

GENÈTICA I PATOGÈNIA: CITOGENÈTICA

MÍRIAM GUITART

Secció Genètica-Immunologia, Servei Laboratori,
Consorci Hospitalari del Parc Taulí, Sabadell

INTRODUCCIÓ

Les anomalies cromosòmiques constitucionals són responsables de 60 o més síndromes, essent més freqüents que totes les malalties mendelianes. S'estima que aproximadament en un 0,7-0,9% dels naixements, en un 2% de tots els embarassos de dones de més de 35 anys, i en més del 60% de tots els avortaments espontanis de primer trimestre, es presenten alteracions cromosòmiques.

Les alteracions cromosòmiques són numèriques o estructurals i poden afectar tant els cromosomes autosòmics com els sexuals. Les alteracions numèriques més freqüents corresponen a les aneuploidies que inclouen majoritàriament trisomies i monosomies, completes o parcials. En les anomalies estructurals es troben implicats un o més cromosomes. Quan hi ha només un cromosoma trobem delecions, duplicacions, inversions, i les anomalies més freqüents entre dos cromosomes són les translocacions recíproques, i les translocacions robertsonianes (entre cromosomes acrocèntrics).

Una quantitat anòmala de material genètic existent en el zigot pot distorsionar el patró normal de creixement durant l'embriogènesi i la morfogènesi intrauterina. Moltes de les anomalies cromosòmiques, trisomies i sobretot monosomies, tenen un efecte letal sobre el fetus donant lloc de forma precoç o més tardanament a un avortament. La trisomia és l'anomalia més freqüent amb una incidència del voltant de 0,5% en nascuts vius i del 24% en avortaments espontanis, i és la que determina una malaltia clínica més significativa. Les aneuploidies es produeixen com a conseqüència d'una no disjunció (separació anòmala dels cromosomes) durant la divisió cel·lular en la meiosi I o meiosi II. Mitjançant marcadors en el DNA s'ha demostrat que els errors durant la primera divisió meiótica materna són els responsables del 70-80% de les trisomies.

No es coneix la causa de no disjunció meiótica, però està comprovat que incrementa amb l'edat de la mare. Per exemple la incidència de la síndrome de

Down, trisomia 21, augmenta considerablement a partir dels 35 anys. I és a partir d'aquesta edat que es recomana un estudi citogenètic prenatal per determinar la presència d'una aneuploïdia en el fetus.

Les anomalies numèriques s'originen amb més freqüència durant l'oogènesi mentre que les anomalies estructurals succeeixen durant l'espermatogènesi.

Quan la no disjunció esdevé després de la fecundació, es produeix un mosaïcisme en cèl·lules somàtiques essent els més freqüents els que impliquen els cromosomes sexuals.

Al voltant del 80% dels mosaïcismes s'originen a partir d'un zigot anòmal, generalment una trisomia. En les primeres divisions una no disjunció pot produir una pèrdua d'un cromosoma i això dona lloc a una cèl·lula diploide. Segons el cromosoma perdut, la línia cel·lular pot tenir un cromosoma de cada progenitor, o pot succeir que tots dos siguin del mateix progenitor produint una disomia uniparental. Quan la línia trisòmica queda limitada a un teixit extraembrionari es forma un mosaic confinat a la placenta amb un embrió cromosòmicament normal, que en alguns casos ha estat associat a retard de creixement.

A més de les anomalies constitucionals esmentades, hi ha anomalies adquirides, tan estructurals com numèriques, associades a processos neoplàstics. Està acceptat que aquestes anomalies tenen importància tant en l'establiment com en la progressió del tumor. Els punts de trencament, en aquestes alteracions, no estan distribuïts a l'atzar pel genoma sinó que apareixen localitzats en regions cromosòmiques específiques.

Segons una hipòtesi recent, algunes neoplàsies podrien tenir l'origen en trisomies derivades d'una no disjunció meiòtica i posteriorment confinades a un determinat teixit, doncs algunes trisomies s'han trobat freqüentment associades a un desenvolupament neoplàstic específic.

TÈCNiques CITOGÈNÈTIQUES

La millora de les tècniques citogenètiques com l'obtenció de cromosomes d'alta resolució (aproximadament 800 bandes per dotació haploide) permet determinar reorganitzacions petites, duplicacions i delecions, de 2000 a 3000 kb de la cadena de DNA. No obstant, el gran avenç ha estat amb la introducció de la citogenètica molecular. La tècnica d'hibridació in situ distingeix l'estructura cromosòmica amb un nivell de resolució, de menys de 1000 kb, molt superior al de les tècniques citogenètiques convencionals.

Aplicant la tècnica d'hibridació in situ es poden localitzar seqüències específiques del DNA dins del cromosoma facilitant la identificació de: microdelecions i material addicional, alteracions numèriques, sexe cromosòmic útil per al diagnòstic prenatal de malalties lligades al cromosoma X, petites translocacions, l'origen de cromosomes marcadors (fragments cromosòmics de difícil identificació), com també precisar els cromosomes implicats en una reorganització. Un altre avantatge que presenta aquesta tecnologia és la possibilitat d'analitzar nuclis interfàsics i un major nombre de cèl·lules, que és

especialment útil per a determinar el percentatge d'anomalies en casos de mosaïcisme. També es poden localitzar gens com oncogens i gens associats a síndromes determinades per un únic gen.

Aquesta tècnica es basa fonamentalment en la utilització de sondes, segments de DNA, que poden hibridar amb seqüències úniques de 15 a 150 kb localitzades en gens específics, amb seqüències altament repetitives localitzades en regions centromèriques i amb cromosomes sencers, sobre extensions cromosòmiques o en tot tipus de material fixat en un portaobjectes. Aquesta tècnica no substitueix, però, l'estudi cromosòmic convencional, ja que en la major part dels casos la sospita d'una anomalia permet elegir la sonda adequada.

MALFORMACIONS CONGÈNITES DEGUDES A ANOMALIES AUTOSÒMIQUES

Algunes de les alteracions dels cromosomes autosòmics viables, com la trisomia 21, i altres trisomies o monosomies parcials, són compatibles amb la supervivència. La seva freqüència és de 1 cada 800 nounats. La major part de les aneuploidies es tradueixen clínicament en un fenotip dismorfològic variable i malformacions múltiples congènites en el naixement. En una major freqüència hi ha afectació craneofacial i el retard mental és gairebé una característica invariable donat que el cervell és un dels òrgans més vulnerables a qualsevol mínima alteració cromosòmica. Les anomalies cardiovasculars estan incrementades quatre vegades respecte a la població general, essent-ne la més freqüent la comunicació interventricular.

Hi ha un patró de malformacions característic en algunes síndromes, com la síndrome de Down (trisomia 21) amb un perfil facial aplanat, obertures palpebrals oblíquies, braquicefalisme, plec simiesc palmar i clinodactília; la síndrome de Patau (trisomia 13) amb microftàlmia, llavi i fenedura palatina, polidactília i orelles d'implantació baixa i peus en piolet; la síndrome d'Edwards (trisomia 18) amb microcefàlia i dolicocefàlia, obertures palpebrals horitzontals i curtes, sobreposició dels dits de les mans el tercer sobre el cinquè, i hipertonia generalitzada. No obstant, en d'altres, com la síndrome del Crit du chat (5p-), la síndrome de Wolf Hirschhorn (4p-) i aneuploidies parcials, hi ha una gran variabilitat clínica de difícil diagnòstic.

Les malformacions o anomalies menors més freqüents corresponen a les extremitats, principalment les mans. En general hi ha un predomini de les malformacions craneofacials associades significativament a altres malformacions. No obstant, no hi ha cap anomalia amb suficient valor predictiu per constituir un indicador d'una cromosomopatia.

La reorganització del material genètic, com les translocacions aparentment equilibrades, no tenen repercussió fenotípica en la major part dels casos. No obstant, quan aquestes són de novo, se'ls pot atribuir la causa d'algun retard mental i/o malformacions. En alguns casos de retard mental s'ha comprovat que és degut a un efecte d'una disomia uniparental o que deriva d'una petita pèrdua de material genètic.

MALFORMACIONS CONGÈNITES DEGUDES A ANOMALIES DELS CROMOSOMES SEXUALS

Les aneuploidies dels cromosomes sexuals són les alteracions cromosòmiques més freqüents en l'espècie humana (se'n diagnostiquen prenatalment a l'entorn de 1/250 amniocentesis). La incidència en els nens és de 1/400 i en les nenes de 1/750.

Tant les anomalies numèriques com estructurals dels cromosomes sexuals tenen un efecte sobre el fenotip menys deleteri que les aneuploidies autosòmiques. S'associen a trastorns físics, de comportament i/o de l'intel·lecte, la severitat dels quals dependrà del cromosoma implicat i sobretot a l'efecte de dosi gènica. El factor de dosi gènica fa referència al fet que sols és necessari un cromosoma completament actiu per tal que s'expressi la mateixa quantitat de gens lligats al cromosoma X en barons i femelles. La inactivació del X està controlada pel gen *XIST* (X Inactive Specific Transcript) i a través de la unió amb el XIC (Centre d'inactivació del X) localitzat en Xq11.2-q13 s'iniciaria el procés de l'heterocromatització. Alguns gens es lliuren de la inactivació. En la síndrome de Turner (45,X), l'únic cromosoma X present no està inactivat.

Quan hi han desequilibris del material genètic del cromosoma X hi ha afectació predominantment del desenvolupament puberal.

La síndrome de Turner és l'alteració cromosòmica sexual més freqüent. Es presenta en 1:3000 nascudes vives i representa un 10% del total d'avortaments. Es caracteritza per uns trets bàsics: infantilisme sexual, gònades en cinta i talla baixa. No obstant, l'expressió clínica és molt variable ja que la majoria de pacients amb clínica de síndrome de Turner presenten mosaïcismes.

La síndrome de Klinefelter o 47,XXY presenta una incidència molt elevada d'aproximadament 1/500 nounats. Es diagnostica en la pubertat o en l'edat adulta per la presència d'anomalies en el desenvolupament sexual amb microorquídia i azoospermia. És una de les causes més freqüents d'infertilitat.

Les anomalies del cromosoma Y són també ben tolerades, ja que gairebé tot el cromosoma està compost de material genètic inactiu. El factor de determinació testicular està codificat pel gen *SRY* localitzat en el braç curt i juntament amb altres gens tant autosòmics com lligats al cromosoma X, són els responsables de la diferenciació de la gònada que es converteix en testicle. Els individus amb alteracions estructurals del cromosoma Y poden desenvolupar-se com homes, dones o genitals ambigus depenent de la regió delecionada i de l'existència d'una línia 45,X. En la síndrome dels homes XX, està demostrat que seqüències de DNA específiques del cromosoma Y estan presents en la majoria dels casos. S'origina per un intercanvi anòmal entre els cromosomes X i Y a la meiosi paterna. La síndrome dones XY es caracteritza per no desenvolupar testicles ni ambigüitat sexual, però presenten les gònades en cinta. Mitjançant tècniques moleculars s'ha descrit l'absència del gen *SRY* o de mutacions en aquest gen.

Els casos amb fenotip femení i disgenèsia gonadal, amb presència de material del cromosoma Y presenten un gran risc de desenvolupar gonadoblastoma (ex. 45,X/46,XY).

SÍNDROMES DE GENS CONTIGUS I MENDELIANS

Algunes microdeleccions estan associades de forma esporàdica al desenvolupament d'una malaltia mendeliana, bé com un caràcter degut a un únic gen, o bé formant part d'una síndrome de gens contigus quan les anomalies fenotípiques són complexes. Així, per exemple, la lisencefàlia pot aparèixer de forma aïllada o ésser la característica principal de la síndrome de Mieller Diecker (del17p13), i el retinoblastoma també es pot presentar aïllat o formant part d'un quadre sindròmic (del13q14).

D'altres síndromes es caracteritzen per presentar un fenotip dismòrfic característic, en què hi ha afectats diversos gens contigus: S. de Langer-Giedon (del8q24), S. d'Angelman i S. de Prader-Willi (del15q11-13), S. de Beckwith-Wideman (dup11p15), Rubinstein-Taybi (16p13) i S. de Di George (del22q11).

Les S. d'Angelman i de Prader-Willi mostren la deleció en la mateixa regió del cromosoma 15. La distinta expressió fenotípica d'aquestes dues síndromes està influïda per l'origen parental de la deleció, anomenant-se aquest fenomen «imprinting» genòmic. Quan la deleció prové del pare esdevé la síndrome de Prader-Willi i si procedeix de la mare es produeix la síndrome d'Angelman. Aquest procés el confirmen els casos de disomia uniparental, els dos cromosomes homòlegs procedeixen del mateix progenitor. La disomia uniparental materna del cromosoma 15 és la causa del 30% de la síndrome de Prader-Willi i la paterna en el 5% de la síndrome d'Angelman.

La caracterització d'una alteració cromosòmica associada a totes aquestes patologies ha ajudat a mapar els gens implicats directament amb la malaltia. Amb la tècnica d'hibridació in situ es poden diagnosticar molts dels pacients afectes d'aquestes malalties. Altres malalties mendelianes associades a alteracions cromosòmiques són les síndromes d'instabilitat cromosòmica com la síndrome de Bloom, Anèmia de Fanconi i Atàxia telangièctasi. Són desordres autosòmics recessius que es caracteritzen per presentar trencaments en els cromosomes degut a una reparació disminuïda del DNA. Totes aquestes síndromes presenten una afectació neurològica i deficiències en el sistema immunitari amb un increment del risc de malignitat.

Per últim, comentarem la síndrome de fragilitat del cromosoma X, la segona causa de retard mental després de la síndrome Down, amb una freqüència de 1 cada 1500 nens i 1 en 2500 nenes. Hi ha una alteració en la condensació de la cromatina expressant-se citogenèticament en un punt fràgil Xq27.3 (FRAXA). Recentment s'ha descrit un altre punt fràgil en Xq28 (FRAXE) associat a un tipus de retard mental moderat. Fins al moment són poques les famílies reportades.

Per a la seva expressió citogenètica, cal emprar condicions especials de cultiu. Utilitzant un medi de cultiu deficient en àcid fòlic o timidina o afegint-hi inhibidors del metabolisme del folat s'obté una expressió de la fragilitat que oscil·la entre el 10 i 50% en homes afectats. En les dones portadores obligades fenotípicament normals, aproximadament la meitat mostra fragilitat cromosòmica, però amb un percentatge molt baix. D'altra banda un 30% de les

dones portadores presenten un retard mental lleuger i en el 60% dels casos expressen la fragilitat. Donat que la mutació ja està caracteritzada, per una repetició del triplet CGG del gen *FMR1* és aconsellable fer un estudi molecular del DNA per detectar amb més fiabilitat l'estat de portadora i per poder oferir un diagnòstic prenatal.

INFERTILITAT

Els estudis cromosòmics realitzats en població d'homes que consulten per infertilitat clínica mostren que la freqüència d'anomalies cromosòmiques en aquests pacients és superior a la població general. La presència d'alteracions cromosòmiques pot alterar la funció reproductora, bé per tenir una acció específica sobre la gònada o per actuar sobre la diferenciació i maduració de les cèl·lules germinals.

La incidència d'anomalies cromosòmiques en la infertilitat masculina està estimada al voltant del 5%, amb una proporció d'anomalies sexuals tres vegades superior a les anomalies autosòmiques. Les anomalies dels cromosomes sexuals, particularment la fórmula 47,XXY, és la més freqüent. Les anomalies autosòmiques equilibrades també poden alterar l'espermatogènesi, essent les més freqüents les translocacions robertsonianes t(13;14). El defecte gonadal en els individus XXY és una atrèsia testicular relacionada amb una baixa supervivència de les cèl·lules que contenen dos cromosomes X en comptes d'un.

Les reorganitzacions equilibrades bloquen la maduració de les cèl·lules germinals. Un dels mecanismes proposats és l'associació de la translocació amb la vesícula sexual que interferiria amb la inactivació del cromosoma X durant la profase I meiótica, donant lloc a desordres metabòlics responsables de la mort cel·lular. Això explicaria que l'oogènesi no s'afectés amb la presència d'anomalies cromosòmiques equilibrades.

Els individus del sexe masculí portadors presenten generalment una oligospermia severa. No obstant, la mateixa anomalia pot expressar-se de forma molt variable, des d'una esterilitat, amb absència de formació d'espermatozoides, fins a una fertilitat normal, amb un recompte d'espermatozoides dins els valors de normalitat.

Les translocacions equilibrades sovint també es diagnostiquen en parelles amb més de dos avortaments. Durant la meiosi I, els cromosomes que formen part d'una translocació s'aparellen amb els seus homòlegs no translocats formant un tetravalent. D'aquí, se'n deriven gàmetes normals, gàmetes amb la translocació equilibrada i d'altres amb duplicacions i deficiències. Si la quantitat de material translocat és gran, donarà lloc a un producte inviable. Mentre que si és petita, hi ha un risc incrementat de descendència amb anomalies. Per altres reorganitzacions equilibrades, com les inversions, succeix el mateix.

Estudis de la meiosi en cèl·lules espermatogèniques d'homes infèrtils amb cariotip normal mostren la presència d'anomalies que majoritàriament afecten a l'aparellament (sinapsi dels cromosomes homòlegs durant la profase I).

L'alteració més freqüent és la de sinapsi (separació precoç dels cromosomes homòlegs) que provoca una disminució en el nombre de quiasmes, produint un bloqueig a la meiosi. S'estima que la incidència d'anomalies meiotiques és al voltant del 4%.

NEOPLÀSIES HEMATOLÒGIQUES I TUMORS SÒLIDS

Els canvis cromosòmics inclouen alteracions numèriques amb pèrdua o addició d'un cromosoma o canvis estructurals com delecions, inversions, insercions i translocacions que poden ser equilibrades o desequilibrades. Són molt freqüents en les leucèmies i en limfomes i sovint apareixen com a un únic canvi en el cariotip. Les translocacions generen un intercanvi de material genètic que a vegades pot donar lloc a una quimera, en la qual el gen expressa una proteïna anòmala. Aquests gens, anomenats oncogens, alterats podrien ésser responsables de la inducció d'una proliferació cel·lular anòmala. El cromosoma Philadelphia (Ph+), associat clàssicament a la leucèmia mieloide crònica, és conseqüència d'una translocació recíproca entre els cromosomes 9 i 22. A nivell molecular hi ha una fusió directa de dos gens, l'oncogen *abl* situat en el cromosoma 9 i el denominat *bcr* situat en el cromosoma 22. Aquesta fusió dóna lloc a una nova proteïna híbrida anormal, que s'expressarà en aquelles cèl·lules que presentin la translocació. El 95% dels pacients amb leucèmia mieloide crònica i en 25–30% dels casos amb leucèmia limfoblàstica aguda mostren el cromosoma Ph+.

Dins de les leucèmies agudes d'estirp mieloide s'han publicat uns 3500 casos amb alteracions cromosòmiques numèriques i/o estructurals. Cada subtipus de leucèmia presenta associada un tipus de reorganització cromosòmica amb una especificitat que, en alguns casos, arriba al 100%. Els canvis més freqüents són delecions totals o parcials dels cromosomes 5 i 7 o trisomia 8. La translocació recíproca entre els cromosomes 15 i 17 és específica de la leucèmia promielocítica.

Dins de les leucèmies d'estirp limfoide s'han descrit més de 1500 casos amb alteracions cromosòmiques associades de forma específica. Algunes de les alteracions que afecten la banda 14q11 apareixen en les leucèmies limfoblàstiques agudes de cèl·lules T. Es produeixen reordenacions que impliquen els gens que codifiquen els receptors α i δ de les cèl·lules T, localitzats a la banda 14q11. L'efecte molecular de la translocació és que el gen procedent de l'altre cromosoma en situar-se prop dels gens dels receptors, deixa d'ésser regulat en condicions normals i s'expressa de forma alterada.

En el cas de les leucèmies mieloides, el cariotip es considera més com una eina de diagnòstic, mentre que en les leucèmies limfoides el cariotip té una utilitat més de pronòstic. Està establert, per exemple, que un cariotip hiperdiploide sense alteracions estructurals té bon pronòstic, mentre que un cariotip amb alteracions estructurals és de mal pronòstic. Per exemple, la presència de translocacions t(4;11) i t(9;22) tenen un pitjor pronòstic que altres alteracions.

La tècnica FISH és útil quan hi ha poc material o aquest és inadequat per als estudis citogenètics i en el seguiment del transplantament de moll de l'os per diferenciar les cèl·lules del donant i del malalt quan aquests són de sexe diferent. La FISH també s'utilitza per a l'anàlisi de tumors sòlids. Actualment la tècnica d'hibridació genòmica comparada s'està imposant per a l'anàlisi d'anomalies cromosòmiques presents en tumors. Consisteix en la competitivitat de dos DNA genòmics, test i referència, per hibridar amb els cromosomes metafàsics procedents d'individus normals. Un increment del nombre de còpies de la seqüència de DNA es visualitza com un augment dels senyals fluorescents del DNA problema. Les pèrdues són detectades com un increment relatiu dels senyals fluorescents del DNA de referència. Aquesta tècnica té l'avantatge d'utilitzar-se en teixit tumoral fresc, fixat amb formol o parafinat.

INDICACIONS PER A LA SOL·LICITUD D'UN CARIOTIP

- 1.-Sospita o confirmació d'una síndrome cromosòmica o de gens contigus.
- 2.-Anomalies múltiples congènites i/o retard mental.
- 3.- Retard mental familiar.
- 4.-Retard de creixement.
- 5.-Problemes de fertilitat: amenorrea, avortaments múltiples ≥ 2 , esterilitat masculina.
- 6.-Fetus morts.
- 7.-Diagnòstic prenatal: mares de 35 o més anys, malformacions, antecedents de cromosomopatia.
- 8.-Processos hematològics malignes i tumors sòlids.

BIBLIOGRAFIA

- Brekeleer, M. de, Dao, T. N. (1991). Cytogenetic studies in male infertility: a review. *J. Reprod.* **6**, 245-250.
- Egozcue, J., Templado, C., Vidal, F., Navarro, J., Morer-Fargas, F., Marina, S. (1983). Meiotic studies in a series of 1100 infertile and sterile males. *Hum. Genet.* **65**, 185-188.
- Grao, P. (1995). Aplicació de tècniques moleculars en l'estudi dels cromosomes sexuals. Tesi Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Guichaoua, M. R., Delafontaine, D., Noël, B., Luciani, J. M. (1993). L'infertilité masculine d'origine chromosomique. *Contracept. Fertil. Sex* **21**, 113-121.
- Houldsworth, J., Chaganti, R. S. K. (1994). Comparative genomic hybridization: an overview. *Am. J. Pathol.* **145**, 1253-1260.
- Lepping, K. A., Werler, M. M., Cann, C. I., Cook, C. A., Holmes, L. B. (1987). Predictive value of minor anomalies. I. Association with major malformations. *J. Pediatr.* April, 531-537.
- Sandberg, A. A. (1994). Cancer cytogenetics for clinicians. *Ca. Cancer J. Clin.* **44**, 136-159.
- Schinz, A. (1994). Human cytogenetics database. In Baraitser, M., Winter, R. M. (ed.), Oxford University Press.
- Solé, F., Coll, M. D., Caballín, M. R., Wosner, S., Egozcue, J. (1990). Tema monográfico. Citogenética y cancer: leucemias y linfomas. *Jano* **39**, 65-106.
- Sutherland, G. R., Richards, R. I. (1995). The molecular basis of fragile sites in human chromosomes. *Curr. Opin. Genet. Develop.* **5**, 323-327.
- Van Ommen, G. J. B., Breuning, M. H., Raap, A. K. (1995). FISH in genome research and molecular diagnostics. *Curr. Opin. Genet. Develop.* **5**, 304-308.