

RESULTADOS DEL LABORATORIO DE CITOGENÉTICA DEL ECEMC DEL AÑO 2001. NUEVAS TÉCNICAS DE FISH Y SU IMPLICACIÓN CLÍNICA

L. Rodríguez¹, F. López¹, E. Mansilla¹, M.L. Martínez-Frías^{1,2}

¹ ECEMC, Centro de Investigación sobre Anomalías Congénitas (CIAC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid.

² Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid.

Summary

Title: Results of the ECEMC cytogenetic laboratory during the year 2001. New techniques of FISH, and their clinical implication

We present here the results of the karyotypes found during the year 2001 in the ECEMC cytogenetic laboratory. All of the structural chromosome alterations found during this period were diagnosed using High Resolution G-band chromosomes (550–850 bands) and FISH techniques, including chromoprobe–Multiprobe–kits. The advances in cytogenetic and molecular cytogenetic techniques, have helped to detect quite small chromosome alterations. Nowadays, there are some groups working specifically in the telomeres, since these structures are regions full of genes and are implicated in most of the chromosome alterations. Nevertheless, the frequency and impact of these telomeric alterations in patients with mental retardation, malformations and/or other clinical manifestations, are still not clear.

Introducción

Con el desarrollo de las técnicas de citogenética de alta resolución, que permiten trabajar con cromosomas más largos, de alrededor de 850 bandas (cada banda se divide en subbandas), fue posible la visualización de alteraciones cromosómicas muy pequeñas, de alrededor de 2–3 megabases. Esto impulsó la posibilidad de detectar alteraciones cromosómicas mucho más pequeñas que las que se venían observando. Además, la aplicación de técnicas de citogenética molecular y concretamente de hibridación "in situ" (*Fluorescence in situ Hybridization*: FISH), permitió diagnosticar alteraciones cromosómicas que no serían visibles al microscopio sin estas técnicas. De este modo se está avanzando mucho en el estudio de regiones cromosómicas específicas, lo que aumenta la posibilidad de detectar alteraciones cromosómicas crípticas. Una de estas posibilidades es el estudio de los telómeros. Estos, que forman las partes más distales de los brazos cortos y de los brazos largos de los cromosomas, tienen un papel muy importante en la replicación del ADN, confieren estabilidad a los cromosomas y tienen una función significativa en la longevidad celular. Sin estas terminaciones teloméricas, los cromosomas son inestables y tienden a fusionarse y degradarse.

Todos los telómeros de los cromosomas eucariotas están compuestos por dos regiones, la distal y la subtelomérica. La región distal, no codificante, está formada por repeticiones de los pares de bases TG que, concretamente en los vertebrados, es (TTAGGG) repetidos "n" veces, en una lon-

gitud que oscila entre 2 y 15 Kb (kilobases). La región subtelomérica, que es muy compleja y rica en genes, entre los que se han reconocido genes candidatos para síndromes bien conocidos como la delección terminal 1p36.3 o la delección terminal 2q37.3 [Cross y cols., 1990; Kuwano y cols., 1991; Saccone y cols., 1992].

En los últimos años, se han desarrollado técnicas de FISH con sondas específicas para las distintas regiones subteloméricas de los distintos cromosomas, y que se aplican directamente sobre metafases extendidas en un portaobjetos. De este modo, si se observa la ausencia de la señal en uno de los telómeros, implicaría que existe una delección de esa región subtelomérica (Figura 1), mientras que si aparece una señal extra, implicaría una trisomía de esa región subtelomérica (Figura 2).

La posibilidad de estudiar los telómeros en la búsqueda de alteraciones cromosómicas con repercusión clínica, tiene varias ventajas:

- 1) La mayoría de las alteraciones cromosómicas involucran a los telómeros.
- 2) Reordenamientos anómalos de estas regiones podrían tener consecuencias clínicas importantes debido a que, como ya hemos dicho, las regiones próximas a los telómeros son ricas en genes.
- 3) Ya se han descrito varias alteraciones teloméricas asociadas a un patrón de malformaciones específico.

En la actualidad, se dispone de un "juego de hibridación" que permite la hibridación simultánea con sondas subteloméricas de todos los cromosomas en un mismo portaobjetos (*Multiprobe-T: Cytozell*). Esto permite aplicar este estudio de forma más generalizada [National Institutes of Health and Institute of Molecular Medicine Collaboration, 1996; Knight y cols., 1997].

Flint y cols. [1995], usando esta técnica, realizaron un estudio piloto para establecer si los reordenamientos subteloméricos, podrían tener una significación causal en el retraso mental idiopático. El estudio se realizó en 99 personas con retraso mental de causa desconocida, cuyos cariotipos de alta resolución eran normales. Sus resultados sugerían que al menos un 6% del retraso mental idiopático, podría ser explicado por alteraciones submicroscópicas de los telómeros, lo cual implicaba que estas alteraciones podrían ser la segunda causa más común de retraso mental después del Síndrome de Down.

Sin embargo, en otros estudios posteriores que han ido apareciendo en la literatura [Vorsanova y cols., 1998; Viot y cols., 1998; Knight y cols., 1999; Anderlid y cols., 1999; Joyce y cols., 1999; Lamb y cols., 1999], se desprende que la frecuencia de las alteraciones subteloméricas varía desde menos del 1% hasta el 23%. Estas amplias diferencias probablemente sean debidas tanto a variaciones en el tamaño de las muestras, como a variaciones en los criterios de selección de los casos para el estudio.

De Vries y cols. [2001], en un intento por establecer cuáles serían las manifestaciones clínicas asociadas con este tipo de alteraciones, compararon a 29 pacientes malformados con retraso mental que eran portadores de algún reordenamiento subtelomérico conocido, con 110 pacientes con retraso mental de etiología desconocida y cariotipo de alta resolución normal. Los resultados mostraron una relación entre reordenamientos subteloméricos y la presencia de historia familiar de retraso mental, y bajo peso al nacimiento. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la expresión clínica de las deleciones subteloméricas depende de varios factores:

1. El tamaño de la deleción.
2. El cromosoma implicado y de si la deleción afecta al brazo corto o al brazo largo.
3. La presencia de una trisomía asociada.
4. La presencia de un alelo recesivo en el homólogo no delecionado.

Por consiguiente, las microdeleciones subteloméricas podrían tener una gran variación en su repercusión clínica

que puede ser desde un efecto grave con alteraciones físicas y/o psíquicas, hasta no mostrar ninguna repercusión y ser sólo una variante polimórfica.

Varios autores han llamado la atención sobre el hecho de que algunas de las alteraciones teloméricas detectadas, estaban presentes también en uno de los progenitores sano, por lo que fueron consideradas polimorfismos [Knight y Flint, 2000; Shaffer y cols., 1999 y Ballif y cols., 2000], aunque su frecuencia en la población general es aún desconocida. Ballif y cols. [2000], basados en una muestra no randomizada, concluyen que los polimorfismos de los telómeros podrían tener una frecuencia de alrededor del 7%, pero que es necesario estudiar individuos normales en diferentes poblaciones, para establecer la frecuencia de estos polimorfismos en cada una de ellas, para así interpretar correctamente los resultados de los estudios realizados en los niños con retraso mental y/o malformaciones congénitas. Esta conclusión es muy importante, porque ninguno de los estudios en los que se ha concluido que una alteración telomérica es polimórfica, fueron realizados en padres e hijos sanos. Por consiguiente, el hecho de que uno de los padres sanos tuviera la misma deleción subtelomérica que se observa en el hijo afectado, no excluye que el efecto observado en el hijo sea consecuencia del desbalance producido por la deleción. Esto puede ocurrir si, por ejemplo, la deleción afectó a un gen y quedó un alelo recesivo en el cromosoma homólogo no afectado.

Resultados del ECEMC

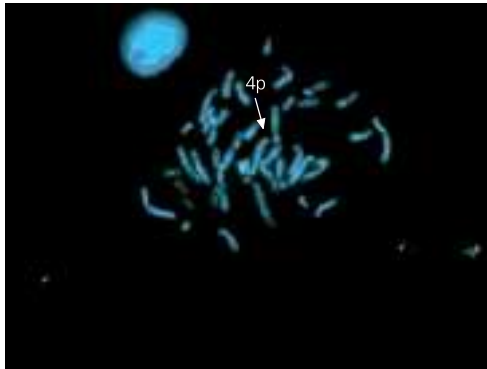
A lo largo del año 2001, en el laboratorio de citogenética del ECEMC, se han recibido un total de 434 muestras, de las cuales se han realizado un total de 313 cariotipos de alta resolución (550–850 bandas). La diferencia se debe, básicamente, a que, para muchos casos hemos pedido una "segunda muestra" para completar el estudio con otras técnicas.

La Tabla 1, presenta el resultado de estos estudios. Así, 243 casos, después de realizarles un cariotipo de alta resolución y aplicarles las técnicas necesarias de FISH, resultaron cromosómicamente normales (con las técnicas actuales), mientras que 70 (22,36%) casos, presentaron una alteración numérica o estructural.

Con respecto a las alteraciones numéricas, en la Gráfica 1 se puede apreciar que el 77,78% de ellas fueron trisomías 21.

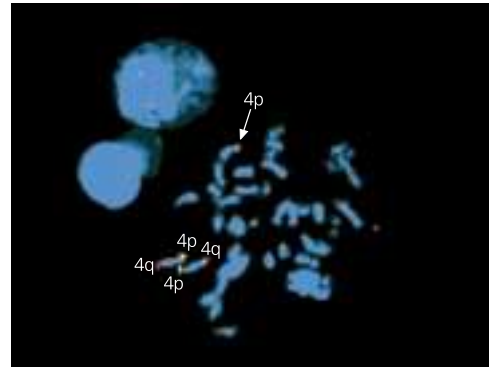
Los 34 casos con alteraciones estructurales representan el 48,57% del total de las alteraciones cromosómicas identificadas. Estas se identificaron mediante cromosomas de alta resolución y técnicas de citogenética molecular (FISH)

FIGURA 1



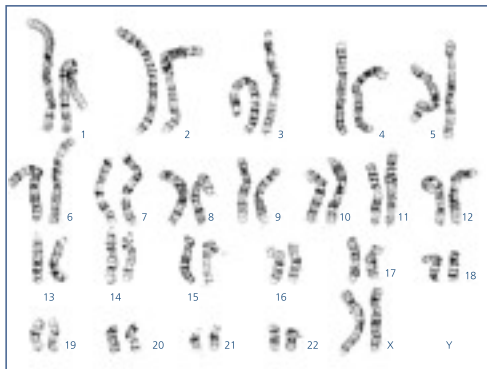
FISH con sonda subtelomérica del cromosoma 4, que muestra una ausencia de señal de la región subtelomérica 4p (señal roja), que implicaría una deleción de esa región.

FIGURA 2



FISH con sonda subtelomérica del cromosoma 4, que muestra una señal extra (4p) (señal amarilla) en un cromosoma del grupo "C", que implica una trisomía de la región subtelomérica 4p.

FIGURA 3



Cariotipo normal de alta resolución de la madre (850 bandas).

FIGURA 4



FISH con las sondas correspondientes a las regiones subteloméricas del cromosoma 2. Se observa una microdeleción de la región subtelomérica del brazo largo 2q (señal roja).

de las que disponemos en el laboratorio, incluyendo las sondas teloméricas (Multiprobe-T). La aplicación de estas técnicas de FISH, nos permitió en algunos casos "confirmar" la alteración cromosómica sospechada previamente con cromosomas de alta resolución, y en otros casos "diagnosticar" una alteración no visible con las técnicas de citogenética.

Las alteraciones estructurales fueron: 1 duplicación, 6 deleciones, 9 traslocaciones, 4 derivados de traslocación (que implican una duplicación parcial y una deleción parcial), 5 inversiones, 1 derivado de inversión (que implicaba una duplicación), 1 inserción, 1 cromosoma en anillo (derivado del cromosoma 8), 2 marcadores (uno derivado del cromosoma 15, y otro que estaba en un mosaico muy bajo y no se pudo identificar su origen), 2 microdeleciones y 2 casos con alteración en 7q36 (enviados a Dinamarca para que, mediante otras técnicas de las que no disponemos actualmente, se trate de determinar el tipo de alteración).

En relación con los resultados del estudio de los telómeros que venimos aplicando a niños malformados con cariotipo de alta resolución (850 bandas) normal, sólo hemos encontrado dos alteraciones que vamos a describir.

El primer caso es el de una pareja sana que había tenido dos hijos malformados que murieron en el período perinatal sin diagnóstico y sin cariotipo. Con objeto de descartar alteraciones cromosómicas crípticas en los progenitores, se les realizó el cariotipo de alta resolución (850 bandas) en el ECEMC, que resultó ser normal en ambos miembros de la pareja (Figura 3). A continuación, se les aplicó el "juego de hibridación telomérico" (Multiprobe-T), que en el padre reveló que todos los telómeros estaban en posición correcta, mientras que en la madre mostró la ausencia de la señal correspondiente a la región subtelomérica del brazo largo del cromosoma 2 (2q) (Figura 4), que no se encontró traslocado en ningún otro cromosoma.

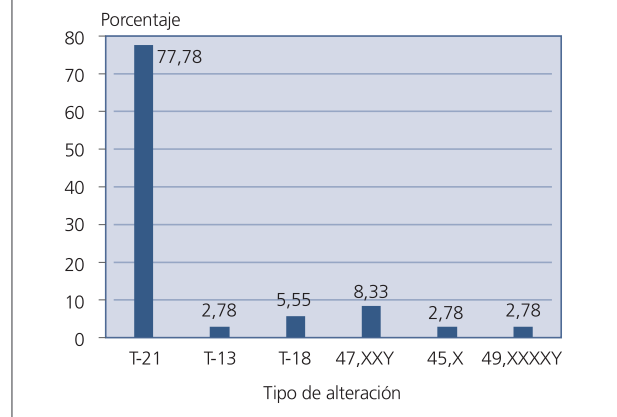
El segundo caso corresponde a otra pareja sana que tuvo una niña con malformaciones congénitas sin diagnóstico, que murió a los pocos años de vida. Se les realizó en primer lugar el cariotipo de alta resolución que resultó ser normal y a continuación el estudio de los telómeros con el "juego de hibridación" y los resultados mostraron que la madre era portadora de una deleción subtelomérica del brazo largo del cromosoma 2 (2q), igual a la del caso anterior.

Esta deleción es una de las que diversos autores han considerado como un polimorfismo y, por tanto, sin repercusión clínica, ni reproductiva. Sin embargo, el hecho de que estas parejas hayan tenido niños malformados, nos debe hacer muy cautos en cuanto a considerar que son simples manifestaciones polimórficas sin ninguna relación con las alteraciones observadas en los hijos. Porque no pode-

TABLA 1
NÚMERO Y PORCENTAJE DE CARIOTIPOS REALIZADOS EN EL AÑO 2001

Normales.....	243 (77,64%)
Alterados.....	70 (22,36%)
- Alt. Numéricas.....	36
- Alt. Estructurales.....	34
Total.....	313 (100%)

GRÁFICA 1
ALTERACIONES NUMÉRICAS DETECTADAS: DISTRIBUCIÓN POR ORDEN DE FRECUENCIA ENTRE EL TOTAL DE LAS 36 ALTERACIONES NUMÉRICAS



mos dejar de considerar que la deleción pudiera haber afectado a la pérdida de un gen, y que quedara su alelo recesivo en el cromosoma homólogo no afectado, que fuera el responsable de los defectos en los hijos.

Por consiguiente, y aunque los primeros estudios eran muy sugerentes, en la actualidad se está empezando a insistir [Joyce y cols., 2001], en que aún no está claro cuáles son las manifestaciones clínicas asociadas a este tipo de reordenamientos subteloméricos. No obstante, aunque la experiencia no es todavía suficiente, su aplicación en algunos casos es de extraordinaria utilidad para el diagnóstico. Por otra parte, la acumulación de resultados sobre estas alteraciones consideradas "polimórficas" va a permitir el estudio de mayores series que pueden darnos pautas sobre su significado real.

Referencias

Anderlid B, Anneren G, Blennow E, Nordenskjold M (1999): Subtelomeric rearrangements detected by FISH in patients with idiopathic mental retardation. Am J Hum Genet Suppl 65:A67.

- Ballif BC, Kashork CD, Shaffer LG (2000): The promise and pitfalls of telomere region-specific probes. *Am J Hum Genet* 67: 1356–1359.
- Cross S, Lindsey J, Fantes J, McKay S, McGill N, Cooke H (1990): The structure of a subterminal repeated sequence present on many human chromosomes. *Nucl Acids Res* 18:6649–6657.
- De Vries BBA, White SM, Knight SJL, Regan R, Homfray T, Young D, Super M, Mckeown C, Splitt M, Quarrell OWJ, Trainer AH, Niermeijer MF, Malcom S, Flint J, Hurst JA, Winter RM (2001): Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist. *J Med Genet* 38:145–150.
- Flint J, Wilkie AO, Buckle VJ, Winter RM, Holland AJ, McDermid HE (1995): The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nat Genet* 9:132–140.
- Joyce CA, Hart HH, Fisher AM, Browne CE (1999): Use of subtelomeric FISH probes to detect abnormalities in patients with idiopathic mental retardation and characterize rearrangements at the limit of cytogenetic resolution. *J Med Genet* 36(suppl): S16.
- Joyce C, Dennos NR, Cooper S, Browne CE (2001): Results from a large study indicate that cryptic subtelomeric rearrangements are not a significant cause of idiopathic mental retardation. *British Human Genetic Conference* 38: Supplement 1:SP62.
- Knight SJL, Horsley SW, Regan R, Lawric NM, Maher EJ, Cardy DLN, Flint J, Kearney L (1997): Development and clinical application of an innovative fluorescen in situ hybridization technique which detects submicroscopic rearrangements involving telomeres. *Eur J Hum Genet* 5:1–8.
- Knight SJL, Regan R, Nicod A, Horsley SW, Kearney L, Homfray T, Winter RM, Bolton P, Flint J (1999): Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet* 354:1676–1681.
- Knight SJL, Flint J (2000): Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. *J Med Genet* 37: 401–409.
- Kuwano A, Ledbetter SA, Dobyns WB, Emanuel BS, Ledbetter DH (1991): Detection of deletion and cryptic translocations in Miller–Diecker syndrome by in situ hybridization. *Am J Hum Genet* 49:707–714.
- Lamb AN, Lytle CH, Aylsworth AS (1999): Low proportion of subtelomeric rearrangements in a population of patients with mental retardation and dysmorphic features. *Am J Hum Genet Suppl* 65:A169.
- National Institutes of Health and Institute of Molecular Medicine Collaboration (1996): A complete set of human telomeric probes and their clinical application. *Nat Genet* 14: 86–89.
- Saccone S, De Sario A, Della-Valle G, Bernardi G (1992): The highest gene concentrations in the human genome are in telomeric bands of metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4913–4917.
- Shaffer LG, Kashork CD, Bacino CA (1999): Letter to the Editor. Caution: Telomere crossing. *Am J Med Genet* 87:278–280.
- Viot G, Gosset P, Fert S (1998): Cryptic subtelomeric rearrangements detected by FISH in mentally retarded and dysmorphic patients. *Am J Hum Genet Suppl* 63:A10
- Vorsanova SG, Koloti D, Sharonin VO, Soloviev V, Yurov YB (1998): FISH analysis of microaberrations at telomeric and subtelomeric regions in chromosomes of children with mental retardation. *Am J Hum Genet Suppl* 65:A154.