

Alteraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica

ANDRÉS ESTAY F.¹, ROXANA PARRA L.², HUGO BENÍTEZ C.³

1. Tecnólogo Médico, Citogenetista. Unidad de Anatomía Patológica, Hospital Clínico Regional de Antofagasta.

2. Tecnólogo Médico. Unidad de Anatomía Patológica, Hospital Clínico Regional de Antofagasta.

3. Médico Anatomopatólogo. Unidad de Anatomía Patológica, Hospital Clínico Regional de Antofagasta.

ABSTRACT

Chromosomic alterations in peripheral blood lymphocytes

Background: The chromosomic alterations prevalence is about 1% at birth; therefore, cytogenetics is an important tool for the Neonatology and Pediatrics Units at all health centers. **Objective:** Evaluate cytogenetics studies performed at the Pathology Unit in the Hospital of Antofagasta between 1997 and 2006. **Method:** Evaluation of 534 chromosome analysis results in peripheral blood lymphocytes obtained from patients belonging to the Neonatology and Pediatrics Units from Hospital Regional of Antofagasta. The sample included newborn, infants, pre-scholars and scholars with Down Syndrome, congenital malformations, dysmorphic syndromes and other genetic alterations. An optical microscope and international nomenclature (ISCN) were used; chromosome analysis included 35 or more mitosis per case. **Results:** 22,50% (n = 120) of exams showed chromosome alterations: 76,67% of these cases were numerical alterations and 23,33% corresponded to structural alterations. **Conclusions:** In the studied population, the cytogenetics study is an important tool together with clinical aspects, especially regarding genetic counsil. **(Key words:** chromosome alterations, genetics, mitosis, cytogenetics).

Rev Chil Pediatr 2007; 78 (4): 363-368

RESUMEN

La prevalencia estimativa de las alteraciones cromosómicas en el nacimiento es de alrededor de 1%, por esta razón es que la citogenética se ha transformado en una herramienta importante para el equipo de Neonatología y Pediatría de cualquier servicio hospitalario. **Objetivo:** Evaluar los estudios citogénicos realizados en el servicio de Anatomía Patológica de Hospital de Antofagasta entre los años 1997 y 2006. **Paciente y Métodos:** Se evaluaron 534 análisis cromosómicos en linfocitos de sangre periférica obtenidos en el Hospital de Antofagasta, de los Servicios de Pediatría y Neonatología. La muestra incluyó a recién nacidos lactantes, preescolares y escolares con síndrome de Down, malformaciones congénitas, síndrome dismórfico, ambigüedad genital, genopatías en estudio y otras. Se usó un microscopio óptico y el análisis cromosómico incluyó un mínimo de 35 mitosis por caso, se utilizó la nomenclatura internacional ISCN.

Trabajo recibido el 27 de noviembre de 2006, devuelto para corregir el 25 de enero de 2007, segunda versión el 1 de junio de 2007, aceptado para publicación el 25 de junio de 2007.

Correspondencia a:

Andrés Estay Freire

E-mail: manueelfreire@vtr.net

Resultados: Un 22,50% (n = 120) de los exámenes mostraron alteraciones cromosómicas, de estos casos un 76,67% fueron alteraciones numéricas y 23,33% correspondieron a alteraciones estructurales. **Conclusión:** El estudio citogénico ha resultado de gran importancia como complemento de la clínica, y especialmente en relación al consejo genético, en la población estudiada.

(**Palabras clave:** alteraciones cromosómicas, genética, mitosis, citogenética).

Rev Chil Pediatr 2007; 78 (4): 363-368

Introducción

En la medida en que la desnutrición infantil y las enfermedades infecciosas se han podido controlar, las enfermedades genéticas han adquirido mayor relevancia. Desde principios de los años 80 adquieren importancia, como causantes de mortalidad infantil, las afecciones asociadas a bajo peso al nacer y las alteraciones cromosómicas como causa de malformaciones congénitas¹.

La prevalencia estimativa de alteraciones cromosómicas en el nacimiento es de alrededor de 1% y los pacientes con estas anomalías presentan múltiples dismorfias y malformaciones, que en algunos casos son sugerentes de un síndrome conocido y en otros, debido a la variabilidad del fenotipo y la severidad de sus malformaciones, pueden corresponder a alteraciones tan diversas como las posibilidades de reordenamientos cromosómicos². Esto hace que el estudio de estas patologías sea un reto para el equipo dedicado a la Neonatología y la Pediatría.

Algunos de los principales fundamentos para pedir estudio cromosómico en linfocitos de sangre periférica es comprobar la presencia de aberraciones citogenéticas en pacientes con manifestaciones clínicas de síndromes cromosómicos clásicos (trisomías 13, 18 y 21, por ejemplo), para encontrar la posible causa de malformaciones congénitas múltiples, ambigüedad genital, talla baja, retraso del desarrollo psicomotor y retraso mental, entre otros³.

En el año 1997, frente a la creciente necesidad de hacer estudio del cariotipo en pacientes que lo requerían, se implementó en la ciudad de Antofagasta el estudio cromosómico en linfocitos de sangre periférica, como una prestación más de la Unidad de Anatomía Patológica del

Hospital Clínico Regional de Antofagasta. El objetivo del presente trabajo es mostrar los resultados obtenidos en los estudios cromosómicos realizados desde agosto de 1997 hasta junio de 2006.

Pacientes y Método

En nuestro Hospital el estudio citogenético en linfocitos de sangre periférica es solicitado principalmente por los servicios de Neonatología y Pediatría, por lo que los sujetos de este estudio corresponden principalmente a recién nacidos, lactantes, preescolares y escolares con diagnósticos de síndrome de Down, múltiples malformaciones congénitas, síndrome dismórfico, ambigüedad genital, genopatía en estudio, retraso del desarrollo psicomotor, retraso mental, trastorno de aprendizaje, talla baja e hipogonadismo. En menor medida los casos corresponden a pacientes derivados por el servicio de Ginecología, escolares y adolescentes con diagnósticos de síndrome de Turner, talla baja en estudio, falla puberal y amenorrea primaria. Aquellos pacientes con sospecha de síndromes cromosómicos que requerían citogenética molecular (Ej: síndrome de X frágil, síndrome de Prader Willi), fueron derivados a centros que poseen dichas técnicas. También se les realizó estudio cromosómico a los padres de pacientes con alteraciones estructurales que aceptaron hacerse este examen.

La metodología para la obtención del cariotipo del paciente se realiza a partir del cultivo de linfocitos usando 1-5 ml de sangre periférica heparinizada (tomada en frasco "vacutainer" tapa verde con heparina sódica). En ambiente estéril, se siembran aproximadamente 0,5 ml de sangre en medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco

BRL) suplementado con 20% de suero bovino fetal (Gibco BRL) y 0,05 ml de fitohemaglutinina (Gibco BRL) y luego se incubó por 72 horas a 37°C. Una vez que el cultivo ha alcanzado el crecimiento adecuado, se detiene el ciclo celular en metafase al impedir la formación del huso mitótico con la adición de colchicina (Karyomax Colcemid, Gibco BRL). Posteriormente, las células son sometidas a un shock hipotónico con KCl (0,075 M) y fijadas en metanol-ácido acético (3:1). El pellet celular resultante de este proceso es goteado sobre cinco portaobjetos limpios por caso. Para el análisis microscópico las muestras son teñidas con método de bandeado G de rutina.

Se utiliza microscopio óptico para el conteo y el análisis cromosómico de un mínimo de 35 mitosis por caso (50 a 100 mitosis en aquellos con sospecha de mosaico cromosómico). Se fotografían las cuatro mejores metafases analizadas para posteriormente ampliarlas con el fin de recortar los cromosomas y armar el cariotipo de cada una de ellas, empleando la nomenclatura del sistema internacional ISCN⁴.

Resultados

Entre agosto de 1997 y junio de 2006 se hicieron 534 análisis cromosómicos en linfocitos de sangre periférica. De ellos, 120 casos (22,5%) fueron alterados, observándose un 76,67% (n = 92) de alteraciones numéricas y un 23,33% (n = 28) de alteraciones estructurales.

El 57,5% (n = 69) de las alteraciones corresponden a trisomía 21, de las cuales hay sesenta y dos casos con trisomía 21 libre total, un caso de trisomía 21 libre en mosaico, dos casos de trisomía 21q por isocromosoma 21q y

tres casos (una madre y sus dos hijos) de trisomía 21q por translocación (14;21). En estos últimos la madre presenta la alteración desbalanceada en mosaico, cuya línea celular alterada está en 12% de las mitosis analizadas. Además, existe un caso de doble trisomía en mosaico, que presenta dos líneas celulares, una línea con 48 cromosomas con una trisomía 21 acompañada de una trisomía X, y la otra línea únicamente con la trisomía X.

Las otras alteraciones relacionadas con trisomías autosómicas observadas son: siete casos de trisomía 18 (5,83%), cuatro de ellos con trisomía 18 libre total, dos casos de trisomía 18 libre en mosaico y un caso de trisomía 18q y monosomía 18p por isocromosoma 18q también en mosaico; seis casos de trisomía 13 (5%), cinco de ellos con trisomía 13 libre total y un caso de trisomía 13q por isocromosoma 13q; dos casos de trisomía 8 libre en mosaico y un caso de trisomía 1 libre en mosaico. También se observaron tres pacientes con cromosomas marcadores adicionales (2,5%).

El 12,5% de las alteraciones afectan a los cromosomas sexuales. De ellos, once casos presentan diferentes formas de monosomía X (síndrome de Turner). Hay tres casos relacionados con síndrome de Klinefelter (dos con cariotipo 47,XXY y uno con cariotipo 49, XXXXY) y un caso con cariotipo 47,XYY.

También, se observó un misceláneo de otras alteraciones estructurales que alcanzan al 14,17% (n = 17) de los casos alterados. De estos, trece corresponden a alteraciones desbalanceadas y cuatro son translocaciones balanceadas. En la figura 1 se muestran algunos ejemplos de estas alteraciones.

El detalle de todos los casos se muestran en la tabla 1.

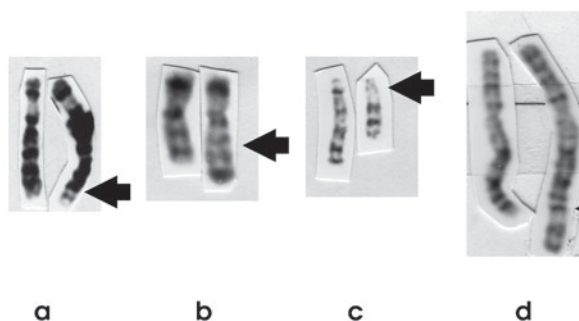


Figura 1. Ejemplos de algunas alteraciones estructurales detectadas en los casos estudiados.

- a) der (6)t(6;22)(q27;q11.1)
- b) dup (20)(q12q13.1)
- c) del (13)(q12q14)
- d) der (2)t(1;2)(q32;q37).

Tabla 1. Alteraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica en Hospital Regional de Antofagasta (agosto de 1997 – junio de 2006)

Alteraciones	n	%	Descripción
Trisomía 21	69	57,5	62 casos trisomía libre total 01 caso trisomía libre en mosaico 03 casos por t(14;21) 46,XX,der(14;21)(q10;q10),+21 mat * 46,XY,der(14;21)(q10;q10),+21 mat * 46,XX,der(14;21)(q10;q10),+21[12]/46,XX[88] * 02 casos por i(21)(q10) cpn 01 caso 48,XXX,+21[23]/47,XXX[12]
Trisomía 18	07	5,83	04 casos trisomía libre total 02 casos trisomía libre en mosaico 01 caso por i(18)(q10) en mosaico
Trisomía 13	06	5	05 casos trisomía libre total 01 caso por i(13)(q10) cpn
Otras trisomías	03	2,5	02 casos trisomía 8 en mosaico 01 caso trisomía 1 en mosaico
Cromosomas marcadores	03	2,5	01 caso en 100% de mitosis 02 casos en mosaico
Cromosomas sexuales	15	12,5	05 casos 45,X 01 caso 45,X[21]/46,X,r(X)(p22q12)[14] 01 caso 45,X[14]/46,X,r(X)(p11q21)[11] 01 caso 45,X[38]/47,XXX[22] 01 caso 45,X[24]/46,XY[26] 01 caso 46,X,del(X)(q12) 01 caso 46,X,i(X)(q10) 02 casos 47,XXY 01 caso 47,XYY 01 caso 49,XXXXY
Misceláneo de otras alteraciones estructurales	17	14,17	46,XX,t(1;2)(q32;q37) ** 46,XX,t(1;2)(q32;q37)mat ** 46,XX,der(2)t(1;2)(q32;q37)mat ** 46,XX,t(2;6)(q33;q27) *** 46,XX,der(6)t(2;6)(q33;q27)mat *** 45,XX,der(6)t(6;22)(q27;q11),-22 sep 46,XY,dup(8)(p12p22) sep 47,XY,+idic(9)(q13)[52]/46,XY[8] sep 46,XX,der(9)inv(9)(q12q21)dup(9)(q21) cpn 46,XX,add(10)(q26) cpn 46,XX,del(13)(q12q14) sep 46,XX,del(13)(q21q31) sep 46,XX,t(18;21)(q12;q11) **** 46,XX,der(18)t(18;21)(q12;q11)mat **** 47,XY,+i(18)(p10) sep 46,XX,dup(20)(q12;q13.1) sep 47,XX,+der(?)t(?)Y(?)q11.2) cpn
	120	100	

*madre y dos hijos, ** madre y dos hijos, *** madre e hijo, **** madre e hijo
sep: sin estudio de padres cpn: cariotipo de padres normal

Discusión

Es de mucha importancia conocer la experiencia de los diferentes laboratorios que realizan diagnóstico citogenético, más aún si se trata de hospitales como el nuestro que se encuentran tan alejados del resto del país. Sin embargo, se hace difícil comparar los resultados obtenidos en cada uno de ellos, ya que presentan realidades distintas en relación al tipo de pacientes que son examinados y a los criterios de derivación empleados por los profesionales que solicitan el examen. La comparación de frecuencias encontradas en la literatura médica de aberraciones cromosómicas es muy difícil, principalmente porque las poblaciones descritas no son en general comparables. Además, en Chile no se tiene un registro de los casos con sospecha clínica que derivan al estudio cromosómico ni de las alteraciones cromosómicas encontradas². Es así que dependiendo de la población estudiada se observan resultados muy variables en el porcentaje de casos alterados. Por ejemplo, el laboratorio de Citogenética de la Clínica las Condes el año 1999, presentó un 16,7% de alteraciones cromosómicas en un grupo de pacientes compuestos principalmente por adultos referidos por pérdida reproductiva, disgenesia gonadal y menopausia precoz, e infantes referidos por síndrome de Down y otros diagnósticos⁵. En el otro extremo, se encuentran estudios como el presentado por el Servicio de Genética del Hospital Clínico de la Universidad de Chile el año 2000, en el que se observó un 53% de casos alterados en una población muy seleccionada de recién nacidos vivos⁶.

En nuestro trabajo, la población estudiada corresponde en su gran mayoría a recién nacidos, lactantes, preescolares y escolares, además de un grupo de padres de pacientes con alteraciones cromosómicas estructurales. Se encontraron 120 casos alterados (22,5%) de un total de 534 exámenes realizados. De las alteraciones encontradas, el 76,67% son numéricas y el 23,33% son estructurales.

Se observaron 69 casos con trisomía 21, que son la mayoría de las alteraciones detectadas (57,5%), esto y la proporción entre trisomía 21 libre total y en mosaico y trisomía 21 por

translocación, es comparable a otros estudios realizados en población general⁷. Aunque la trisomía 21 sea fácilmente reconocible por el médico tratante, es muy importante hacer estudio cromosómico a todos los pacientes que presentan el fenotipo sospechoso de este síndrome, principalmente porque esto permite confirmar la presencia de la alteración cromosómica y detecta aquellos casos potencialmente heredables, situación en la que se hace necesario estudiar a los progenitores⁸. En nuestro estudio, de todos los pacientes referidos con diagnóstico clínico de síndrome de Down, dos casos tenían un cariotipo normal y tres casos tenían otra alteración cromosómica distinta de la trisomía 21.

Aunque por poco margen, la trisomía 18 (n=7) es superior en aparición a la trisomía 13 (n=6), esto también es comparable a los estudios realizados en población general^{2,9}. También se observaron dos casos de trisomía 8 libre en mosaico, un caso de trisomía 1 libre en mosaico y tres pacientes con cromosomas marcadores adicionales.

El 12,5% (n=15) de las alteraciones afectan a los cromosomas sexuales. La mayoría (n=11) son diferentes formas de monosomía X en las que cerca del 50% presentan el cariotipo característico 45, X y el resto comprende variantes estructurales y en mosaico. Estos datos también son comparables con otros estudios^{10,11}.

El 14,17% (n=17) de los casos alterados corresponden a un misceláneo de alteraciones estructurales que involucran a distintos cromosomas, sin observarse una tendencia marcada de aberraciones en ninguno de ellos.

En algún momento esperamos contar con el apoyo de alguna técnica citogenética molecular, como por ejemplo, las sondas subteloméricas para el diagnóstico de alteraciones cromosómicas causantes de retraso mental. En las alteraciones que involucran a los telómeros la dificultad diagnóstica radica en que el tamaño y patrón de bandas de estas regiones cromosómicas son muy similares, lo que hace difícil la visualización de translocaciones u otras alteraciones demasiado pequeñas. En sólo el 50% de los pacientes con retraso mental se conoce la causa etiológica y la citogenética convencional detecta alteraciones cromosómicas en alrede-

dor del 5% de los pacientes con retraso mental de causa desconocida¹². Actualmente, gracias a la citogenética molecular, se ha demostrado que las alteraciones subteloméricas son causa de alrededor del 10% de los retrasos mentales de etiología indeterminada¹². De los 534 exámenes incluidos en este trabajo, el 8,61% (n = 46) de los pacientes fueron referidos con diagnóstico de retraso mental de causa desconocida, cinco de estos casos presentaron algún tipo de alteración estructural y el resto tenía un cariotipo sin alteraciones evidentes.

Desde el momento en que se implementó el análisis citogenético en linfocitos de sangre periférica en nuestro hospital, se ha hecho evidente la gran utilidad de contar con este examen como apoyo a la clínica y principalmente como un aporte importante en el consejo genético, siendo el estudio citogenético fundamental al momento de aclarar el origen del fenotipo alterado del paciente, ayudando a evaluar el impacto que tendrá en la futura descendencia¹³.

Agradecimientos

A María Angélica Alliende y Bianca Curotto, citogenetistas del laboratorio de genética del INTA de la Universidad de Chile, quienes siempre están dispuestas a aconsejar cuando la complejidad de un caso requiere de ojos expertos.

A los pediatras Dra. María E. Birke y Dr. Antonio Cárdenas, por ser los principales gestores de la implementación del estudio cromosómico en linfocitos de sangre periférica en nuestro Hospital.

Referencias

- 1.- Szot J: Mortalidad infantil por malformaciones congénitas: Chile, 1985-2001. *Rev Chil Pediatr* 2004; 75: 347-54.
- 2.- Nacer J, Antolini M, Juárez M, et al: Prevalencia al nacimiento de aberraciones cromosómicas en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile: período 1990-2001. *Rev Méd Chile* 2003; 131: 651-8.
- 3.- Meneghello J: Editor. *Diálogos en Pediatría VIII*. Ed Mediterráneo; 1994: 176-91.
- 4.- Mitelman F: *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature* ISCN. Karger Editores. 1º Ed 1995.
- 5.- Be C, Velásquez P, Youlton R: Laboratorio de citogenética: Experiencia de 15 años. *Rev Med Clínica Las Condes* 1999; 10(1) falta paginas. Disponible en: <http://www.clinicalascondes.cl/>
- 6.- Daher V, Pardo A, Aravena T, et al: Análisis citogenético en 643 recién nacidos. Resúmenes de trabajos XL Congreso Chileno de Pediatría y I Congreso Chileno de Adolescencia. *Rev Chil Pediatr* 2000; 71: 520-67.
- 7.- Santos M, Morizon G: Síndrome de Down. *Pediatría al día* 1999; 15: 29-33.
- 8.- Astete C, Youlton R, Castillo S, Be C, Daher V: Análisis clínico y citogenética en 257 casos de síndrome de Down. *Rev Chil Pediatr* 1991; 62: 99-102.
- 9.- Aracena M: Cardiopatías congénitas y síndromes malformativos genéticos. *Rev Chil Pediatr* 2003; 74: 426-31.
- 10.- Castillo T, Tobella L, Salazar S, et al: Alteraciones cromosómicas en niños referidos para estudio citogenético. *Rev Chil Pediatr* 1994; 65: 210-4.
- 11.- Román R, Vallejos M, Muñoz M, et al: Síndrome de Turner: crecimiento y descripción clínica en 83 niñas chilenas. *Rev Méd Chile* 2002; 130: 977-84.
- 12.- Ureta P, Curotto B, Alliende M, Cortés F: Detección de aberraciones subteloméricas en pacientes con retraso mental de etiología desconocida. Resúmenes XXXIX Reunión anual de la Sociedad de Genética de Chile 2006; 1: 67.
- 13.- Castillo S: Consejo genético. *Rev Chil Pediatr* 1993; 64: 34-7.