

Bandas G de alta resolución para cromosomas profásicos y prometafásicos.

L. GAYOL,¹ S. MENÉNDEZ,² O. QUIÑONES,² G. VEGA² Y F. MENÉNDEZ²

¹ Instituto de Neurología y Neurocirugía, 29 y E, Vedado, La Habana, Cuba

² Centro Nacional de Genética Médica, Instituto Superior de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón", calle 146 y 31, Playa, La Habana, Cuba

Con el objetivo de introducir en nuestro laboratorio los estudios cromosómicos por técnicas de bandas de alta resolución, se tomaron muestras de sangre periférica (1 ml de sangre completa) a 20 individuos sanos (10 varones y 10 hembras) y se cultivaron a 37°C en 7 ml de medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 20% de suero fetal de ternera (Gibco) y 0,5 ml de fitohemaglutinina M (Difco), durante 94 horas. Los cromosomas profásicos y prometafásicos fueron obtenidos por sincronización con Methotrexate (10^{-7} M, Sigma) y adición de bromodeoxiuridina (10 µg/ml, Sigma) en las últimas 22 horas.

Se construyeron patrones cromosómicos de bandas G, de acuerdo con los idiogramas de ISCN 1981 para los niveles de 550 y 850 bandas por set haploide. Se muestra el cariotipo parcial de un paciente con duplicación de la región 4q2 para ilustrar el valor de estos métodos en la citogenética clínica.

INTRODUCCION

El desarrollo alcanzado por las técnicas de alta resolución a partir de los trabajos de Yunis (1976, 1978 y 1981), ha dotado a los citogenetistas de un instrumento de trabajo útil para el análisis de pequeñas alteraciones de los cromosomas, y ha permitido una mejor correlación fenotipo-cariotipo en numerosas anomalías estructurales. Lo anterior ha sido posible porque estos métodos permiten visualizar mayor número de bandas, y por ende, ofrecen una mayor resolución de la estructura cromosómica.

Numerosos autores (ISCN, 1981; Francke, 1981; Richer *et al.*, 1983; Drouin, 1985; Van Dyke *et al.*, 1986) han observado que existe variabilidad en el número, tamaño e intensidad de las bandas obtenidas en cromosomas profásicos y prometafásicos, sobre todo en regiones yuxtacentroméricas, sin embargo, los acuerdos logrados por el Comité Internacional de Nomenclatura (ISCN, 1981) han permitido que los resultados alcanzados por diferentes laboratorios tengan un nivel de comparación aceptable, y por lo tanto, que se acumule un número cada vez mayor de publicaciones sobre aberraciones cromosómicas delineadas por técnicas de alta resolución.

El presente trabajo muestra los resultados obtenidos por nuestro laboratorio en la introducción y estandarización de estas técnicas, con el objetivo de elevar la calidad del diagnóstico que ofrecemos a nuestros pacientes.

MATERIALES Y METODOS

Se tomaron muestras de sangre venosa periférica a 20 individuos sanos (10 varones y 10 hembras), las cuales se recogieron en jeringuillas previamente heparinizadas (5 000 UI/ml, Lique mine) y se procesaron después de varios ensayos según el protocolo adaptado de J. Yunis (1981): por cada frasco de cultivo se sembraron 7 ml de medio RPMI 1640 (Gibco); 2 ml de suero fetal de ternera (Gibco); 0,5 ml de fitohemaglutinina M (Difco) y 1 ml de sangre completa, incubándose a 37°C durante 94 horas. El Methotrexate (MTX) fue añadido a las 72 horas de cultivo para sincronizar los linfocitos a una concentración final de 10^{-7} M. El bloqueo de MTX (Sigma) fue liberado 17 horas más tarde mediante tres lavados con medio no suplementado o solución Hanks. Por último, se agregó 10 ml RPMI 1640 y bromodeoxiuridina (BRdU, Sigma) a una concentración final de 10 μ g/ml dejándose actuar durante 4 h 50 min.; en los últimos 10 min se añadió Colcemid (0,1 μ g/ml).

El procesamiento de las muestras se llevó a cabo de la forma usual, excepto en que se alargó el tiempo de hipotonía (30 min) y la primera fijación se hizo más lenta. Se realizaron cuatro fijaciones. Las extensiones se hicieron sobre láminas frías y se dejaron secar al aire. Las bandas GTG se realizaron con láminas incubadas a 60°C durante 1 h, las que fueron expuestas a la acción de una solución de tripsina Difco (1 mg/ml) durante 20 s en buffer fosfato a pH 6,8 y lavadas en metanol.

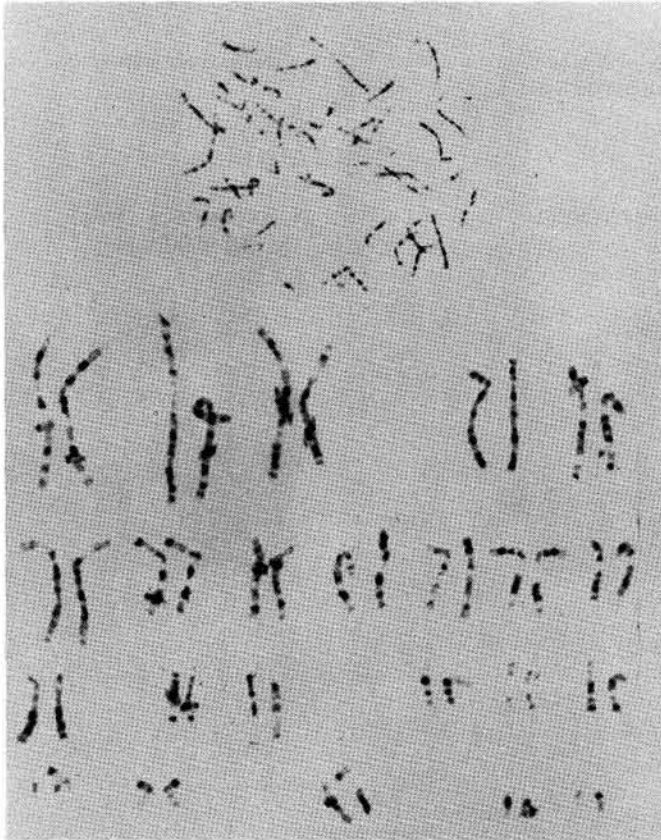


FIG. 1. Cromosomas prometafásicos de un varón normal 46,XY, coloreados por la técnica GTG alta resolución para un estadio de 550 bandas por set haploide.

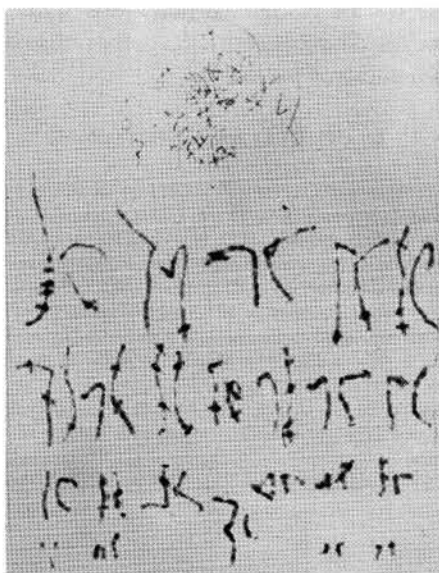
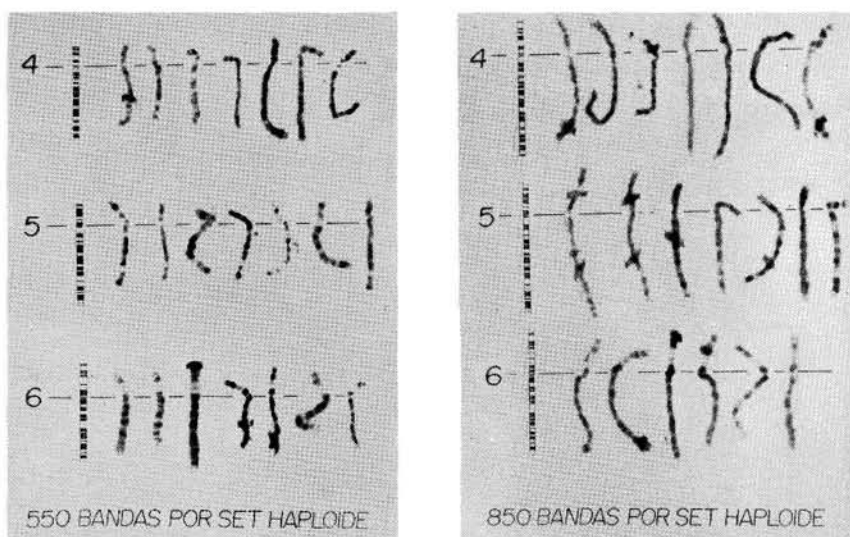


FIG. 2. Cromosomas profásicos de un varón normal 46,XY, coloreados por la técnica GTG alta resolución para un estadio de 850 bandas por set haploide.

RESULTADOS

Se obtuvo, aproximadamente, el 30% de profases y prometafases por lámina. Se construyeron dos cariotipos por control, de los cuales se muestran dos ejemplos (figuras 1 y 2).



FIGS. 3 y 4. Patrones parciales de nuestro laboratorio para cromosomas prometafásicos (550 bandas) y profásicos (850 bandas) del 4 al 6, comparados con los idiogramas establecidos por ISCN (1981).

Además se conformaron patrones cromosómicos con los miembros más representativos de cada par para los niveles de 550 y 850 bandas por set haploide, los que se compararon con los idiogramas elaborados por ISCN (1981). Algunas muestras parciales de estos patrones que incluyen los cromosomas 4, 5 y 6 para los estadios de 550 y 850 bandas, se ilustran en las figuras 3 y 4.

La figura 5 muestra los cariotipos parciales por técnicas GTG estándares y de alta resolución, de un paciente con duplicación de la región 2 del brazo largo del cromosoma 4. Se puede apreciar en esta comparación que la figura inferior, la cual corresponde a un nivel aproximado de 850 bandas, permite una mejor definición del segmento cromosómico implicado en la duplicación, lo que ilustra la utilidad de estos métodos en la citogenética clínica.

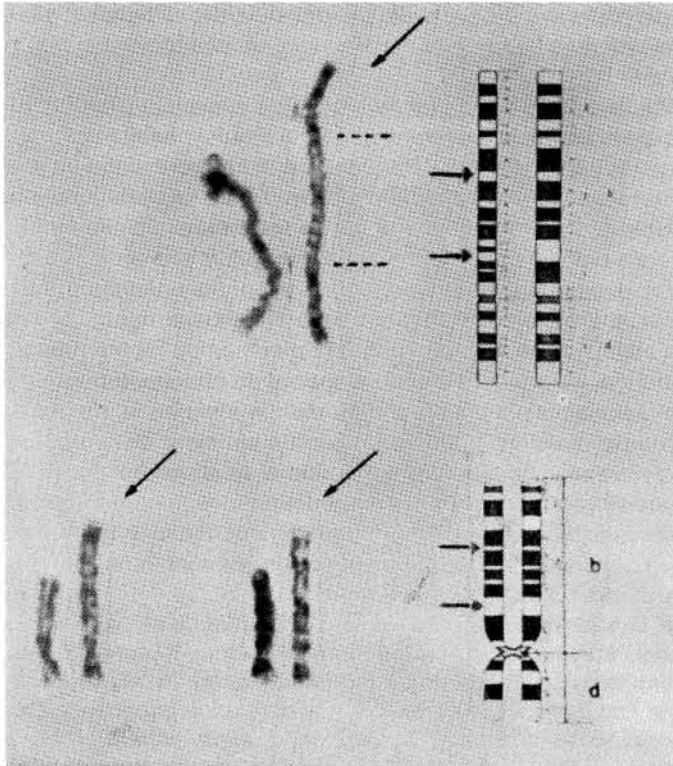


FIG. 5. Cariotipos parciales por técnicas estándares y de alta resolución de un paciente con duplicación de la región 4q2. El reordenamiento pudo ser definido como 46,XY, dir dup (ISCN, 1981) (q21.1 ---q27).

DISCUSION

En las figuras anteriores puede apreciarse que nuestros patrones cromosómicos son compatibles con los idiogramas mencionados, y por tanto, son útiles en la identificación de reordenamientos cromosómicos siguiendo los criterios de ISCN (1981).

Sin embargo, hay un conjunto de factores que deben ser tenidos en cuenta para lograr resultados aceptables: en primer lugar, una vez liberado el cultivo del bloqueo con MTX debe

medirse exactamente el tiempo de acción de la BRdU, pues este paso garantiza obtener abundantes células en los estadios de división deseados; por otra parte, la BRdU tiene una serie de desventajas, ya que puede provocar elongación diferencial y rupturas cromosómicas (Yunis, 1981), asimetría entre cromosomas homólogos (Dtrilleaux *et al.*, 1976) y modificaciones del índice centromérico (Schollmayer, 1981); estas dificultades parecen reducirse al mínimo con una concentración de 10 µg/ml.

La corta exposición al Colcemid es importante, sobre todo si se quieren obtener cromosomas prometafásicos (nivel de 550 bandas), pues es en esta fase de la división celular cuando se rompe la membrana nuclear y el reactivo puede ejercer su acción sobre el huso mitótico y los cromosomas.

La mayor longitud de los cromosomas profásicos, así como la acción de la BRdU impidiendo su contracción, hacen que estos presenten una estructura fina y alargada, por lo que tienden a superponerse y formar ovillos, lo que dificulta el "bando" y la individualización de ellos; este contratiempo se resuelve mediante un *shock* hipotónico más prolongado y una primera fijación más lenta.

En la obtención de las bandas G deben emplearse concentraciones de tripsina más bajas y tiempos de exposición más largos que los utilizados habitualmente en las técnicas estándares, con vistas a lograr bandas finas que estén en correspondencia con la morfología alargada de los cromosomas. Por último, se deben tomar en consideración posibles errores en la interpretación de los resultados a causa de los estados de concentración que pueden presentar los cromosomas dentro del mismo cariotipo, y a la posible existencia de nuevos polimorfismos que puedan ser interpretados como reordenamientos a nivel de sub-bandas.

Las dificultades anteriormente mencionadas han hecho que existan controversias entre los citogenetistas en cuanto al empleo de rutina o específico de las técnicas de alta resolución. Según nuestra opinión, el empleo general o especial de estos métodos dependerá mucho de las facilidades y experiencia de cada laboratorio. Apoyamos la recomendación de Yunis (1983), de que los niveles de 450 y 550 bandas deben aplicarse de rutina, mientras que los de 850 y mayores lo sean solo en aquellos casos donde se sospeche una anomalía o se quiera precisar los puntos de ruptura de un reordenamiento.

En este sentido concordamos con Hoo (1986), en que el mejor empleo de análisis por alta resolución está en concentrar la atención sobre el o los cromosomas del cariotipo que por técnicas estándares han revelado ya una alteración.

En conclusión, consideramos que las técnicas de bandas de alta resolución son importantes y extremadamente útiles en el análisis cromosómico. Recomendamos el empleo de cromosomas prometafásicos (550 bandas por set haloide) en los estudios citogenéticos de rutina, puesto que resultan muy informativos y su obtención puede lograrse disminuyendo el tiempo de exposición al Colcemid y añadiendo algún inhibidor de la condensación cromosómica como la Actinomicina D sin necesidad de sincronizar los cultivos (Yunis, 1983). Por otra parte, los laboratorios que constituyan centros de referencia para análisis cromosómico deben trabajar para incorporar los métodos de obtención de cromosomas profásicos (850 bandas o más por set haploide), mediante sincronización de los cultivos con MTX.

REFERENCIAS

- DROUIN, R. y C. L. RICHER (1985). *Analysis of high-resolution R-bands, obtained by heat-denaturation and Giemsa staining on human prophase chromosomes*. *Can. Genet. Cytol.* 27 (1): 83-91.
- DUTRILLEAUX, B. *et al.*, (1976). *Sequence of DNA replication in 227 R- and Q-bands of human chromosomes using a BRdU treatment*. *Chromosoma* 58: 51 - 61

- FRANCKE, U. (1981). *High-resolution ideograms of trypsin-Giemsa banded human chromosomes*. Cytogenet Cell Genet. **31**: 24-32.
- HOO, J. J. (1986). *Letter to the Editor: Routine Application of High-Resolution Chromosome Analysis*. Ame. J. Med. Genet. **24**: 533-537.
- ISCN (1981). *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature-High-Resolution Banding*. Cytogenet Cell Genet. **31**: 1-23.
- RICHER, C. L. *et al.* (1983). *High-resolution ideogram of Giemsa R-banded human prophase chromosomes*. Can. J. Genet. Cytol. **25** (6):642-650.
- SCHOLLMAYER, E. D. *et al.* (1981). *High-resolution analysis and differential condensation in RBA-banded human chromosomes*. Human Genet. **59**: 187-193.
- VAN DYKE, D. L. *et al.* (1986). *The centromeric index and relative length of human high-resolution G-banded chromosomes*. Human Genet. **73**: 130-132.
- YUNIS, J. J. (1976). *High Resolution of Human Chromosomes*. Science **191**: 1268-1270.
- YUNIS, J. J.; J. R. SAWYER y D. W. BALL (1978). *The characterization of high-resolution G-banded chromosomes of man*. Chromosoma **67**: 293-307.
- YUNIS, J. J. (1981). *New chromosome techniques in the study of human neoplasia*. Human Pathology **12** (6) :540-549.
- YUNIS, J. J. y R. C. LEWANDOWSKI (1983). *High-Resolution Cytogenetics*. Birth Defects: Original Article Series. **19** (5): 11-37. March of Dimes Birth Defects Foundation.