

Aplicación de la técnica de Alta Resolución Cromosómica en pacientes con alto riesgo para Anomalías Citogenéticas.

Alicia Rojas-Atencio, Liliana Roldán-Paris, Sandra González-Ferrer, Lennie Pineda-Del Villar, Minolfa Prieto-Carrasquero, Griselda García, Richard González, Jenny Cañizalez y Marisol Soto.

Unidad de Genética Médica, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Apartado 15066, Maracaibo, Venezuela.

Palabras claves: Alta resolución cromosómica, anomalías citogenéticas.

Resumen. Desde el inicio de la citogenética los investigadores en el área se dedicaron al mejoramiento en los métodos de cultivo y bandedo cromosómico. En 1976 Yunis describe la técnica de Alta Resolución cromosómica (ARC), mediante la cual es posible detectar anomalías cromosómicas finas. Este trabajo se realiza con la finalidad de reportar la experiencia con la utilización de esta técnica en pacientes con alto riesgo de tener anomalías citogenéticas, en la Unidad de Genética Médica de la Universidad del Zulia en Maracaibo, Venezuela, durante el período 1988 - 1993. Se analizaron 616 muestras de las cuales 434 fueron de sangre periférica y 182 de médula ósea. Las muestras fueron clasificadas en categorías de acuerdo al motivo de referencia y las de médula ósea según el diagnóstico de referencia. En las primeras se encontró el mayor porcentaje de anomalías cromosómicas en la categoría de malformado con o sin retardo mental (22,22%), seguido de retardo mental, autismo y/o X frágil (13,63%) y parejas con trastornos de la reproducción (5,8%). En lo referente a las muestras de médula ósea se encontró el mayor porcentaje de anomalías cromosómicas en pacientes referidos como Leucemia Mieloide Crónica (LMC) (78,43%), seguido de Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) (62,10%), Leucemia Mieloide Aguda (LMA) (61,9%), Síndromes mielodisplásicos (SMD) (43,57%) y Leucemia Linfocítica Crónica (LLC) (14,2%). Se demuestra así la necesidad de la aplicación de la técnica de ARC cuando se está en presencia de situaciones con una alta probabilidad de identificar anomalías cromosómicas finas.

Recibido: 31-05-94. Aceptado: 13-12-94.

INTRODUCCION

El punto de partida de la citogenética humana ocurrió en 1959, cuando Tjio y Levan (17) reportaron que el número de cromosomas humanos era 46. En los siguientes años la introducción de técnicas de cultivo y métodos de bandeado cromosómico, llevaron a la citogenética a ser una disciplina con características propias.

Posteriormente se hizo necesario demostrar alteraciones estructurales más finas, ya que existían numerosos pacientes con retardo mental y/o malformaciones congénitas sin causa cromosómica evidente. En 1977 Yunis describe la técnica de ARC fundamentada en la sincronización de los cultivos celulares con metrotexate (23), la cual permite estudiar los cromosomas en prometafase, visualizándose de esta manera anomalías estructurales más finas a un nivel de 850 a 1.200 bandas por juego haploide de cromosomas. La técnica de ARC ha demostrado su utilidad cuando ha sido aplicada en los estudios citogenéticos comparativos entre especies (5, 9, 25), en la localización de genes (11) y muy especialmente en los estudios para la identificación de anomalías cromosómicas estructurales, responsables de fenotipos de significación clínica (4, 8, 19, 21) y que no son evidenciables mediante técnicas de cultivo convencionales.

Este trabajo se realiza con la finalidad de reportar la frecuencia de anomalías cromosómicas en pa-

cientes con alto riesgo para tener anomalías citogenéticas con la técnica de ARC.

MATERIAL Y METODO

Entre los meses de septiembre de 1988 y noviembre de 1993 se tomaron en la Unidad de Genética Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia en Maracaibo Venezuela, 616 muestras para análisis cromosómico por la técnica de ARC, de ellos 434 fueron de sangre periférica y 182 de médula ósea. Fueron excluidos de este estudio los pacientes referidos con síndromes cromosómicos conocidos o por anomalías de los cromosomas sexuales.

Las muestras de sangre periférica se clasificaron de acuerdo con las siguientes categorías de pacientes: 1.- Malformados con o sin retardo mental, 2.- Retardo mental, autismo y/o X frágil, 3.- Esquizofrénicos, 4.- Parejas con trastornos de la reproducción, 5.- Individuos irradiados. Las muestras de médula ósea se clasificaron de acuerdo al diagnóstico de referencia. La técnica de cultivo en ambos casos fue la técnica de ARC descrita por Yunis en 1976 y 1981 respectivamente (22, 24), la técnica de coloración empleada fue la de bandas G (15).

Para las muestras de sangre periférica se estudiaron entre 30 a 50 metafases por paciente y para médula ósea entre 10 y 30 metafases lo cual dependió de la calidad y cantidad de las mismas. Se consideró

una anomalía estructural cuando estaba presente en dos ó mas metafases y las anomalías cromosómicas numéricas si estaban presentes en tres o mas metafases (27). Las anomalías cromosómicas fueron definidas de acuerdo al sistema internacional de nomenclatura citogenética (ISCN) 1.985 (6).

RESULTADOS

La frecuencia de anomalías cromosómicas encontradas en este estudio fue de 11,9% (52/434) para las muestras de sangre periférica y de 59,34% (108/182) para las muestras de médula ósea.

La Tabla I muestra el número de anomalías cromosómicas encontra-

das en las muestras de sangre periférica; se puede observar que el mayor porcentaje lo constituye la categoría de malformados con o sin retardo mental 22,22% (34/153); en la categoría de retardo mental, autismo y/o X frágil se encontró 13,63% (6/44) de anomalías cromosómicas; las parejas con trastornos de la reproducción presentaron un 5,8%, (12/206) de anomalías cromosómicas y en los 19 pacientes que consultaron por exposición a radiaciones no se detectaron anomalías cromosómicas.

En la categoría de malformados con o sin retardo mental que se presenta en la Tabla II, se observa la pérdida o ganancia de material en alguno de los brazos cromosómicos en el 50% (17/34) de los casos, las

TABLA I

CARIOTIPOS ANORMALES SEGUN CATEGORIA DE PACIENTES.
UNIDAD DE GENETICA MEDICA, UNIVERSIDAD DEL ZULIA,
MARACAIBO, VENEZUELA. SEPTIEMBRE 88 - NOVIEMBRE 93.

Categoría	Número de muestra	Cariotipo anormal	%
Malformados con o sin Retardo Mental	153	34	22.22
Retardo Mental y/o X Frágil, Autismo	44	6	13.63
Esquizofrénicos	12	0	0
Parejas con trastornos en la Reproducción	206	12	5.8
Irradiados	19	0	0
Total	434	52	11.9

TABLA II

MALFORMADOS CON O SIN RETARDO MENTAL. TIPO DE ANOMALIA CROMOSOMICA. UNIDAD DE GENETICA MEDICA, UNIVERSIDAD DEL ZULIA, MARACAIBO, VENEZUELA. SEPTIEMBRE 88 - NOVIEMBRE 93.

Anomalia cromosómica	Numero de muestras	%
Pérdida o ganancia de segmentos cromosómicos	17	50,0
Trisomias libres diferentes al 21, 18 y 13	8	23,5
Traslocaciones aparentemente balanceadas	7	20,6
Anomalías complejas	2	5,8
Total	34	100,0

trisomias diferentes a los cromosomas 21, 13 ó 18 en 23,5% (8/34); las traslocaciones balanceadas en tercer lugar con el 20,6% (7/34) y las anomalías complejas en cuarto lugar 5,8% (2/34).

En la categoría de retardo mental, Autismo y/o X frágil (Tabla III), 67% (4/6) resultaron X frágil, los otros 2, uno presentó una traslocación balanceada entre los cromosomas 17 y 19 y el otro un 22q-.

TABLA III

RETARDO MENTAL Y/O X FRAGIL: TIPO DE ANOMALIA CROMOSOMICA. UNIDAD DE GENETICA MEDICA, UNIVERSIDAD DEL ZULIA, MARACAIBO, VENEZUELA. SEPTIEMBRE 88 - NOVIEMBRE 93.

Anomalia cromosómica	Numero de muestras	%
x Frágil	4	66,7
22 q-	1	16,6
t(17; 19)	1	16,6
Total	6	100,0

En la categoría de parejas con problemas de reproducción, (Tabla IV) 58,3% (7/12) presentaron polimorfismos cromosómicos, 14p+, 15p+, 9qh+, 9 inv y Yq+; 33,3% (4/12) fueron portadores de traslocaciones balanceadas y uno presentó un Yq sat.

cromosómicas. Las mas frecuentes fueron las de tipo estructural 57,6% (15/26), siguiéndole en frecuencia las trisomias 23,07% (6/26), las hiperdiploidías 8,3% (3/36) y las monosomias con 5,5% (2/36).

En el caso de los pacientes referidos con diagnóstico de Leucemia

TABLA IV

HALLAZGOS CROMOSOMICOS EN TRASTORNOS REPRODUCTIVOS.
UNIDAD DE GENETICA MEDICA. UNIVERSIDAD DEL ZULIA,
MARACAIBO, VENEZUELA. SEPTIEMBRE 88 - NOVIEMBRE 93.

Anomalia cromosómica	Numero de muestras	%
Polimorfismos cromosómicos	7	58,3
Traslocaciones balanceadas	4	33,3
Y q satelitado	1	8,3
Total	12	100,0

En lo que respecta a los problemas hematológicos malignos (Tabla V) tenemos que el 62,10% (36/58) de pacientes con Leucemia linfoide aguda (LLA) presentó anomalías cromosómicas, 33,3% (12/36) presentaron hiperdiploidia mayor de 50 cromosomas, 25,0% (9/36) presentaron anomalías estructurales, 16,6% (6/36) presentaron trisomias libres, 13,8% (5/36) hiperdiploidia menor de 50 cromosomas y 11,1% (4/36) presentaron hiperdiploidías.

En los pacientes diagnosticados como Leucemia mieloide aguda (LMA), de los 42 casos referidos, 61,9% (26/42) tenían anomalías

mieloide crónica (LMC), el 78,43% (40/51) presentaron la traslocación clásica 9;22 conocida como cromosoma Filadelfia positivo (Ph+), como única anomalía; el 11,74% (6/51) presentó el cromosoma Ph+ asociado a otras anomalías (iso 17q, 21q-, +12, +8) y en el 9,83% (5/51) no se encontraron anomalías cromosómicas.

En el caso de los Síndromes Mielodisplásicos (SMD), 43,57% (6/14) presentaron anomalías cromosómicas, siendo las mas frecuentes las anomalías de tipo estructural con un 50% (3/6), siguiéndoles las trisomias libres con 33,3% (2/6) y 16,6% (1/6) presentó un 5 q-.

TABLA V

CARIOTIPOS ANORMALES EN ENFERMEDADES HEMATOLOGICAS MALIGNAS. UNIDAD DE GENETICA MEDICA, UNIVERSIDAD DEL ZULIA, MARACAIBO, VENEZUELA. SEPTIEMBRE 88 - NOVIEMBRE 93.

Clase	Numero de Muestras	Cariotipo No.	anormal %
L. Linfoide aguda	58	36	62,1
L. Mieloide aguda	42	2	61,9
L. Mieloide Crónica	51	40	78,4
L. Linfoide Crónica	7	1	14,2
Síndromes Mielodisplásicos	14	5	35,7
Linfoma No-Hodgkin	5	0	0
Linfocitopenia	4	0	0
Hipoplasia medular	1	0	0
Total	182	108	59,3

En las Leucemias Linfoide Crónica (LLC), 14,28% (1/7) presentó anomalías cromosómicas; en el resto de las patologías no se observaron anomalías cromosómicas.

DISCUSION

En 1984, Shwartz (16) señaló las aplicaciones y limitaciones de la técnica de ARC en parejas con abortos espontáneos, donde propuso que este estudio podría estar restringido a 1 ó 2 cromosomas del cariotipo sospechoso de una anormalidad detectada por técnicas convencionales. En 1981, Wyandt (20) utilizando la técnica de ARC discutió sobre la dificultad en demostrar la deleción intersticial de la banda 15q12 en pacientes con síndrome de Prader

Willi, sin embargo, Robinson en 1991 (14), demostró mediante esta técnica la deleción, la cual fue corroborada por técnicas moleculares. Así mismo, Yunis reportó (26, 27, 28, 29, 30) la importancia de la ARC para detectar anomalías cromosómicas en problemas hematológicos malignos y su relación con el pronóstico en estas enfermedades. De igual manera se ha señalado con éxito, en el diagnóstico citogenético de parejas con múltiples abortos espontáneos, donde se reporta la existencia de traslocaciones cromosómicas finas en alguno de los miembros de la pareja, (1, 7, 21).

Las categorías señaladas en este trabajo reúnen a pacientes con alto riesgo para anomalías citogenéticas, el mayor porcentaje de anomalías cromosómicas correspondió al ren-

glón de malformados con ó sin retardo mental (22,22%), donde lo mas frecuentemente observado fue ganancia o pérdida de segmentos cromosómicos; tales anomalías pueden ser mejor definidas si se analizan con esta técnica. Un ejemplo de ello se ilustra en la Fig.1, la cual corresponde a un paciente con malformaciones múltiples y retardo mental y al cual con la técnica convencional no pudo observársele ninguna anomalía cromosómica; posteriormente con la técnica de ARC se evidenció que tenía un segmento extra en el brazo largo del cromosoma 16; al estudiar los padres se comprobó que la madre era portadora de una traslocación balanceada entre los cromosomas 8 y 16, demostrán-

dose que el niño tenía una trisomía parcial del cromosoma 8. En orden de frecuencia le siguió la categoría de retardo mental, autismo y/o X frágil con 13,63%. En el caso de la detección de 4 de 6 pacientes con X frágil, pensamos que aunque en este caso a pesar de no haberse utilizado medios especiales, como es lo habitual creemos que esto fue debido a la utilización del metrotexate para la sincronización celular. Este sitio frágil es dependiente de Acido fólico y el metrotexate actua sobre el metabolismo de este compuesto (3). Las dos anomalías restantes encontradas en los pacientes de esta categoría fueron mejor definidas con la utilización de esta técnica.

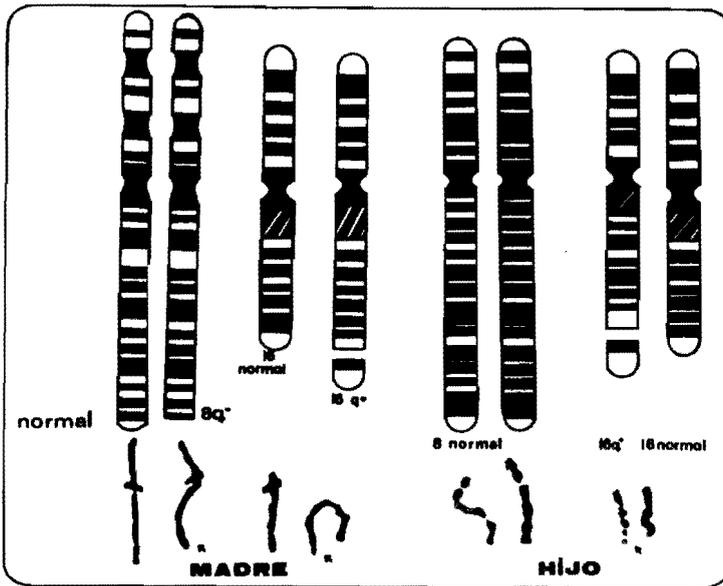


Fig. 1. Detección de anomalía cromosómica por la técnica de ARC. Madre: t(8;16)(q24.2;q24.3). Hijo: trisomía 8q24.2 → qter.

En lo que respecta a la categoría de trastornos de la reproducción, Castle y col. en 1988 (1), utilizando ARC reportaron una frecuencia de anomalías cromosómicas de un 2,33 %, en el análisis de 688 parejas con trastornos de la reproducción. En el trabajo que se presenta, descartando las anomalías reportadas como polimorfismos cromosómicos, nos queda una frecuencia de 2,3% (5/206) similar a la reportada. Aunque esto representa una frecuencia baja de anomalías cromosómicas utilizando esta técnica, pensamos que debe seguir realizándose, sobre todo en aquellas parejas con 2 ó mas abortos espontáneos, donde se hayan descartado las causas obstétricas e infecciosas que son las mas frecuentemente observadas. En este tipo de parejas lo que se reporta principalmente son traslocaciones cromosómicas finas ó inversiones de pequeños segmentos cromosómicos que no sería posible detectar por metodos convencionales (1, 7).

En relación con los problemas hematológicos malignos, estos en su mayoría presentaron anomalías cromosómicas, corroborándose lo reportado en la literatura mundial, (24, 26, 27, 28, 29, 30), así mismo, una proporción importante de las anomalías cromosómicas fueron de tipo estructural, las cuales fueron mejor definidas mediante la ARC. Un análisis detallado de tales hallazgos será objeto de una publicación posterior.

A pesar de la utilidad de la ARC demostrada en este trabajo la indicación de un estudio citogenético

mediante esta técnica requiere justificación; en primer lugar por la necesidad de personal técnico altamente calificado, y en segundo lugar de una gran inversión de tiempo. Estas limitaciones se ven superadas cuando se está en presencia de situaciones con una alta probabilidad de identificar anomalías cromosómicas estructurales finas, como pérdida o ganancia de segmentos cromosómicos, pequeños rearrreglos cromosómicos, así como la definición correcta de los puntos de ruptura y reunión de los mismos. De esta manera y de acuerdo con estos resultados sugerimos que la técnica de ARC debe ser aplicada en los casos de pacientes malformados con retardo mental, donde se hayan descartado los sindromes cromosómicos conocidos, en parejas con trastornos de la reproducción y en pacientes con enfermedades hematológicas malignas.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) por el financiamiento parcial de este trabajo.

A la Dra Maria Diez de Ewald por la elaboración del resumen en inglés.

ABSTRACT

Application of the high chromosomal resolution technique in patients with high risk of cytoge-

netic abnormalities. Rojas-Atencio, A. (Unidad de Genética Médica, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Apartado 15066, Maracaibo, Venezuela), Roldán-Paris, L., González-Ferrer, S., Pineda-Del Villar, L., Prieto-Carrasquero, M., García, G., González, R., Cañizalez J., Soto, M. *Invest Clín* 35(4): 183- 193 1994.

Key words: High chromosomal resolution, cytogenetic abnormalities.

Since the beginning of cytogenetics, there has been a constant improvement of chromosomal culture and banding techniques. In 1976, Yunis described a high chromosomal resolution technique (HRC), that permits the detection of subtle chromosomal abnormalities. The present work, reports the results obtained when HRC was applied to the study of chromosomal abnormalities in patients with high risk of such. The study comprised 434 specimens of venous blood and 182 bone marrow aspirates. The samples were classified according to the presuntive diagnoses. The highest frequency of chromosomal abnormalities, was found in blood samples from patients with physical deformities with or without mental retardation (22,22%), followed by mental retardation autism and/or fragile X chromosome (13,66), and in couples with reproductive disorders (5,8%). In bone marrow, the most frequent abnormalities corresponded to patients with chronic myeloid leukemia (78,43%), acute lymphocytic leukemia (62,10%), acute myeloide leukemia (61,9%),

myelodisplastic syndromes (43,7%) and chronic lymphocytic leukemia (14,2%). The present results stress the need to apply the HRC technique when the probability of minute chromosomal abnormalities is high.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- CASTLE D., BERNSTEIN R.: Cytogenetic Analysis of 688 couples experiencing multiple spontaneous abortions. *Am J Med Genet* 29:549-556, 1988.
- 2- CASPERSON T., LECH L.: Chromosome identification. Nobel Symposia. New York, Academic Press, 1973.
- 3- FUSTER C., MIRO R., TEMPLADO C., BARRIOS L., EGOZARE J.: Express of Folate-Sensitive fragile sites in lymphocyte chromosomes. *Hum Genet* 81:243-246, 1989.
- 4- HOOJ., SOE.: Routine applications of high Resolution Chromosome Analysis. *Am J Hum Genet* 24:533-537, 1986.
- 5- IANNUZZIL., GUSTAVSSON I., DIMEO G.P.: High resolution studies on late replicating segments (G + C bands) in mammalian chromosomes. *Hereditas* 110:43-50, 1989.
- 6- ISCN (1985): An international system for human cytogenetic nomenclature, Harnden DG, Klinger HP (eds); published in collaboration with Cytogenet Cell (Basel: Karger, 1975); also in *Birth Defects* 21(1) (March of Dimes Birth Defects Foundation, New York 1985).

- 7- KROISEL P.M., ROSENKRANZ W.: High Resolution banding of an unusual reciprocal translocation in recurrent abortions. *Clin Genet* 37(3):230-234, 1990.
- 8- LATOS A., HAMEISTER H.: Higher Resolution banding techniques in the clinical routine. *Clin Genet* 33:325-330, 1988.
- 9- LEMIEUX N., DROWIN R., RICHER C.: High Resolution dynamic and morphological G banding (GBG and G + S): a comparative study. *Hum Genet* 85(3):261-266, 1990.
- 10- LEMIEUX N., RICHER C.: Chromosome evolution and High Resolution analysis of leukocytes, bone marrow and tumor cells of retinoblastoma patients. *Am J Med Genet* 36(4):456-462, 1990.
- 11- LEWADOWSKI R.C., YUNIS J.J.: Phenotypic mapping in man. In Yunis, J.J. (Ed) *New Chromosomal Syndromes. Chromosomes in Biology and Medicine Monograph Series*. New York. Academic Press, pp 369-394, 1977.
- 12- MOORHEAD P.S., NOWELL P.C., MELLMAN W. *et al.*: Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res* 20:613-616, 1960.
- 13- PRIGOGINA E.L., FLEISHMAN E.W., PUCHKOVA G.P.: Chromosomes in Acute Nonlymphocytic Leukemia. *Hum Genet* 73:137-146, 1986.
- 14- ROBINSON W., BOTTANI A., YANG X.: Molecular, cytogenetic and clinical investigation of Prader-Willi Syndrome Patient. *Am J Hum Genet* 49:1219-1234, 1991.
- 15- SEABRIGH M.: A rapid banding technique for human chromosome. *Lancet* 2:971-972-, 1971.
- 16- SCHWARTZ S., ALMER C.: High Resolution Chromosome analysis: Applications and Limitations. *Am J Med Genet* 19:291-296, 1984.
- 17- TJIO J.H., LEVAN A.: The chromosome number of man. *Hereditas* 42:1-6, 1959.
- 18- TRASK B., VANDENENG G.: Chromosome heteromorphism quantified by High Resolution Bivariate flow karyotyping. *Am J Hum Genet* 45(2):739-752, 1989.
- 19- TREEMBERG F., ELDER F., HAFFNER P.: Cytogenetic Findings in a prospective series of patients with D. George Anomaly. *Am J Hum Genet* 43:605-611, 1988.
- 20- WYANDT H.E., PATIL S., SHAH H.: Problems in the detection of 15q deletions in patients with Prader-Willi Syndrome. *Am J Hum Genet* 33:177 A, 1981.
- 21- YANG F.T., FINLEY S.C., FINLEY W.H., FRANKE U.: High Resolution cytogenetic evaluation of couples with recurring fetal wastage. *Hum Genet* 69:246-249, 1985.
- 22- YUNIS J.: High Resolution of Human Chromosome. *Science* 191:1268-1270, 1976.
- 23- YUNIS J., CHANDLER M.S.: High Resolution Chromosome Analysis in Clinical Medicine. *Clin Pathol*. Vol VII, p 267-288 Grune & Stratton Inc. 1977.

- 24- YUNIS J.: New chromosome techniques in the study of human neoplasia. *Hum Patol* 12(6):540-551, 1981.
- 25- YUNIS J., PRAKASH O.: The origin of man: A chromosomal pictorial legacy. *Science* 215:1525-1530, 1982.
- 26- YUNIS J.: Clinical significance of High Resolution chromosomes in the study of acute leukemias and non Hodgkin's lymphomas. *Cur Hematology* vol 3. 353-374, 1984.
- 27- YUNIS J., BRUNNING R., HOWE R., LOBELL M.: High Resolution Chromosomes as an independent prognostic indicator in adult acute nonlymphocytic leukemia. *New Eng J of Med* 311:812-818, 1984.
- 28- YUNIS J., LOBELL M., ARNENSEN M.A., OKEN M.M., MAYER M.G., RYDELL R.E., BRUNNING R.D.: Refined chromosome study helps define prognostic sub groups in most patients with primary myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia. *Br J Haematol* 68:189-194, 1988.
- 29- YUNIS J.: High Resolution chromosomes analysis in the prognosis and clinic evolution of "de novo" myelodysplasia. *Haematological* 72(Sup 6)34-36, 1987.
- 30- YUNIS J., RYDELL R.E., OKEN M.M., ARNENSEN M.A., MAYER M.G., LOBELL M.: Refined chromosome analysis is an independent prognostic indicator in de novo myelodysplastic syndromes. *Blood* 67:1721-1730, 1988.