológicos disponibles en citología, a saber: el perfeccionamiento de los cultivos de células, el choque hipotónico descubierto por T. C. Hsu para extender y separar todos los cromosomas humanos [5] en un único plano, el empleo del colorante Giemsa y la técnica fotográfica a nivel microscópico.

Con esta batería tecnológica ellos determinaron, en sus recuentos cromosómicos, que todas las metafases embrionarias estudiadas sólo portaban 46 cromosomas pero dado el prestigio de Winiwarter ellos finalizaron humildemente su histórica publicación confesando que “en su material era difícil evitar la conclusión que sus hallazgos eran la explicación más natural de sus observaciones por lo menos en las células humanas embrionarias pulmonares extraídas de fetos abortados” En otras palabras: ¡no se atrevieron a generalizar sus observaciones! [6] (Figuras 2 y 3).



Figura 1. Hans von Winiwarter: El ser humano ¡47 cromosomas!

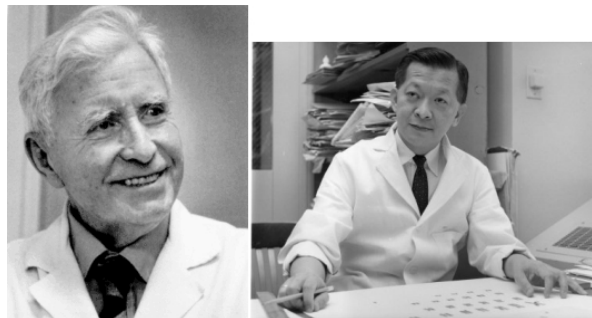


Figura 2. Albert Levan y Jo Hin Tjio, descubridores del número correcto de cromosomas del ser humano normal (46 cromosomas).

4

JOE HIN TJIO AND ALBERT LEVAN

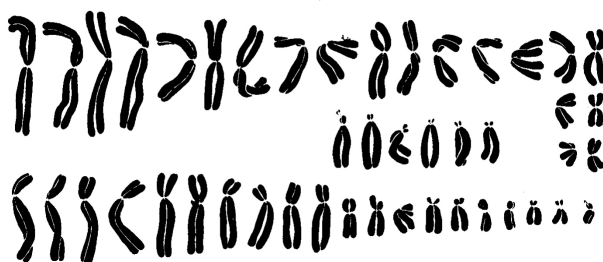


Figura 3. Primer cariotipo humano de 46 cromosomas realizado por Tjio y Levan en 1956.

El fundador de la citogenética humana moderna: Jérôme Lejeune

Jérôme Lejeune nació en París en 1926 [7-13]. En los comienzos del año 1950, el recién recibido médico colabora con el Profesor Raymond Turpin inicialmente en el Hôpital Saint Louis y luego en el Hôpital Trousseau quien le sugiere dedicarse a investigar las causas del síndrome de Down. A principios de 1953 ambos investigadores demostraron que existía un vínculo entre las características de estos pacientes con los pliegues de sus manos que denominaron dermatoglifos. La estructura de estos pliegues, siendo el principal denominado pliegue simiesco pues se observa en los primates, persiste a lo largo de toda la vida de los individuos y se origina durante los estadios más tempranos del desarrollo embrionario. Lejeune y Turpin, estudiando las manos de los niños con síndrome de Down concluyeron que las anomalías dermatoglíficas surgían durante el desarrollo embrionario. Después de realizar numerosas observaciones Lejeune pensó que dichas anomalías pudieran resultar de un accidente cromosómico.

Lejeune publicó en 1958 a los 32 años de edad su descubrimiento sobre la causa del síndrome de Down, la trisomía 21. Este hallazgo le valió ser galardonado con el prestigioso premio de la Fundación “Joseph P. Kennedy, Jr.” en 1962 el cual recibió de manos del propio Presidente John Fitzgerald Kennedy en la Casa Blanca (Figura 4).

En ese mismo año, fue designado como experto en Genética Humana por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y en 1964 fue nombrado Director del Centro Nacional de Investigaciones Científicas de Francia (CNRS). En el mismo año se crea para él, en la Facultad de Medicina de París, la primera Cátedra de Genética Fundamental. Este fue un hecho completamente inusual en Francia debido a que le crearon la Cátedra de Genética sin concurso o demostración de antecedentes (Figura 5). Tal era el prestigio académico logrado por Lejeune en aquella época [9]. En 1969 a Lejeune le fue otorgado el Premio “William

Allan Memorial Award” por la American Society of Human Genetics que es, incluso hoy día, el máximo honor concedido a nivel mundial en el área de la genética.

El descubrimiento de la trisomía 21

En 1956 retorna a París la Dra. Marthe Gautier quien había realizado una estadía de perfeccionamiento en la Universidad de Harvard (EEUU) sobre cultivos celulares. Turpin y Lejeune incorporan a Gautier a sus investigaciones sobre los niños con síndrome de Down empleando las nuevas técnicas de cultivo celular.

Con el fin de obtener el material biológico de los pacientes para realizar los cultivos celulares de



Figura 4. El Prof. Lejeune recibiendo el Premio de la Fundación “Joseph P. Kennedy, Jr.” de manos del Presidente John Fitzgerald Kennedy.



Figura 5. El Prof. Lejeune dictando su discurso durante el Acto de inauguración de la Cátedra de Genética Fundamental [9].

acuerdo con las técnicas aprendidas por Gautier, Lejeune empleó una pinza de puntas recurvadas que le permitía realizar un muy pequeño corte biopsico en la espalda del paciente con el consentimiento de los padres. Estas muestras fueron cortadas en pequeños fragmentos denominados explantos y mediante una pipeta Pasteur con su extremo doblado en ángulo recto eran introducidas en un tubo de ensayo con fondo plano (tubos Leighton) que contenía un cubre-objeto cubierto de medio de cultivo y extracto embrionario de pollo como estimulante de la división celular. Pocos días después se reproducían activamente los fibroblastos y se retiraban los explantos del cubre-objeto mediante succión con una pipeta recurvada quedando en el cubre-objeto una corona de células. Lejeune agregó colchicina al cultivo para detener las células en división mitótica para luego realizar un choque hipotónico a fin de lograr una óptima separación de los cromosomas. Al retirar el cubre-objeto después de dicho tratamiento coloreó el material celular con Azul de Unna (más adelante con el colorante Giemsa) pudiendo visualizar metafases mostrando cromosomas intactos, largos y bien separados, o sea de una calidad citogenética jamás observada hasta entonces. Estas notables imágenes citológicas permitieron a Lejeune contar los cromosomas y detectar el 22 mayo de 1958 que el número total de cromosomas era 47 en los portadores del síndrome de Down debido a que aparecía un cromosoma supernumerario en todas las células de los pacientes que él identificó como un miembro del par 21.

Debe destacarse que Lejeune afrontó y superó serias dificultades iniciales que él mencionó en su lección inaugural: “La pieza destinada al estudio citológico era soberbia. Ella poseía dos grandes agujeros abiertos al cielo y no había agua ni gas, ni mesa de trabajo. Nuestro microscopio, que era el orgullo del Hospital Trousseau en los años 20 se comportaba bastante valientemente a pesar de los dientes desgastados de su cremallera la que debíamos cubrir con una hoja de papel

de chocolate insertado juiciosamente entre los engranajes. Esta maravilla óptica tenía su trono sobre una cama de enfermo que hacía de mesa de trabajo. Una silla alta, bastante parecida a aquellas que se ven aún en las iglesias de campaña detrás del viejo armonio, completaba el mobiliario” [9].

Esta técnica inicial fue posteriormente abandonada y substituida con el empleo de la fitohemaglutinina (una lectina vegetal extraída de *Phaseolus vulgaris*) capaces de inducir a los linfocitos su transformación en linfoblastos los que comienzan a dividirse entre 48 a 72 horas después de la exposición a la droga facilitando enormemente los estudios citogenéticos del ser humano. La elevada actividad mitogénica de la fitohemaglutinina permite el desarrollo de microtécnicas que emplean pequeñas cantidades de sangre. También se pueden realizar cultivos con células del líquido amniótico empleadas para diagnóstico cromosómico.

Empleando las técnicas mencionadas, Lejeune presentó el 13 de junio de 1958 otro caso adicional, pero la foto que exhibió fue recibida con escepticismo durante el X Congreso Internacional de Genética realizado en Montreal, Canadá. La comunidad internacional no comprendió en ese momento el impacto del descubrimiento de Lejeune hasta que, el 26 de enero 1959, publicó con Gautier y Turpin, en los *Comptes Rendues de l'Academie de Sciences*, el primer trabajo describiendo tres casos de niños con síndrome de Down portadores de una trisomía 21 [14]. Posteriormente, en marzo 16 de 1959, publicaron en la misma revista los resultados obtenidos del estudio de otros nueve casos confirmando lo establecido en el trabajo inicial [7]. En abril de 1959 el grupo de Court Brown y Patricia Jacobs de Inglaterra corroboraron estos resultados citando la prioridad de la publicación inicial de enero de 1959 de Lejeune, Gautier y Turpin denominando trisomía 21 al “mongolismo”.

Actualmente aún se continúa denominándolo síndrome de Down aunque esto responde a un

error histórico pues John Langdon Down, al describir en 1866 los signos anormales de estos pacientes, clasificó a los débiles mentales según las apariencias étnicas. Así él calificó a los trisómicos 21 de padecer “idiocia mongoloide”, y a otros malformados de “idiocia negroide” o “idiocia malásica” ignorando, en su época, que cualquier etnia humana porta los mismos cromosomas y los mismos genes. Pero este tipo de error ha ocurrido en la historia de la medicina con cierta frecuencia cuando se intenta denominar un determinado síndrome y, posteriormente, ninguna organización oficial de la salud se preocupa de corregirlo.

En el caso de la trisomía 21 debiera llamarse, con toda justicia, síndrome de Lejeune, como también debiera denominarse, por ejemplo, a la trisomía 13, síndrome de Patau, en honor y recuerdo al gran citogenetista Klaus Patau quien la descubrió y la describió con precisión [15].

El síndrome de Down es la causa más frecuente de retraso mental identificable de origen genético. La anomalía cromosómica tiene una incidencia de 1 de cada 800 nacidos, y aumenta con la edad materna. En cambio, la edad del padre no posee esta tendencia. Es la cromosomopatía más frecuente y mejor conocida y no depende, por tanto, de la etnia, pues aparece en los diversos países prácticamente con frecuencias comparables. De acuerdo a lo registrado en diversas regiones la frecuencia de un trisómico 21 para una madre menor de 30 años es de 1 en 2000 nacimientos. Pasados los 35 años aumenta a 4 en 1000 y mayor de 45 años aumenta a 1 en 50 nacimientos. En el 95% de los casos, el síndrome de Down se produce por una trisomía del cromosoma 21 debido a una incorrecta disyunción a nivel meiótico en el óvulo. En el caso de que alguno de los padres tenga una translocación Robertsoniana (fusión de dos cromosomas acrocéntricos) entre dos cromosomas 21, el riesgo de recurrencia es del 100% independientemente del sexo que lo transmite. Si ninguno de los progenitores es portador de una translocación el riesgo de recurrencia es de alrededor de un 2-3 %. En el caso que exista

una translocación y alguno de los progenitores sea portador, no influye la edad materna. La esperanza de vida de los individuos con síndrome de Down ha aumentado sustancialmente en los últimos años gracias a los avances ocurridos en la medicina contemporánea. Si no padecen de cardiopatía congénita la sobrevida suele ser hasta la sexta década de la vida. Un 10% de los recién nacidos con el síndrome presentan una reacción leucemoide que es muy típica. Estos niños también tienen un riesgo más elevado de desarrollar una leucemia aguda linfoblástica como en el primer caso que publicamos [16]. También se han hallado casos de trisomía 21 asociados al síndrome de Klinefelter XXY.

La noción de la sobredosis génica es también aplicable en los casos de mosaicos en los cuales coexisten en un individuo dos o tres clones celulares diferentes formando una población celular mixta presentando algunas células trisómicas 21 y otras normales. Además la distribución del mosaico en los diferentes tejidos puede ser muy variable. En estos casos estos individuos pueden presentar un desarrollo mental casi normal tratándose de mosaicos con predominancia de células normales. Por el contrario, los casos en los cuales predominan las células trisómicas 21 presentan una debilidad mental más profunda que depende del grado de desequilibrio genético generado por esta aneuploidía. La hipótesis genética más plausible del origen de esta trisomía en el ser humano es que las mujeres nacen con una dotación fija de óvulos de los cuales en cada período menstrual sólo uno es potencialmente fecundable. A medida que pasa el tiempo, el ser humano es expuesto a una gran variedad de agentes mutagénicos y carcinogénicos, físicos y químicos, externos e internos, que determinarían, en el caso de la mujer, una perturbación progresiva del mecanismo celular de separación (disyunción) cromosómica correcta en el núcleo del óvulo.

Existen otras familias donde los embarazos de trisómicos 21 se repiten con una elevada frecuencia. El problema es también cromosómico pues

alguno de los progenitores porta el cromosoma 21 translocado a otro cromosoma del grupo D (cromosomas 13, 14 o 15) o G (22). Cuando el cromosoma translocado se transmite se suma al cromosoma 21 normal lo que determina que el gameto porte entonces dos cromosomas 21. Al producirse la fecundación se origina un embrión con tres cromosomas 21 repitiendo el síndrome y aumentando la posibilidad de engendrar esta anomalía con una mayor frecuencia ya que las células responden a proporciones mendelianas y no por razones accidentales de no disyunción cromosómica gamética [17]. Actualmente se puede diagnosticar el síndrome en forma prenatal realizando un estudio citogenético de vellosidades coriónicas o de líquido amniótico.

Cabe destacar que en el Centro Regional de Atlanta de Investigaciones de Primates Yerkes donde crían chimpancés, nació un individuo que padecía de claro retardo neurológico, hipotonía profunda, malformaciones, y protrusión de la lengua, por lo que no podía mamar. Estudiado citogenéticamente se confirmó que se trataba de un chimpancé trisómico para el par de cromosomas 22. Este par cromosómico se corresponde en sus características morfológicas al cromosoma 21 humano.

Los estudios moleculares posteriores confirmaron que el cromosoma 22 del chimpancé es, del punto de vista genético, exactamente igual al cromosoma 21 humano y que el síndrome que la trisomía 22 provocaba en el chimpancé era casi una réplica de la trisomía 21 humana. Este hecho muestra que, en el proceso de evolución de los primates, el ser humano recibió el mismo cromosoma en su cariotipo y que existe una patología común. Es obvio que en la naturaleza deben nacer chimpancés afectados de la trisomía pero, evidentemente, dichos animales al no poder mamar por las malformaciones y el retardo neurológico mueren y nunca antes había sido posible observarlos [18].

Desarrollo de la citogenética humana en Uruguay

Para el desarrollo de estudios en citogenética humana en Uruguay debíamos superar una situación compleja pues era obvio que debíamos perfeccionarnos en la metodología citogenética puesta a punto por Lejeune, quien lograba espectaculares metafases de cromosomas humanos. Era absolutamente necesario aprender a dominar el método de cultivo celular y la clasificación cromosómica desarrollada por dicho investigador para así superar el primitivismo técnico con que logramos estudiar citogenéticamente el primer caso de trisomía 21 (Figura 12).

Este crítico aspecto fué superado inesperadamente. El genetista argentino Juan Valencia había contratado a Lejeune para que hiciera una estadía de unas semanas en su laboratorio para familiarizarse con las tecnologías que Lejeune había desarrollado. Simultáneamente, el Dr. Alexander Hollaender de los Estados Unidos estaba organizando una serie de Congresos en América Latina con la finalidad de estimular las investigaciones biológicas en la región. Por ese entonces, estaba organizando con el Dr. Valencia un simposio internacional sobre “Genes and Chromosomes: Structure and Function”, a realizarse en Buenos Aires, Argentina [19].

Durante el acto de recepción de los participantes al simposio, al cual fui invitado, advierto que el Prof. Sáez conversaba animadamente con el Prof. Lejeune que también asistía a dicho acto como despedida de su estadía en Buenos Aires. Es entonces, que Sáez me invita a que me reúna con ellos, y aproveché la inesperada oportunidad para invitar a Lejeune a venir a Montevideo para desarrollar un cursillo de entrenamiento en Citogenética Humana similar al de Buenos Aires. El Prof. Lejeune amablemente declinó mi invitación y me dijo: “Es mucho mejor que usted vaya a mi laboratorio en París”. Poco después y con la opinión favorable del Prof. Lejeune, el Gobierno de Francia me otorgó una beca a través de su organismo de apoyo a los investigadores

del extranjero denominado “Association pour L’Organisation des Stages en France” (ASTEF) para realizar dicho entrenamiento científico. Esa oportunidad fue muy especial para mí pues no sólo me familiaricé con las tecnologías empleadas en el laboratorio de Lejeune sino que también establecí un permanente vínculo con la Escuela Citogenética Francesa.

En el laboratorio de Lejeune el ambiente era de intensa actividad y como uno de los principiantes comencé a recortar cromosomas de las fotografías tomadas con un microscopio que me cautivó: el Fotomicroscopio de Zeiss (Figuras 6-8). Finalmente establecíamos el cariotipo de cada paciente.

Aquel fue un período de mucho trabajo para Lejeune y sus colaboradores el cual contribuyó a aumentar su prestigio internacional. En 1964, Lejeune había descubierto el singular síndrome denominado “*Cri du Chat*”, causado por la pérdida (delección) de un segmento en el brazo corto del cromosoma 5. Aparte de las malformaciones, el niño se caracterizaba por un llanto o gemido similar al maullido del gato lo que dio origen al peculiar nombre clínico de este síndrome. Recuerdo que casi todas las paredes del laboratorio estaban cubiertas de postales recibidas de todas partes del mundo muchas de las cuales uno las apretaba y emitían un sonido similar al maullido del gato. En 1966 este grupo de investigadores describió



Figura 6. Metafase correspondiente a una mujer normal (46, XX). Se advierte la precisa morfología de cada uno de los cromosomas humanos obtenida por Lejeune.



Figura 7. El Prof. Lejeune en sus buenos tiempos con su Fotomicroscopio Zeiss.



Figura 8. a. El Prof. Lejeune corrigiendo un cariotipo al autor y b. pegando cromosomas con cinta adhesiva (Fotos: Organización Mundial de la Salud, 1966).

el síndrome 18q- que resulta de la pérdida de la porción distal del brazo largo del cromosoma 18. Lejeune también descubrió el fenotipo de un síndrome en el cual el cromosoma 13 estaba reemplazado por un cromosoma anular como así las trisomías del cromosoma 9 en 1970 y del cromosoma 8 en 1971. El año de 1966 era un momento culminante en la trayectoria académica de Lejeune quien, para esa fecha, había descubierto una elevada proporción de los síndromes citogenéticos. No olvidaré nunca la pregunta de la Dra. Marie-Odile Réthoré, colaboradora médica de la clínica de Lejeune, entrando de mañana al laboratorio y preguntando “*¿Quelle est la découverte du jour?*” Un interrogante que me pareció desusado y un tanto arrogante más allá de la humildad que siempre exhiben los grandes investigadores. Sin embargo, al familiarizarme días después con la catarata diaria de nuevas observaciones, comprendí el profundo significado de la pregunta de la Dra. Rethoré.

Jérôme Lejeune era reconocido por todos por su excelencia como científico. Pero en 1970 se opuso firmemente al proyecto de ley de aborto terapéutico de Francia. Esto causó que cayese en desgracia ante el mundo científico. Prefirió sostener el concepto de que matar a un feto, por estar enfermo, era un asesinato. Siempre utilizó argumentos racionales fundamentados en la ciencia. En este sentido, he creído conveniente transcribir el siguiente relato que muestra la personalidad de Lejeune y sus profundas convicciones acerca del aborto.

Lejeune fue invitado por el Senado de Francia tres años antes de su muerte, para que ofreciese su documentada opinión sobre el tema del aborto. Una de las opiniones fuertemente arraigadas en dicha cámara, sostenía que hay embarazos que deben ser interrumpidos, cuando los antecedentes o el pronóstico parecen ser irreversiblemente malos. Cuando se le otorgó la palabra a Lejeune, planteó el siguiente caso: “Tenemos un matrimonio en el cual el marido es sifilítico terciario incurable, y además decididamente alcohólico. La

mujer está desnutrida y padece de tuberculosis avanzada. El primer hijo de esa pareja muere al nacer; el segundo sobrevive pero con serios defectos congénitos. Al tercer hijo le ocurre lo mismo y se le suma el hecho de ser infradotado mentalmente. La mujer queda embarazada por cuarta vez. “¿Qué aconsejan ustedes hacer en un caso así?” Un senador del bloque socialista manifestó categóricamente que la única solución para evitar males mayores, era practicar un “aborto terapéutico” inmediato. Lejeune hizo un largo y notorio silencio; bajó la cabeza por unos segundos en medio de un expectante mutismo; volvió a alzarla y dijo: “Señores senadores, pónganse de pie, porque este caballero acaba de matar a Ludwig van Beethoven”. He transcripto esta anécdota porque creo que demuestra claramente las fuertes convicciones que Lejeune ya tenía acerca del aborto.

Llevó su profunda posición al congreso convocado por la Organización Mundial de la Salud donde expresó polemizando: “He aquí una institución para la salud que se ha transformado en una institución para la muerte”. Esa misma tarde escribe a su mujer y a su hija diciendo: “Hoy me he jugado mi Premio Nobel”. Lejeune también rechazó los conceptos ideológicos que se utilizan para justificar el aborto, como el de “pre-embrión”. La historia posterior de los profundos conflictos originados a nivel nacional en Francia sobre la Ley del Aborto y la posición contraria intransigente de Lejeune lo condujo lamentablemente a un progresivo aislamiento de la comunidad científica tanto en su país como a nivel internacional.

Los fundamentales aportes de Lejeune al surgimiento y desarrollo de la citogenética humana justifican plenamente su calificación como el auténtico fundador de esta disciplina. [7-13, 17, 20].

Lejeune falleció en París afectado por una neoplasia pulmonar el 3 de abril de 1994 y fue sepultado en el cementerio de Chalo-Saint-Mars.

Estadías de colaboradores en el laboratorio del Prof. Lejeune

Debido a la escasez de espacio disponible en su laboratorio, el Prof. Lejeune era reacio a aceptar candidatos interesados en realizar estadías de perfeccionamiento, los que seguramente había en grandes cantidades de todas partes del mundo. No obstante, accedió gentilmente cuando nosotros le propusimos enviarle dos colaboradores de nuestro grupo de investigación para profundizar su formación en citogenética humana. La primera estadía la desarrolló el Dr. Héctor Navarrete, un distinguido anatómo-patólogo, que fue director del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital de Clínicas hasta su inesperado fallecimiento. La segunda correspondió al Dr. Gustavo A. Folle, antiguo colaborador de nuestro laboratorio de Citogenética y que me sucedió como responsable del grupo de investigación en el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE).

Cabe destacar que no sólo el Prof. Lejeune colaboró en la formación de investigadores uruguayos en el área de la citogenética. El Dr. Roland Berger, destacado discípulo de Lejeune, se dedicó al estudio citogenético de leucemias y linfomas tornándose en un referente a nivel mundial en este tema. Su labor en este campo la desarrolló en el Laboratoire de Cytogénétique, Institut de Recherches sur les Leucémies et les Maladies du Sang (Centre G. Hayem) del Hôpital Saint-Louis de Paris (Figura 9).

Una de nuestras colaboradoras, la Dra. Rosana Bonomi, llevó a cabo dos estadías de perfeccionamiento (1993 y 1997) en citogenética de leucemias y linfomas humanos en el Hôpital Saint-Louis bajo la orientación del Prof. Roland Berger. Actualmente, la Dra. Bonomi desarrolla sus estudios diagnósticos en el Laboratorio de Citogenética Oncológica de la Asociación Española Primera de Socorros Mutuos (AEPSM) y es una referencia en nuestro país en esta disciplina.

En el año 2000, organizamos el Curso Internacional de Posgrado "New Approaches

in the study of Radiation-Induced and Cancer Associated Chromosomal Aberrations" que se desarrolló en Montevideo (Mayo 22-31) con la participación de expertos a nivel nacional e internacional entre los cuales se destacaba la presencia del Prof. Roland Berger.

Poco tiempo antes, tuve la oportunidad de conocer al Decano de la Facultad de Medicina, Prof. Dr. Luis Calegari en la ciudad de México D.F., a quien le informé que el Prof. Roland Berger había aceptado participar en nuestro curso. Como mencioné anteriormente, en esa época Berger era ya una autoridad mundial en el área de las leucemias tornándose asesor en este tema para toda Europa.

Fue entonces que le propuse al Decano la posibilidad de presentar al Consejo de la Facultad de Medicina los antecedentes científicos del Dr. Berger a fin de plantear la posibilidad de designarlo con el título de Doctor Honoris Causa. El Decano concordó con esta posibilidad y presenté el Curriculum Vitae del Prof. Berger para su estudio por parte del Consejo de la Facultad. Para nuestra sorpresa, durante la última conferencia del Dr. Berger en el marco del Curso Internacional en el IIBCE, aparece el Decano Dr. Calegari con el título de "Honoris Causa" en la mano para entregárselo al Prof. Berger. Es realmente difícil de relatar la emoción que demostró Berger



Figura 9. El Prof. Roland Berger en Abril de 1966.

ante tal honorífica e inesperada designación cuyas expresiones de alegría por tal distinción se advierten claramente en la figura 10.

La personalidad, el científico, el pediatra, la familia y el cenáculo del Dr. Ramón Guerra

El 20 de julio de 1904 nació en el pequeño pueblo de Las Piedras quien fuera el pediatra más importante de gran parte del siglo pasado [21-32]. Fue Profesor Emérito de la Facultad de Medicina y el Sindicato Médico del Uruguay lo distinguió con el título de Maestro de Maestros. Se graduó como pediatra en nuestra Facultad pero, como su padre era Embajador de nuestro país en Roma realizó estudios pediátricos en Italia. Posteriormente hizo estadías en Viena, París y Berlín por lo que su formación tuvo un giro científico de carácter europeo. (El autor del presente artículo sugiere a los lectores leer el excelente reportaje de César Di Candia publicado cuando celebró su 90° aniversario[33] así como otros reportajes [21-36].

Esa pequeña comunidad de aquella época, donde transcurrió la infancia del Prof. Ramón Guerra, se caracterizaba por los sordos rencores políticos y filosóficos existentes entre sus pocos habitantes: “los curas odiaban a los masones y viceversa. Los blancos a los colorados y éstos a aquéllos” recuerda Ramón Guerra. Durante esta entrevista el Prof. aclara que su apellido paterno es compuesto por Ramón Guerra Carámbula. Los Ramón Guerra eran de origen mallorquí y los Carámbula de las islas Canarias pero también tenía una abuela italiana y parientes indios. El abuelo del profesor era militar en España y al llegar a nuestro país su nivel militar fue validado como Capitán de nuestro ejército instalándose en el interior. Uno de sus hijos fue el padre del profesor quien se casó con una dama de apellido Carámbula.

Conocí al Profesor Ramón Guerra en circunstancias singulares. Estábamos cursando en 1957 Pediatría Médica y Quirúrgica en el Hospital Pereira Rossell. Era habitual que, entre los diversos



Figura 10. El Decano de la Facultad de Medicina del Uruguay Prof. Dr. Luis Calegari con el título Doctor Honoris Causa en su mano para entregárselo al Prof. Roland Berger, acompañados por el autor.

temas dictados por los profesores, se permitiera un breve descanso el cual aprovechábamos para cruzar la calle e ir a tomar un cafecito y charlar en abundancia. Estas conversaciones las mantenía con un querido amigo, el Br. Hugo Silvera, quien posteriormente se tornaría un reconocido psiquiatra. Uno de los temas abarcaba nuestra mutua sorpresa debido a que en los cursos, si bien se mencionaban numerosos síndromes hereditarios, no se explicaban en detalle los mecanismos hereditarios involucrados en dichos casos.

Me animé a comentarle en profundidad al Prof. Ramón Guerra nuestra preocupación. Al final de mi exposición el Profesor me dijo “¿tú podrías ahora acompañarme a mi casa? Deseo mostrarte un material que he reunido a lo largo del tiempo sobre enfermedades hereditarias”. El Profesor hacía años que estaba reuniendo observaciones de casos y familias con padecimientos hereditarios. Ramón Guerra decidió, en un gesto de confianza inolvidable, poner en mis manos todas las historias clínicas y sus notas personales. El resultado fue la presentación de un primer trabajo el 29 de octubre de 1957 en la Sociedad de Pediatría sobre “La aplicación de la Genética Humana Clínica” el cual fue seguido por otro más extenso sobre “La Aplicación de la Genética Humana Clínica en la morbi-mortalidad del período pre y



Figura 11. El Prof. Ramón Guerra celebrando su 90º aniversario, y el autor con su Profesor.

perinatal” expuesto durante el Curso organizado por el Centre International de l’Enfance, el Instituto Interamericano del Niño y el Instituto de Pediatría realizado en Uruguay en noviembre de 1961 [26]. Otra presentación similar de divulgación la presentamos en el 30º Curso de Perfeccionamiento de Pediatría, en el Instituto de Clínica Pediátrica y Puericultura “Luis Morquio” [37]. En suma, publicamos con el Prof. Ramón Guerra una serie de trabajos clínicos nuestros y de otros pediatras en los cuales siempre incluíamos genealogías referentes al caso (Figura 11).

En ese entonces intentábamos desarrollar métodos en el Uruguay para estudiar los cromosomas humanos. Enfrentábamos en aquella época carencias de toda índole. ¿Cómo cultivar las células? No teníamos ni estufa, ni tubos adecuados ni productos o medios de cultivo. En medio de esa pobreza se nos ocurrió no cultivar las células en tubos apropiados y usar medios de cultivo de células humanas sino emplear pequeños matraces, los más pequeñitos que encontramos en nuestro laboratorio, tratando de lograr una sobrevivencia corta de las células de biopsias de médula ósea, provenientes de pacientes, basados en la conocida actividad mitótica del material. Al carecer de algún medio de cultivo apropiado decidimos resuspender las células de las biopsias en un medio salino simple, aguardar una hora, y centrifugar el sobrenadante en la esperanza de hallar células en división. Esta especie de lotería

biológica funcionó y todo dependió de nuestra suerte. Logramos detener las supuestas células en división agregando colchicina con la esperanza de bloquear la división celular de un cierto número de células sin conocer la dosis correcta y sin saber cómo reaccionarían las células de los pacientes en estudio. En este primitivo ámbito, sometimos luego la muestra a una solución hipotónica para lograr la eventual dispersión de los cromosomas metafásicos como lo describiera T. C. Hsu en 1961 [5]. Tuvimos mucha suerte. Hallamos células en división y pudimos contar células con 47 cromosomas directamente con el microscopio y realizando dibujos aproximados de las metafases. Tantas dificultades e improvisaciones tecnológicas fueron coronadas con un éxito inesperado para nosotros. El primero en participar de nuestra alegría fue el Maestro Francisco Sáez, que no creía mucho en lo que estábamos haciendo. El segundo que mereció recibir la gran noticia de que habíamos detectado por primera vez en nuestro ámbito nacional la trisomía 21 descrita por Lejeune, fue el Prof. Ramón Guerra quien compartió telefónicamente nuestra gran emoción por el logro alcanzado. En esos memorables minutos nacía la Citogenética Humana en el Uruguay (Figura 12).

Por tanto, la citogenética humana clínica nació tanto en París como en nuestra ciudad en medio de las más increíbles dificultades materiales configurando inesperadamente un destino



Figura 12. Primera observación de una célula trisómica 21 (flecha) observada en 1962 en el Uruguay.

común de esfuerzos científicos y sostenido empeño en la labor de investigación y desarrollo de la citogenética humana allende los mares.

Durante mis visitas a la casa del Prof. Ramón Guerra conversábamos no sólo de problemas pediátricos o citogenéticos sino de otros temas, como astronomía y música clásica. Nuestro interés también abarcaba áreas diferentes como, por ejemplo, los dioses y seres mitológicos de la antigua Grecia los cuales, según el Prof. Ramón Guerra, fueron seres no imaginarios “sino producto de reales observaciones de seres malformados realizadas por los antiguos griegos y transformados en seres mitológicos”, por ejemplo, el centauro [38].

En la Cátedra de Pediatría algunos pediatras comenzaron a publicar sobre síndromes hereditarios y nosotros colaboramos realizando las correspondientes genealogías de los casos descritos [23-25, 30-32]. Mientras tanto, Lejeune continuaba descubriendo más y más pacientes portadores de aberraciones cromosómicas. La tecnología citogenética iba progresando aceleradamente orientada a identificar en forma precisa cada par de cromosomas del cariotipo humano. Recordemos que Lejeune, al obtener cromosomas de alta

calidad, especialmente largos y no distorsionados por los procedimientos citológicos, había basado sus hallazgos creando un cariotipo tentativo empleando solamente la forma y tamaño de los cromosomas pero sin ninguna otra información acerca de la estructura interna de cada cromosoma (Figura 13).

La primera técnica que se obtuvo relacionada con la organización del cromosoma metafásico fue empleando una tinción fluorescente con mostazas de quinacrina desarrollada por Caspersson y colaboradores en 1968. En 1970 Torbjörn Caspersson y colaboradores lograron obtener un primer bandeo diferencial de todos los cromosomas humanos empleando sustancias fluorescentes [39-41].

En el mismo año, Mary-Lou Pardue y Joseph G. Gall describen la localización de ADN satélite del ratón [42]. En su trabajo mencionan, adicionalmente, que su técnica coloreaba intensamente la región centromérica. Frances Arrighi se familiarizó en el laboratorio del Prof. Gall con esta



Figura 13. Cariotipo de mujer normal 46, XX.

técnica y a su retorno al laboratorio se asoció con T. C. Hsu para aplicarla en los cromosomas humanos confirmando dicha observación la cual, en 1971, se denominó bandeo C [43].

Arribé a Houston a fines de 1970 al MD Anderson Hospital and Tumour Institute bajo contrato, realizado por la Dra. Margery Shaw, como Investigador Asociado de la Universidad de Texas y me enteré de este trabajo. En aquel momento, en ese laboratorio se realizaban estudios citogenéticos usando cromosomas sumamente acortados según el estilo tradicional anglosajón, quienes usaban Colcemid para bloquear la división celular, una droga sintética mucho más activa que la colchicina. En el intento de repetir la técnica sólo lograba cromosomas muy pequeños por su excesivo acortamiento provocado por el empleo del Colcemid.

Por tanto consideré que era preciso mejorar la calidad de los cromosomas siguiendo la metodología de Lejeune. Cuando logré optimizar la morfología cromosómica aplicando los conocimientos adquiridos en París (Figura 13), me dediqué a tratar de obtener el bandeo C, cuando, imprevistamente, observé un teñido diferencial de la estructura de todos los brazos cromosómicos (Figura 14 a). Decidí aplicar la técnica en células de varios individuos normales y mejorar el método. Los hallazgos obtenidos en varios individuos fueron consistentes y ello me permitió dibujar las

distintas regiones coloreadas características de cada cromosoma en forma diagramática (Figura 14 b). Los hallazgos y dicho mapa fueron publicados en 1971 con la denominación de bandeo G (de Giemsa) [44] y nuestra publicación reconocida recientemente como prioritaria por Chial Heidi (2008) [45] publicada en Nature Education.

Decidí enviar una carta a Lejeune informándole sobre mi hallazgo del bandeo cromosómico G. En su respuesta Lejeune me comunica que él y su colaborador Bernard Dutrillaux también habían desarrollado un método de bandeo incubando los cromosomas a mayor temperatura que la empleada en nuestro método pero, en su respuesta del 8 de junio de 1971 Lejeune me comenta, que las imágenes se parecían a las nuestras pero, “su técnica es en parte solamente comparable a la nuestra ya que evidencia estructuras rigurosamente idénticas a las de nuestra técnica, pero en ciertos puntos las coloraciones son exactamente a la inversa de las que obtenemos nosotros”. ¡Habían descubierto un nuevo bandeo denominado posteriormente Bando Reverse (R)! [45-48].

Las disgenesias sexuales femeninas

Otro capítulo de la Citogenética Humana Clínica que iniciamos en Uruguay se refirió a las aberraciones de los cromosomas sexuales. Los trastornos de la morfología del aparato genital externo e interno, fueron considerados clásicamente

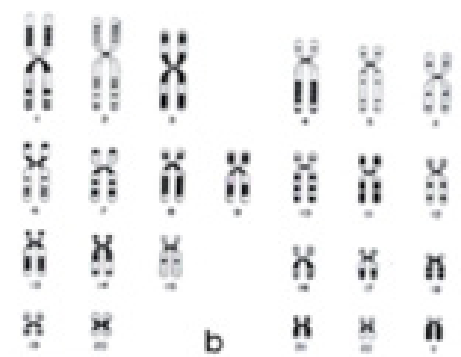
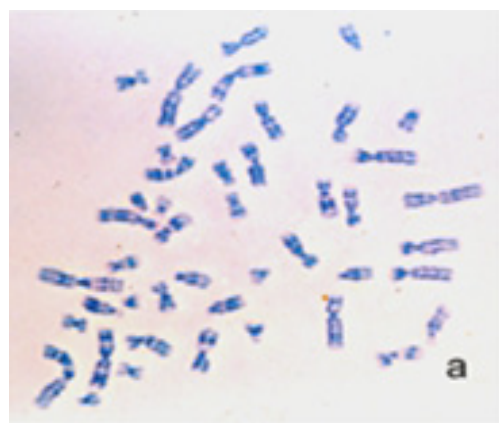


Figura 14. a. Primera imagen de metafase descubierta exhibiendo bandas G y b. mapa diagramático de todas las bandas G del cariotipo humano dibujado en 1970 [44].

sobre una base exclusivamente anátomo-clínica. Mientras los factores etiopatogénicos se mantuvieron en la obscuridad, su agrupamiento y su clasificación, carecieron de firmes fundamentos racionales. El término de intersexualidad los englobó sin identificación genuina del sexo.

El descubrimiento realizado por Murray Barr y Ewart Bertram en 1949 sobre la presencia de un corpúsculo cromático de significación sexual, adosado a la membrana nuclear, permitió reconocer en las células una diferencia entre los sexos. Se consideró que la presencia porcentualmente alta o baja de ese corpúsculo por campo microscópico estudiado significaba sexo femenino o sexo masculino [49].

Siendo genético el origen de ese corpúsculo cromático se consideró hombres a los individuos portadores de cromatina sexual negativa y mujeres a quienes mostraban cromatina sexual positiva, independientemente de los aspectos anátomo-clínicos de intersexualidad que presentaran y frecuentemente en discordancia con ellos. Esto ocurrió particularmente en los llamados síndrome de Turner y síndrome de Klinefelter.

Las aberraciones de los cromosomas sexuales difieren en que el cromosoma X y el Y son genéticamente diferentes. Además el mecanismo regulatorio que inactiva el cromosoma X debe también tomarse en cuenta [50]. El gameto femenino está probablemente más involucrado que el gameto masculino dado que por cada óvulo se producen millones de espermatozoides.

La disgenesia gonadal femenina o síndrome de Turner se presenta habitualmente con aspecto femenino, estatura baja, hipertelorismo y a veces epicanto con asimetría facial, cuello membranoso con pliegues cutáneos que se extienden desde la región mastoidea hasta los hombros denominado *pterygium colli*. En general, poseen órganos sexuales internos infantiles, sin desarrollo del ovario que muestra una ausencia total de células germinales careciendo las pacientes de menstruación [51].

En estos casos no influye la edad materna ni la paterna sobre la frecuencia de aparición de este

síndrome. Al parecer la proporción de células aneuploides en los cultivos de leucocitos está aumentada con la edad del paciente con pérdida del X en la mujer y del Y en el hombre.

Por tanto, en el síndrome de Turner, el defecto genético consiste en la ausencia de un cromosoma X (44 autosomas + X). Existen síndromes de disgenesias ováricas parecidos al Turner pero con cariotipos más complejos (mosaicos), a saber: X0/XX, X0/XXX, X0/XX/XXX hecho que exige un detallado estudio cromosómico previo a cualquier diagnóstico clínico. Por otra parte, existen casos con exceso de cromosomas X tales como XXX, XXXX o XXXXX y formas mosaico.

Las disgenesias testiculares

Harry Klinefelter y colaboradores describieron en 1942 [52] un hombre que portaba ginecomastia, testículos hipotróficos con espermatogénesis, fibrosis tubular, hialinización y presencia de células de Leydig. Estos autores estudiaron nueve casos de edades entre diecisiete a treinta y ocho años de edad. Existía en estos individuos una oposición entre el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios y las consecuencias de una disgenesia testicular. Tanto el pene, la próstata y la distribución del vello eran normales pero los testículos eran muy pequeños acompañado de azoospermia y ginecomastia postpuberal. El sujeto era sexualmente activo y el estudio de la

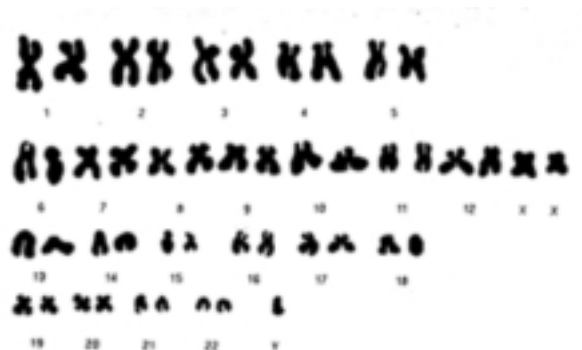


Figura 15. Primer cariotipo de disgenesia gonadal detectado en nuestro laboratorio en un varón que presentaba 47 cromosomas portando dos cromosomas X (47, XXY).

cromatina de Barr era positivo en el 50 a 80 % de las células analizadas.

Los estudios realizados en células de médula ósea mostraron en cinco células cuatro XX. En otros estudios también en médula ósea se hallaron 47 cromosomas y se pensó que la determinación sexual posible era XXY (Figura 15). Sin embargo, otros tipos celulares portaban 46 cromosomas por lo que se supuso que pudieran tratarse de mosaicos XX/XXY. Turpin y colaboradores emitieron la hipótesis en 1962 que la ambisexualidad gonosómica XX/XXY podía acompañarse de ambisexualidad fenotípica [16]. Similarmente a lo que ocurre en las disgenesias gonadales femeninas se han hallado constituciones cromosómicas variables en la disgenesia gonadal masculina a saber XXY, XXXY, XXYY, XXXXY, XXXYY y mosaicos X0/XY, XX/XY, X0/XXY.

Aparte de estos casos se observan aberraciones cromosómicas en las mujeres como deleciones XXdl, XXa con cromosomas anulares y otras alteraciones que pueden verse en los mosaicos. Por tanto, esta patología exige cuidadosos análisis citogenéticos tanto en las disgenesias gonadales como en los supuestos casos de disgenesia gonadal masculina.

Un ejemplo de un primer extenso estudio de genética clínica en el Uruguay: el Síndrome de Alport

En 1970 el Prof. Pablo Purriel, Titular de la Cátedra de Semiología del Hospital de Clínicas de la Universidad de la República, convocó a su amigo el Prof. Ramón Guerra para intercambiar opiniones sobre un muy raro caso de una familia que padecía nefritis, pero que era mucho más grave en los varones que en las mujeres falleciendo los pacientes en su primera juventud. Una vez que el Prof. Ramón Guerra se informó detalladamente de las características clínicas de la enfermedad, le sugiere al Prof. Purriel que debía asociar al estudio del síndrome a "Drets como genetista". Es así que quedé vinculado a este estudio y dicha relación se prolongó en una primera etapa unos

ocho años debido al tamaño del grupo familiar y a la gravedad de la enfermedad.

El Prof. Purriel era un magistral semiólogo dictando cautivantes clases por su capacidad docente y contenido científico que resultaban siempre del mayor interés aún para los más distraídos alumnos. Adicionalmente, era una persona cultísima y su gran escritorio particular estaba cubierto de pinturas y valiosas obras de arte, inclusive la máscara mortuoria de Amado Nervo quien falleció en el Parque Hotel de Montevideo el 24 de mayo de 1919. Por tanto, aparte del estudio del síndrome de Alport, era un placer oír cómo había obtenido tantas pinturas inclusive un retrato al óleo del propio Prof. Purriel, realizado por su amigo el pintor Torres García. Me relató incluso cómo había conseguido gratuitamente tarros de pintura para que Torres García pudiera pintar sus obras de arte en los interiores del edificio del Sanatorio del Centro Asistencial del Sindicato Médico y del Hospital Saint Bois, en su tiempo destinado a enfermos de tuberculosis.

Cuando estudiamos el gran grupo familiar formado por 668 individuos, provenientes principalmente de Uruguay comprobamos que 99 estaban afectados con uno o más componentes de la tríada patológica consistente en nefritis, sordera y lesiones oculares diversas. Los hombres eran los más afectados y fallecían a fines de sus primeras décadas de vida. Las mujeres padecían la nefropatía, pero en forma más atenuada y eran las que sobrevivían y transmitían esta enfermedad ligada al sexo que diezma familias enteras. Del punto de vista genético se consideraron varias hipótesis, asociación autosómica y segregación preferencial del cromosoma X que pareció que quizá fuera lo más probable aunque los datos sugerían que algún otro factor adicional desconocido estaba involucrado en la transmisión de la enfermedad. Hasta donde sabemos sobre los varones afectados, el único que sobrevivió fue producto de un injerto de riñón.

Uno de los problemas más difíciles de resolver fue cómo representar gráficamente una gran

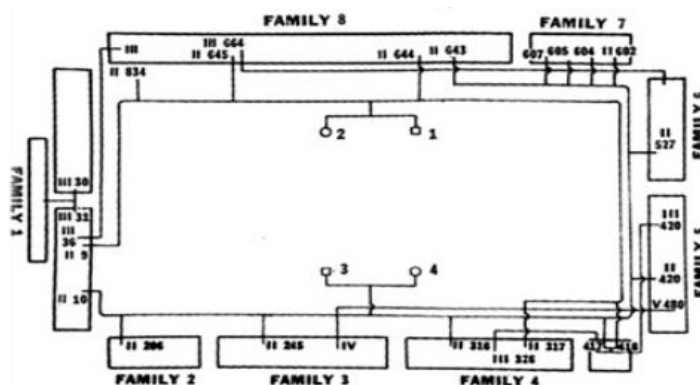


Figura 16. Estructura del grupo familiar (hermandad) y las interconexiones de cada familia portadora del síndrome de Alport.

genealogía para guiarnos con precisión en el vasto estudio. El diagrama que aparece en la figura 16 permitió registrar la estructura de los grupos familiares que integraban este gran conjunto de familias cuyos componentes estaban todos interconectados y que se habían originado a partir de dos parejas (1 y 2) y (3 y 4). Al parecer dichas parejas iniciales habían emigrado probablemente de Brasil o de Portugal al Uruguay. En el curso de dicho estudio, vislumbramos lo complejo que sería representar una genealogía que interconectara en forma adecuada los ocho grupos familiares estudiados. Sin embargo debido a mis conocimientos de electrónica, me inspiré

en los circuitos electrónicos complejos para representar la interconexión entre las familias afectadas por el síndrome. Así, el diagrama genealógico general derivó de un diseño que empleaba los conceptos de compactación de gran cantidad de elementos empleado en los circuitos de plaquetas electrónicas, permitiendo ilustrar en forma apropiada una familia tan extensa. En el trabajo publicado, se ilustraron separadamente cada grupo familiar con una genealogía detallada estando numerados todos los miembros de cada familia. Las parejas iniciales originarias de estas familias están claramente indicadas según el diagrama y el pedigree y la patología de cada familia fue numerada y los portadores como así los afectados fueron codificados también en forma diagramática (Figura 17). El sistema resultó sumamente práctico para ubicar rápidamente pacientes y familiares como así en los registros de datos clínicos que se fueron reuniendo a lo largo de los años.

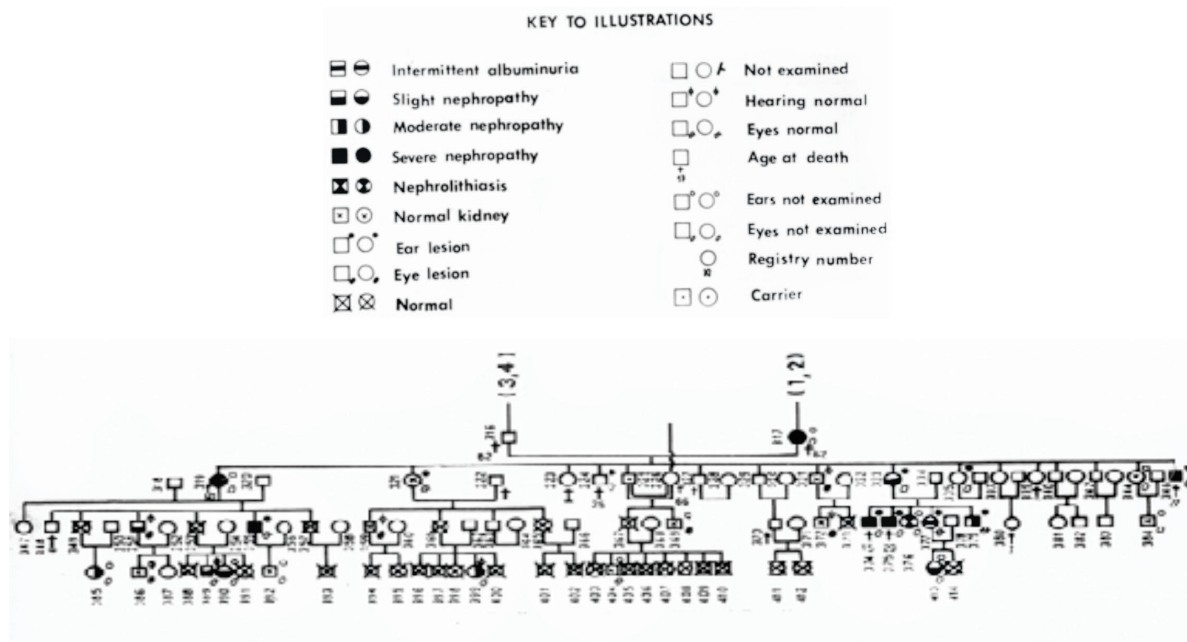


Figura 17. Arriba: códigos empleados en las genealogías. Abajo: Pedigree de la Familia 4. Los pacientes 374 y 375 fallecieron a la edad de 15 y 23 años respectivamente debido a la nefropatía de Alport.



Figura 18. El Prof. Pablo Purriel exponiendo sobre el Síndrome de Alport.

De acuerdo a los datos registrados, esta gran familia afectada por el síndrome de Alport era, en esa época, la más numerosa de América Latina y quizá la más numerosa del resto del orbe. La presente investigación, publicada en el *American Journal of Medicine* [53], fue distinguida con el Primer Premio “Dr. Luis Calzada” otorgado por la Facultad de Medicina de Montevideo (Nefropatía Hereditaria Familiar, Síndrome de Alport) siendo sus autores P. Purriel, M.E. Drets, E. Pascale, R. Sánchez Cestau, A. Borrás, W. Acosta, A. de Lucca y L. Fernández.

La investigación fue continuada posteriormente alcanzando a registrar aproximadamente unos 1600 individuos pertenecientes a este grupo emparentado tornando este problema en un asunto sanitario de nivel ministerial y no de un grupo de investigadores motivados vocacionalmente.

Lamentablemente el inesperado fallecimiento en 1975 del Profesor Purriel (Figura 18), quien fuera el líder natural conductor de esta investigación a nivel clínico, detuvo este importante

trabajo. Muy probablemente los casos esporádicos que se han registrado o publicado en los últimos tiempos en nuestro país no sean casos aislados sino descendientes del extenso grupo familiar diseminado en nuestro territorio que describimos en 1970.

Síndromes Leucémicos

En el siglo pasado Boveri tuvo la idea que las tumoraciones que presentaban mitosis multipolares estaban determinadas por modificaciones cromosómicas [54] pero esta hipótesis solamente fue confirmada con el descubrimiento de Lejeune de que ciertos pacientes con retardo mental y malformaciones corporales (o físicos) presentaban una aberración cromosómica definida (trisomía 21) y que en algunos pacientes no solo portaban la trisomía sino que también podían presentar cuadros de leucosis aguda. También se observó esta asociación en las trisomías 13, en pacientes XXY, X0/XXX y XY/XXY.

Años después Nowell y Hungerford descubren, en una leucemia mieloide crónica, un cromosoma anormal del grupo G de menor tamaño [55] que fuera denominado por Baikie y colaboradores cromosoma Philadelphia (Ph1) en homenaje a la ciudad donde se había realizado el hallazgo [56]. En otros tipos de leucemias no se hallaron cromosomas marcadores ya que se han observado aneuploidías, hiper o hipodiploidías, y células pseudodiploides carentes de cromosomas específicos.

Lo interesante del caso es que el cromosoma Ph1 puede observarse antes que las manifestaciones clínicas de la enfermedad aparezcan lo que permite adelantar la terapia antes de la expresión clínica de la enfermedad. Se ha demostrado la presencia de dicho cromosoma en las series granulocíticas, megacariocíticas y eritrocíticas pero no en fibroblastos en cultivo. Tampoco se ha hallado el Ph1 en la serie linfocítica.

Como en 1972 era de gran interés comenzar investigaciones citogenéticas en leucemias en nuestro país los Dres. Héctor Navarrete y Roberto Bonaba se incorporaron en nuestro

laboratorio seleccionados y enviados por el Prof. José Mautone, Director del Instituto de Anatomía Patológica del Hospital de Clínicas. Como resultado, ellos publicaron un primer estudio cromosómico en leucemias mieloides crónicas realizada en Uruguay [57]. Aparte de detectar el cromosoma Ph1 se hallaron células aneuploides en la médula con una frecuencia del 40% compuesto por hiper e hipodiploidía y células pseudodiploides. Mediante bandeo fluorescente, Caspersson demostró que el cromosoma Ph1 pertenece al par 22 y no al par 21 como se había descrito anteriormente. Finalmente, Navarrete y Bonaba lograron detectar un cromosoma anular en uno de los pacientes mostrando las profundas modificaciones cromosómicas que ocurren en este tipo de enfermedades hemato-oncológicas del ser humano (Figura 19).

Transcribimos algunos resultados logrados por el investigador francés Roland Berger, reconocido especialista internacional en citogenética de las leucemias [58-59] cuyo contenido fue extraído de su presentación realizada en el Curso Internacional “New Approaches in the Study of Radiation-Induced and Cancer-Associated Chromosomal Aberrations” organizado por nosotros y desarrollado en el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (del 22 al 31 de mayo de 2000).

“Desde hace tiempo se ha observado en las células malignas anomalías cromosómicas centroméricas y pericentroméricas. Su incidencia parece ser distinta en diferentes tipos de síndromes malignos. En la leucemia humana se han hallado cromosomas dicéntricos clonales y recurrentes asociados con algunos subtipos de leucemia como dic(5;17) dic(17;18) en proliferaciones celulares mieloides y dic(7;9), dic(9;12), dic(9;20) en leucemias linfoblásticas agudas.

Usando la técnica del bandeo C y más recientemente la hibridación *in situ* fluorescente (FISH) algunas de las denominadas translocaciones Robertsonianas eran evidentemente cromosomas dicéntricos. Pueden estar presentes cromosomas



Figura 19. Cromosoma anular detectado en un caso de leucemia mieloide crónica estudiada por Navarrete y Bonaba en 1976 [57].

isodicéntricos en forma de anomalías clonales, como idic(8)(p11) e idic(14)(p11) en proliferaciones de células linfoides e idic(21)n (p11), idic(Ph) idic(X)(q13) en proliferaciones de células mieloides. La existencia de cromosomas isodicéntricos, que se sabe clásicamente que son inestables, plantea el problema de los centrómeros no funcionales (“inactivos”) para explicar cómo las estructuras de tipo dicéntrico pueden pasar a través de sucesivas divisiones celulares sin fracturarse durante la anafase.

Según Berger, los resultados obtenidos hasta la fecha sobre las alteraciones cromosómicas observadas en las leucemias justifican realizar investigaciones adicionales en esta clase de anomalías por varias razones:

La primera serie de interrogantes se refiere a los mecanismos de producción de las anomalías cromosómicas. Varios factores pueden favorecer los reordenamientos de la heterocromatina y no legitimizar la recombinación resultante de la translocación adquirida. Ellos son apareamientos somáticos, homologías entre el ADN centromérico, el estado de metilación que puede alterar al ADN y favorecer la fractura cromosómica en el área correspondiente, presencia de transposones dentro de la heterocromatina del ADN e incluso polimorfismos de la heterocromatina que se sospecha responsable de la frecuencia de recombinación génica anormal.

La segunda serie de interrogantes se refiere a las consecuencias posibles de los reordenamientos de la heterocromatina observadas en las leucemias. Ellas son el desequilibrio cuantitativo

(trisomías y monosomías parciales) silenciando los genes localizados en la vecindad de los puntos de fractura cromosómicos debido a la translocación de la heterocromatina a lugares cromosómicos ectópicos y alteraciones funcionales de los genes y proteínas asociadas con la heterocromatina. Muchos de estos objetivos de la investigación pueden probarse ahora debido a los dramáticos avances ocurridos recientemente en la biología molecular y en los estudios sobre las funciones génicas. La tarea actual de los citogenetistas es aumentar el número de casos estudiados para determinar los tipos de anormalidades que alteran la heterocromatina en los procesos malignos”.

Estas brillantes conclusiones del Prof. Berger apoyaron nuestro interés de iniciar investigaciones citogenéticas en este campo hace ya más de treinta años que resultó en aquella época en el trabajo pionero de Navarrete y Bonaba [57]. Como detallamos anteriormente, una de nuestras discípulas, la Dra. Rossana Bonomi, tuvo la oportunidad de ampliar sus conocimientos en este campo de investigaciones con mi amigo el Prof. Roland Berger, formarse en este campo y convertirse en una destacada especialista en la materia.

Actividad docente: la citogenética humana a nivel de pre- y posgrado

Durante cinco años consecutivos (1966-1971) dictamos un curso sobre citogenética humana destinado a los estudiantes de medicina cursando Fisiopatología, por invitación del Prof. Roberto Caldeyro Barcia.

Posteriormente, en 1969 consideramos importante organizar y dictar el Primer y Segundo Curso de Citogenética Humana para Médicos, con la colaboración del Dr. Horacio Cardoso. Dicho curso fue desarrollado en la Escuela de Graduados de la Facultad de Medicina cuyo director era el Prof. Fernando Herrera Ramos. En dichos cursos participaron, entre otros docentes, el Prof. Francisco A. Sáez [60] dictando aspectos de los cromosomas de ortópteros y de vegetales brindando a los participantes una amplia visión

biológica sobre la estructura de los cromosomas y el Prof. Ramón Guerra exponiendo la relación de los síndromes malformativos con la patología cromosómica.

Después de tantos años transcurridos desde aquel inicial esfuerzo de desarrollar la citogenética humana hasta el presente consideramos de interés histórico incluir en el presente artículo las palabras que pronuncié el día 27 de julio de 1970 como introducción al Primer Curso sobre Citogenética Humana realizado en cooperación entre la Escuela de Graduados de la Facultad de Medicina de Montevideo, la Cátedra de Patología y Fisiopatología y el laboratorio de Citogenética Humana, Departamento de Citogenética, del Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas:

“En el marco del programa del Laboratorio de Citogenética Humana del Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas de contribuir a la intensificación del desarrollo de la Citogenética Humana en el Uruguay y gracias al generoso estímulo y comprensión proporcionado por el Prof. Dr. Roberto Caldeyro Barcia, Catedrático y Director del Departamento de Patología y Fisiopatología y del director de la Escuela de Graduados, el Prof. Dr. Fernando Herrera Ramos, tuvimos el honor de elevar en 1969 un proyecto de realización de un Primer Curso Básico sobre Citogenética Humana a ser considerado por el Consejo de la Facultad de Medicina.

La idea primaria era promover el ambiente médico y atraer nuevos interesados que pudieran abordar problemas específicos ya que, actualmente, está fuera del alcance de un único investigador la totalidad de la especialidad, realizando una breve reseña sobre su importancia y gravitación en la Medicina actual e incluir, asimismo, una serie de eminentes personalidades las que, independientemente y debido a su propio campo de especialización, dictaban clases sobre temas afines.

Ese fue el origen de este primer curso. En el transcurso del mismo se intentará brindar en forma armónica durante ocho a diez horas de

exposiciones un panorama general sobre los aspectos esenciales de la biología de los cromosomas humanos divulgados hasta ahora en forma dispersa.

Es evidente que se han restringido, en forma deliberada, los temas a abordar y esto se debe a que consideramos este curso un real experimento docente que nos proporcionará las bases para desarrollar futuros y más complejos cursos.

Es, por tanto, quizá objetable la ausencia de muchos e importantes capítulos como, por ejemplo, los aspectos moleculares de los ácidos nucleicos, la evolución de los cromosomas de los vertebrados en particular los vertebrados superiores, los problemas serológicos en su relación con las aberraciones cromosómicas, los mecanismos de la inducción de las aberraciones, etc. Estos y otros temas serán incluidos seguramente en el futuro -al menos esa es nuestra esperanza- con el concurso de los respectivos especialistas.

Debo señalar además que, en este curso, se dará un énfasis especial a los aspectos biológicos desechando intencionalmente muchos e importantes aspectos clínicos con el propósito de suministrar las herramientas básicas que permitan interpretar los hechos más importantes.

Este primer esfuerzo posee, en muchos sentidos, significado permanente para nosotros. El mismo hecho de que haya sido el feliz aglutinante de las personalidades que lo integrarán con su conocimiento y su experiencia hace, de este, un momento muy singular.

Pero lo es, también, la vinculación fructífera entre el Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas a través de nuestro Laboratorio de Citogenética Humana y la Facultad de Medicina haciendo que este curso se inicie con un sincero espíritu de estrecha cooperación inter-institucional en el plano de la docencia.

Y finalmente, la posibilidad de comenzar una nueva etapa en el desarrollo de la citogenética humana en el país le da a este curso, en nuestro entender, un verdadero contenido histórico.

Como saben, esta moderna disciplina prácticamente no existía hasta hace unos pocos años en

nuestro país en forma efectiva a pesar de nuestro interés en ella. Ya en 1961 realizamos los primeros intentos de cultivar células humanas con los escasísimos medios con que contábamos en aquella época y con el permanente aliento de nuestros queridos maestros el Prof. Francisco A. Sáez y el Prof. Alfredo Ramón Guerra los cuales, afortunadamente, integran este primer curso. Desde aquella fecha y en forma simultánea, la disciplina y nuestro laboratorio se desarrollaron intensamente.

En 1966 tuvimos la excepcional oportunidad de recibir las enseñanzas de un notable investigador: el Prof. Jérôme Lejeune. Sus admirables trabajos sobre cromosomas humanos, su rigor científico y su poder de organización dejaron en nosotros una marca indeleble.

A partir de aquella fecha un importante número de instituciones nacionales y extranjeras, oficiales y privadas nos proporcionaron el necesario apoyo material que permitió la existencia y normal funcionamiento de esta costosa disciplina en el Uruguay.

Paralelamente, y a fin de no aislarnos del medio universitario y médico y con el propósito de promover vocaciones y de mostrar el valor práctico de la citogenética humana en la formación del médico moderno, comenzamos a divulgar nuestra experiencia a distintos niveles. Aquellos alumnos de tercer año que celebraron nuestras clases, son ahora probablemente médicos y también un caudal humano que acrecentará y valorará, en el ejercicio de la profesión, el significado y la repercusión del estudio de los cromosomas humanos en la génesis de las enfermedades hereditarias.

Si este curso es capaz de dar un nuevo impulso al desarrollo de la citogenética humana y de inaugurar una nueva etapa del conocimiento médico en nuestro medio, habremos logrado muchos de los objetivos que motivaron su realización.”

Al final de una de nuestras clases recomendé a los participantes del curso que no olvidaran traer una pequeña tijera al día siguiente. El inusual pedido se relacionó con el hecho que logramos que los médicos pudieran hacer cariotipos reales bajo

nuestra orientación, recortando los cromosomas de células normales y portadoras de trisomía 21, empleando metafases impresas en papel común de copia. Es recordable la dedicación y entusiasmo que demostraron los participantes. Este nuevo método de enseñanza citogenética, creado por nosotros durante dichos cursos, lo publicamos como novedad docente en 1968 en la famosa antigua revista médica *The Lancet* [61].

A fin de estimular el desarrollo de la genética y citogenética humana clínicas y subsanar la carencia de libros en español en estas áreas, decidimos traducir a nuestro idioma dos fundamentales tratados:

- “Principles of Human Genetics” Autor: Curt Stern, “Principios de Genética Humana” (editado en 1963 por El Ateneo, Buenos Aires, Argentina, 830 páginas);

- “Human Chromosomes. Structure, Behavior, and Effects”. Autores: Eeva Therman y Millard Susman, (3rd edition, 1993, Springer Verlag), “Cromosomas Humanos. Estructura, Comportamiento y Efectos” (editado en 1996 por la Sociedad Brasileira de Genética a la cual doné mi traducción (376 páginas).

Comentarios finales sobre el desarrollo de la Genética y Citogenética Humana en el Uruguay

Este corto artículo no pretende abarcar la extensa y compleja historia de la genética y citogenética humana porque, aparte del artículo mencionado en la bibliografía [62], que abarcó 36 años de nuestra anterior labor, el presente artículo intenta ahora cubrir 54 años de trabajos citogenéticos dando una perspectiva científica desde los comienzos de ellos en nuestro país hasta arribar a logros más recientes.

En este prolongado período de investigaciones tuve la inolvidable fortuna de haber trabajado con eminentes investigadores comenzando con el maestro inicial, el Prof. Francisco A. Sáez, con quien realizamos muchos años de estudios en problemas citogenéticos de insectos y animales autóctonos y, más adelante, con eminentes

investigadores clínicos como los Profs. Alfredo Ramón Guerra y Pablo Purriel con quienes desarrollamos los primeros trabajos realizados en nuestro país en las áreas de la citogenética y genética humana clínica.

Obviamente era de gran importancia disponer de un laboratorio para realizar investigaciones citogenéticas [62]. Es justo, en este momento, recordar los esfuerzos que hizo el Prof. Ramón Guerra para convencer a las autoridades hospitalarias que era necesario instalar un pequeño laboratorio para realizar diagnósticos citogenéticos a nivel, por lo menos del Hospital Pediátrico Pereira Rossell. Me consta que, a pesar del número de publicaciones y presentaciones donde el Prof. Ramón Guerra remarcó la importancia de un servicio de esta índole [31], su propuesta no tuvo repercusión y, a lo largo del tiempo, sólo logró disponer de una habitación para el desarrollo de su proyecto en un edificio que poco después fue demolido. No pudo entonces completar, a un nivel mínimo, equipamiento, productos para cultivos celulares y ayuda técnica por lo que su atendible y absolutamente necesario proyecto, en la práctica nunca llegó a concretarse durante su período de actuación.

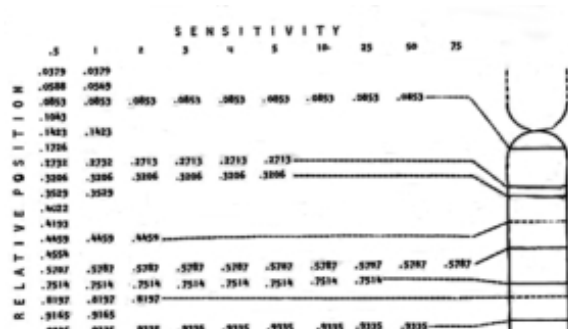


Figura 20. Exploración microfotométrica de las bandas G del brazo largo del cromosoma N° 1 humano empleando el primer programa computacional cuantitativo “BANDSCAN” desarrollado por nosotros y publicado a nivel internacional. Las líneas continuas, dentro del brazo, indican las bandas principales y los valores detectados señalan sus posiciones correctas. Las bandas menores o los posibles artefactos son rechazados por el sistema variando en forma interactiva la sensibilidad de la exploración [48].



Figura 21. Citómetro de Flujo y Clasificador Celular FACS Vantage (Becton Dickinson) del IIBCE.

Mi formación como citogenetista humano con el Prof. Jérôme Lejeune me permitió un conocimiento preciso de los cromosomas del ser humano y del diagnóstico cariológico impregnado de rigor científico, lo cual se reflejó en los trabajos posteriores realizados en nuestro laboratorio y en la formación de mis colaboradores, como también en el desarrollo de nuevas tecnologías para analizar con mayor profundidad la estructura cromosómica. Un ejemplo lo constituye el desarrollo de un programa de computación denominado Bandscan [48] que permite detectar las posiciones de las bandas cromosómicas con suma precisión (Figura 20).

Estos progresos fueron posibles por la incorporación de nuevos instrumentos analíticos y, lo que es más importante, por contar con jóvenes entusiastas y vocacionales que hicieron posible nuestro sostenido progreso científico y tecnológico. Con este criterio de desarrollo, adquirimos en nuestro laboratorio, antes de finalizar mi labor como investigador en actividad, un primer Citómetro de Flujo y Clasificador Celular destinado a investigaciones biológicas de avanzada lo cual creó un nuevo campo laboral para el ámbito científico de nuestro país (Figura 21).

La citometría de flujo es una moderna tecnología basada en la utilización de luz láser, empleada en el recuento y clasificación de células según sus características morfológicas, presencia

de biomarcadores y en la ingeniería de proteínas. Los citómetros de flujo permiten una cuantificación automática de una serie de parámetros celulares con altísima precisión. Para analizar tejidos sólidos debe prepararse en primer lugar una suspensión de células las cuales pueden ser analizadas por el sistema.

En los citómetros de flujo la suspensión celular es presurizada y, mediante el enfoque hidrodinámico, son alineadas en una delgada corriente líquida (50-100 micras de diámetro) antes de ser interceptada por un rayo de luz láser. Las señales luminosas generadas por la interacción entre la célula (o partículas celulares) y la luz láser se recolectan por medio de filtros ópticos y fotodetectores (fotodiodo o fotomultiplicadores) lo cual permite determinar el tamaño y complejidad relativa de los elementos analizados. Los citómetros de flujo pueden realizar estudios de tipo multiparamétrico de diferentes características celulares, evaluando promedialmente miles de células o partículas por segundo. A su vez, los clasificadores celulares poseen la capacidad de separar las células de interés en diferentes soportes (tubos, placas de cultivo, portaobjetos) incluso en forma estéril lo que permite el desarrollo de cultivos celulares a partir del conjunto de células clasificadas en base a los parámetros establecidos por el investigador.

Este instrumento, el primero en el país dedicado a investigaciones básicas en biología, constituye el principal equipo del Servicio de Citometría de Flujo y Clasificación Celular (SECIF) del IIBCE. Este avance tecnológico aportó un sólido recurso para analizar poblaciones celulares en el marco de numerosos proyectos de investigación básica en desarrollo tanto en el IIBCE como en otras instituciones académicas. Por otra parte, proyectó a la institución a la sociedad en general, suministrando diferentes tipos de estudios citométricos tanto en el área biomédica como biotecnológica. Cabe destacar que el SECIF ha logrado implementar novedosos métodos de estudios citométricos, particularmente en el campo de la reproducción [ver como ejemplo la cita 63].

Por tanto, nuestro laboratorio de citogenética humana ha sido siempre un ejemplar ámbito de cómo la investigación básica puede contribuir no sólo en el desarrollo de nuevas investigaciones sino también en el entrenamiento de valiosos nuevos científicos, repercutiendo en la práctica de una medicina moderna en Uruguay. Por tanto consideramos que es altamente aconsejable estimular el establecimiento de laboratorios básicos a nivel institucional, dado que contribuyen a lograr diagnósticos mucho más precisos en problemas citogenéticos o genéticos y, por tanto, suministrar un asesoramiento médico más exacto y actualizado sobre enfermedades hereditarias, tornándose, además, en centros de desarrollo de investigaciones de excelencia.

La incorporación de nuevas tecnologías analíticas, como ha sido el caso en nuestro laboratorio con la instalación de un citómetro de flujo y clasificador celular, constituye otro aspecto trascendente para el desarrollo de las investigaciones científicas y la formación de recursos humanos altamente capacitados en nuestro país.

Referencias

1. De Winiwarter H. Études sur la spermatogenese humaine. Arch Biol. 1912;27:91-89.
2. De Winiwarter H, Oguma K. Nouvelles recherches sur la spermatogénèse humaine. 1926. Arch Biol;36:99-166.
3. McClung CE. The accessory chromosomes: sex determinant? Biol Bull. 1902;3:43-84
4. Painter TS. Studies in mammalian spermatogenesis II. The spermatogenesis of man. J Exp Zool. 1923;37(3):291-336. <http://dx.doi.org/10.1002/jez.1400370303>
5. Hsu TC. Human and mammalian cytogenetics. An historical perspective. New York: Springer-Verlag; 1979.
6. Tjio JH, Levan A. The chromosome number of man. Hereditas. 1956;42:1-6.
7. Lejeune J, Gautier M, Turpin R. Étude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. Compte Rendu d'Acad Sci. 1959;248:1721-2.
8. Lejeune J, Lafourcade J, Berger R, Vialatte J, Boeswillwald M, Seringe P, et al. Trois cas de délétion partielle du bras court dun chromosome 5. Compte Rendu d'Acad Sci. 1963;257:3098-102.
9. Lejeune J. Leçon inaugurale. Chaire de Génétique Fondamental. Paris: L'Expansion Scientifique Française; 1965.
10. Lejeune J, Berger R, Rethoré MO. Sur L'endoréduplication selective de certains segments du génome. Compte Rendu d'Acad Sci. 1966;263:1880-2.
11. Lejeune J, Berger R, Lafourcade J, Rethoré MO. La deletion partielle du bras long du chromosome 18. Individualisation d'un nouveau état morbide. Ann Genet. 1966;9:32-8.
12. Lejeune J, Lafourcade J, Berger R, Cruveiller J, Rethoré MO, Abonyi D, et al. Le phénotype: etude des trois cas de chromosomes D en anneau. Ann Gente. 1968 Jun;11(2):79-87.
13. Lejeune J, Rethoré M-O, Dutrillaux B, Martin G. Translocation 8-22 sans changement de longueur et trisomie partielle 8q. Exp Cell Res. 1972 Sept;74:293-5.
14. Lejeune J, Gautier M, Turpin R. Les chromosomes humaines en culture de tissue. Compte Rendu d'Acad Sci. 1959 Jan;248:602-3
15. Patau K, Smith DW, Therman E, Inhorn SL, Wagner HP. Multiple congenital anomaly caused by an extra autosome. Lancet. 1960 Apr;1(7128):789-93.
16. Ramón Guerra AU, Drets ME. Recuento cromosómico en un caso de mongolismo y en un mongólico con anemia aplásica. Arch Ped Urug. 1962;33(4):224-30.
17. Turpin R, Lejeune J. Les chromosomes humains (Caryotype normal et variations pathologiques). Paris: Gautier-Villars; 1965.
18. McClure HM, Belden KH, Pieper WA, Jacobson CB. Autosomal trisomy in a chimpanzee: resemblance to Down's syndrome. Science. 1969;165(3897):1010-2. <http://dx.doi.org/10.1126/science.165.3897.1010>
19. Valencia JI, Grell RF, editores. Proceedings of the IV International Symposium on Genes

- and Chromosomes Structure and Function; 1964 Nov 30-Dec 4; Buenos Aires, Argentina. s.l.: US Department of Health; 1965. (National Cancer Institute Monograph; 18).
20. Rethoré MO, Larget-Piet L, Abonyi D, Boeswillwald M, Berger R, Carpentier S, et al. Sûr quatre cas de trisomie pour le bras court du chromosome 9. Individualisation d'une nouvelle entité morbide. *Ann Génét.* 1970;13(4):217-32.
 21. Ramón Guerra AU, Escande, CL, Mañé Garzón F, Soto, JA, Drets ME. Seudohermafroditismo femenino por hiperplasia adrenal congénita. *Arch Ped Urug.* 1957;28(11):821.
 22. Ramón Guerra AU. Problemas del sexo. Hermafroditismo y pseudohermafroditismo. La hiperplasia córticoadrenal congénita bilateral. XXVII Curso de Perfeccionamiento de Pediatría. Instituto de Clínica Pediátrica y Puericultura "Prof. Luis Morquio"; Montevideo: Uruguay; Instituto de Clínica Pediátrica y Puericultura; 1958. p. 373-439.
 23. Ramón Guerra AU, Queirolo CA, Temesio N. Síndrome de becegeítis grave, moniliasis extensiva e hipogammaglobulinemia familiares. *Arch Ped Urug.* 1958;29(9):618-32.
 24. Ramón Guerra AU, Gomensoro JB, Bauzá CA, Pacheco Olivera M, Zunino E. Enfermedad de Wilson – Westphal Strümpell, cirrosis hepática y síndrome neuropsíquico en dos hermanos de familia consanguínea: comienzo en primera infancia. *Arch Ped Urug.* 1958;29(3):149-66.
 25. Ramón Guerra AU, Drets ME. La importancia de la genética en patología clínica. I. La consanguinidad Montevideo. *Arch Ped Urug.* 1959;30(5):269-83.
 26. Ramón Guerra AU, Drets ME. Aplicación de la genética humana clínica en la morbi-mortalidad del período pre- y perinatal. Causas y prevención de la morbilidad y mortalidad perinatales. Montevideo: Centre Internacional del l'Enfance, Instituto Interamericano del Niño e Instituto de Pediatría; 1960.
 27. Ramón Guerra AU, Bauzá CA, Temesio N, Soto JA, Caillabet E, Korc I, et al. Síndromes de Toni-Debré-Fanconi. *Arch Ped Urug.* 1961;32(6):330-46.
 28. Ramón Guerra AU, Saldún de Rodríguez ML, Bauzá CA, Mañé Garzón F, Soto JA, Drets ME. Disfunción tubular (tubulopatía). Resumen. 5a Jornada Pediátrica Uruguay; 1961; Montevideo, Uruguay; Montevideo: Sociedad de Pediatría del Uruguay, 1961.
 29. Ramón Guerra AU & Drets, ME. Enfermedades y anomalías cromosómicas. XXX Curso de Perfeccionamiento de Pediatría. Instituto de Clínica Pediátrica y Puericultura "Prof. Luis Morquio"; 1961; Montevideo, Uruguay; Montevideo: LIGU; 1961. p. 313-39.
 30. Ramón Guerra AU. Profilaxis y tratamiento de las enfermedades genotípicas. XVII Curso Intensivo de Farmacodinamia y Terapéutica para Graduados Cátedra del Prof. J. J. Estable; 1967 jul 29; Montevideo; s.l.: Delta; 1968. p. 291-5.
 31. Ramón Guerra AU. Sobre la creación de un Departamento de Genética Médica en el Hospital Pediátrico. (Enfermedades genéticamente determinadas) *Arch Ped Urug.* 1975;46(1):48-57.
 32. Ramón Guerra AU. Mentalidad diagnóstica y mentalidad terapéutica. VI Reunión conjunta de las Academias de Medicina del Plata. *Bol Acad Nac Med Urug.* 1984-1985;3-4:123-38.
 33. Di Candia C. Reportaje. Pediatra Alfredo Ramón Guerra: ya tengo noventa años y sigo creyendo que no hay mayor espectáculo que un cielo estrellado. *Búsqueda.* 1994 set 22;759:54-5.
 34. Giamb Bruno G Reportaje. Alfredo Ramón Guerra 90 años de vida: Desafíos Vigentes. *Noticias.* 1994 set;70:39.
 35. Roubaud E. La fecunda y ejemplar trayectoria del Doctor Alfredo U. Ramón Guerra. *El País.* 1994 jul 24:10.
 36. Scarlatto S. Desafiando al tiempo. Dr. Alfredo Ramón Guerra (Homenaje). Reportaje.

- Noticias. 1994 set;70:38-9.
37. Drets ME. Enfermedades y anomalías cromosómicas. XXX Curso de Perfeccionamiento de Pediatría. Instituto de Clínica Pediátrica y Puericultura "Prof. Luis Morquio"; 1961; Montevideo, Uruguay; Montevideo: LIGU; 1961. p.313-40
 38. Hienz HA, Mueller K, Schmid F. Cranio-rhachischisis centaurica. Fortsch Med. 1963;81:477-83.
 39. Caspersson T, Gahrten G, Lindsten J, Zech L. Identification of the Philadelphia chromosome as a number 22 by quinacrine mustard fluorescent analysis . Exp. Cell Res. 1970;63:238-40.
 40. Caspersson T, Zech L, Johansson C, Modest EJ. Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents. Chromosoma. 1970;30(2):215-27.
 41. Caspersson T, Zech L, Johanson C. Differential banding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. Exp Cell Res. 1970 Jun;60(3):315-9.
 42. Pardue ML, Gall JG. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. Science. 1970 Jun 12;168(3937):1356-8.
 43. Arrighi FE, Hsu TC. Localization of heterochromatin in human chromosomes. Cytogenetics. 1971;10(2):81-6.
 44. Drets ME, Shaw MW. Specific banding patterns of human chromosomes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1971 Sep;68(9):2073-7.
 45. Chial H. Cytogenetic methods in diagnosing genetic disorders. Nature Education. 2008;1(1):34.
 46. Drets ME. Una saga citogenética: El descubrimiento de los métodos de bandeo cromosómico. Significado y protección biomédica. Rev Med Urug. 2002;18:107-21.
 47. Dutrillaux B, Lejeune J. Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain . Compte Rendu d'Acad Sci. 1971;272:2638-40.
 48. Drets ME. BANDSCAN—a computer program for on-line linear scanning of human banded chromosomes. Comput Programs Biomed. 1978 Sep;8(3-4):283-94.
 49. Barr ML, Bertram EG. A morphological distinction between neurons of the male and female, and the behavior of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. Nature. 1949 Apr 30;163(4148):676.
 50. Drets ME, Cardoso JH, Navarro A. Sex chromosome Inversion in a mosaic girl. Heredity. 1969;24:477-81. <http://dx.doi.org/10.1038/hdy.1969.63>
 51. Drets, M.E, Navarro A, Ravera JJ, Muxi F & Touyá JJ (1964): Estudio del Cariotipo en algunas disgenesias gonadales. An Facultad Med. 1964;49(3-4):411-6.
 52. Klinefelter HF Jr, Reifenstein EC Jr, Albright F. Syndrome characterized by gynecomastia, aspermatogenesis, without aleydigism and increase excretion of follicle- stimulating hormone. J. Clin. Endocr. 1942;2:615.
 53. Purriel P, Drets M, Pascale E, Sánchez Cestau R, Borrás A, Ferreira WA, de Lucca A, Fernández L. Familial hereditary nephropathy (Alport's syndrome). Am J Med. 1970;49(6):753-73.
 54. Boveri T. Zur frage der entsehung maligner tumoren. Jena: Verlag von Gustav Fischer; 1914.
 55. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human granulocytic leukemia. Science. 1960;132:1488-501.
 56. Baikie AG, Court-Brown WM, Buckton KE, Hardnen DG, Jacobs PA, Tough IM. A possible specific chromosome abnormality in human chronic myeloid leukaemia Nature. 1960 Dec 31;188:1165-6.
 57. Navarrete HD, Bonaba RAE, Drets ME. Primeros estudios cromosómicos en leucemias mieloides crónicas, Significación y aplicación de la detección del cromosoma Philadelphia y otras aberraciones cromosómicas. Rev Med Urug. 1976;2(4):433-39.
 58. Berger R. Leucemie mieloide chronique

- et chromosome Rev Europ Etu Clin Biol. 1970;15:1000-7.
59. Berger R, Busson-Le Coniat M. Centric and pericentric chromosome rearrangements in hematopietic malignancies. *Leukemia*. 1999 May;13(5):671-8.
 60. Drets ME. Francisco Alberto Sáez: primer citogenetista de América Latina. Vida y obra (1898-1976) [Internet]. Montevideo: DIRAC; 2013 [Consultado 2016 febr 26]. Disponible en: http://www.bib.fcien.edu.uy/images/Francisco_Alberto_S%C3%A1ez_portadilla_%C3%ADndice_y_pr%C3%B3logo.pdf
 61. Drets ME, Cardoso H. Kayotyping in Class. *Lancet*. 1968;291(7556):1376. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(68\)92080-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(68)92080-1)
 62. Drets ME. Part II- General Issues in the Region 1: The importance of a basic research laboratory for development, and human resource training in cytogenetics in Uruguay: 36 years of research activity (1960-1996). En: World Health Organization. Medical Genetics Services in Latin America. Report of a WHO Collaborating Centre for Community Genetics and Education [Internet]. WHO, 1998 [consultado 2016 febr 29]. p. 27-8. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/63912/1/WHO_HGN_CONS_MGS_98.4.pdf
 63. Rodríguez CR, Geisinger A. Satiñaque FF, López Carro B, Folle GA. High-purity flow sorting of early meiocytes based on DNA analysis of guinea spermatogenic cells. *Cytometry, Part A*. 2011;(79):625-34.