

Nueva técnica de identificación cromosómica

*Dr. Fabio Salamanca G., M.D., MSc. **

*Dr. Miguel Guzmán U., M.D., MSc. ***

*Dr. Ernesto Barbosa M., M.D., Ph. D. ****

Iné Martínez P. (Bacterióloga)

INTRODUCCION

A finales de la tercera década del presente siglo, estudios de Citología en insectos habían revelado la heteropicnosis de un cromosoma X, que se manifestaba en la célula en interfase por una masa de cromatina o cromocentro intranuclear (1). Sin embargo, fue solo hasta 1949 cuando Barr y Bertran (2) pudieron establecer este hallazgo en células de mamífero y señalaron la diferencia entre una célula procedente de un individuo del sexo femenino y una procedente del sexo masculino: las primeras poseen el cuerpo de cromatina (cuerpo de Barr) consistente en una porción de cromatina adherida a la superficie interior de la membrana

nuclear y las últimas carecen de cuerpo de Barr. Con el progreso de las técnicas de Citogenética investigaciones posteriores pudieron establecer que la presencia de cuerpos de Barr guardaba una relación estrecha con el número de cromosomas X presentes en la célula, de tal manera que el número de cuerpos de cromatina era siempre igual al número de cromosomas X menos 1, por lo cual, la mujer que normalmente posee dos cromosomas X tiene un cuerpo de Barr; el hombre cuyo complemento gonosómico es XY carece de cuerpo de Barr, y pacientes con aneuploidías (Alteraciones en el número cromosómico que no son múltiplos del número simple o haploide de cromosomas) que comprometen los gonosomas también obedecen a la misma relación y así por ejemplo en los casos bien conocidos de monosomía del cromosoma X (Síndrome de Turner) no hay cuerpo de Barr, en el Síndrome de

* Jefe del Sub-Grupo de Genética -INPES-

** Jefe del Sub-Grupo de Microbiología -INPES-

*** Jefe del Sub-Grupo de Bioquímica -INPES-

Trabajo realizado en el Instituto Nacional para Programas Especiales de Salud -INPES-

Klinefelter (XXY) hay un cuerpo de cromatina; en los complementos XXX ó XXXY hay dos cuerpos de Barr, en los casos XXXX ó XXXXY hay tres cuerpos de Barr, etc. La técnica para encontrar este dimorfismo sexual en la especie humana se simplificó y se generalizó con la utilización de células de la mucosa bucal (3), lo que ha sido de enorme ayuda en el esclarecimiento de anomalías en el desarrollo sexual.

La relación del número de cuerpos de Barr con el de cromosomas X tuvo un nuevo y valioso soporte en los estudios de German (4) sobre replicación tardía de uno de los cromosomas X en la mujer, utilizando el método de timidina marcada con tritio. La explicación a la función del cuerpo de cromatina fué dada por Mary Lyon (5) con la hipótesis que lleva su nombre, según la cual tempranamente en la vida embrionaria (12 - 16 días de desarrollo embrionario) uno de los cromosomas X en la mujer se inactiva, ocurriendo esta inactivación al azar. Siguiendo el comportamiento de algunas enzimas cuyo locus están localizados en el cromosoma X, esta hipótesis ha tenido amplia confirmación (6, 7).

A pesar de que en el hombre el papel del cromosoma Y en la diferenciación sexual está plenamente

reconocido (8), no había sido posible encontrar un método fácil que permitiera su identificación tal como ocurría con el procedimiento utilizado por Barr para la identificación de los cromosomas X supernumerarios. Sin embargo, el reciente hallazgo de Caspersson et al (9) de que los cromosomas toman un patrón específico de fluorescencia al tratarlos con mostaza de quinacrina, no solo permitió un avance importante en las técnicas de citogenética, sino que hizo posible un método para identificar el cromosoma Y. En efecto, estos autores encontraron que con el agente mencionado la porción distal de los brazos largos del cromosoma Y muestra la más intensa fluorescencia en el cario-tipo humano, a pesar de que otros cromosomas como el número 3 y los cromosomas del grupo D (cromosomas 13-14-15) también fluorescen intensamente, especialmente en las regiones próximas al centrómero (10). La técnica se utilizó para estudiar células en interfase empleando hidrocloreuro de quinacrina y fueron Pearson et al (11) y George (12) los primeros en demostrar que la fluorescencia del cromosoma Y también se evidenciaba en las células que no están en división (interfase), apareciendo como un pequeño corpúsculo fluorescente muy cerca de la membrana nuclear. Había surgido así otro

método para diferenciar células masculinas de las femeninas por la presencia en las primeras del cromosoma Y.

La técnica de fluorescencia con mostaza de quinacrina o hidrocioruro de quinacrina ha sido útil en el estudio de anormalidades numéricas y estructurales del cromosoma Y. Los hombres con dos cromosomas Y (síndrome YY) presentan dos cuerpos fluorescentes en las células en interfase (13). Uno de nosotros (F.S.G.) ha descrito un caso de anormalidad estructural del cromosoma Y en el cual se demuestra la utilidad del análisis con sustancias fluorescentes para la identificación de este cromosoma (14).

Con el objeto de contribuir al esclarecimiento del mecanismo (o mecanismos) por el cual estas sustancias tienen incorporaciones selectivas en los cromosomas, y para facilitar la realización de esta técnica Citogenética en nuestro medio, presentamos el primer estudio aparecido en la Literatura, modificando la técnica de fluorescencia mediante el empleo de una nueva sustancia la CLORMETACRINA. (Ba yer).

MATERIAL Y METODOS

Se estudió la acción de la clormetacrina tanto en células en interfase como en células en división. La técnica empleada consta de los pasos siguientes:

- 1.- Se toman muestras de mucosa bucal de hombres y mujeres mediante raspado con escobillón.
- 2.- Se hacen frotis y las láminas se fijan durante 10 minutos en una solución de etanol-ácido acético 1:1.
- 3.- Se cubren las láminas con solución de clormetacrina al 0.4% (concentración con la cual se obtuvieron los mejores resultados) durante 6 minutos.
- 4.- Se lava con agua corriente
- 5.- Se cubren las láminas con buffer fosfato pH 5.3 y se montan en Buffer fosfato pH 7.4.
- 6.- Se observa al microscopio utilizando lámpara de luz ultravioleta.

Para estudiar la acción de la clormetacrina en células en división utilizamos cultivo de linfocitos de sangre periférica realizados mediante la conocida técnica de Moorhead et al (15) con algunas modificaciones. Los cultivos se cosecharon a las

72 horas de la siembra. Una vez preparadas las láminas de los cultivos se siguen los pasos descritos anteriormente.

Las preparaciones se observaron en un fotomicroscopio Leitz Orthoplan, utilizando lámpara de luz ultravioleta HBO 200, con filtro excitador BG 12 y filtros barrera 530 K. De algunas de las preparaciones se tomaron microfotografías las cuales se procesaron por el procedimiento usual.

RESULTADOS Y DISCUSION

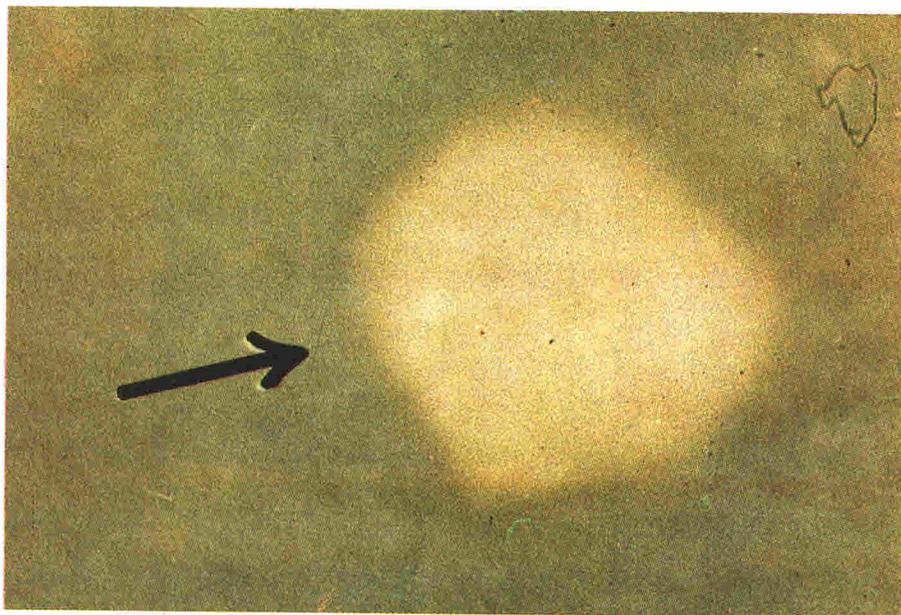
Los resultados aparecen en el Cuadro Nº 1. Puede apreciarse que el 62% de las células masculinas mostró fluorescencia positiva en las células de mucosa bucal mientras que de 500 células femeninas analizadas ninguna mostró cuerpo fluorescente. Se tomaron como positivas aquellas células que mostraron un pequeño cuerpo brillante adosado o muy cerca de la membrana nuclear con una fluorescencia muy intensa tal como se muestra en las Figuras N°s. 1, 2, 3, 4 y 5.

En los cultivos de sangre periférica el 71.7% de las células masculinas en interfase mostró fluorescencia positiva, mientras que nuevamente las células femeninas no mostraron esta fluorescencia.

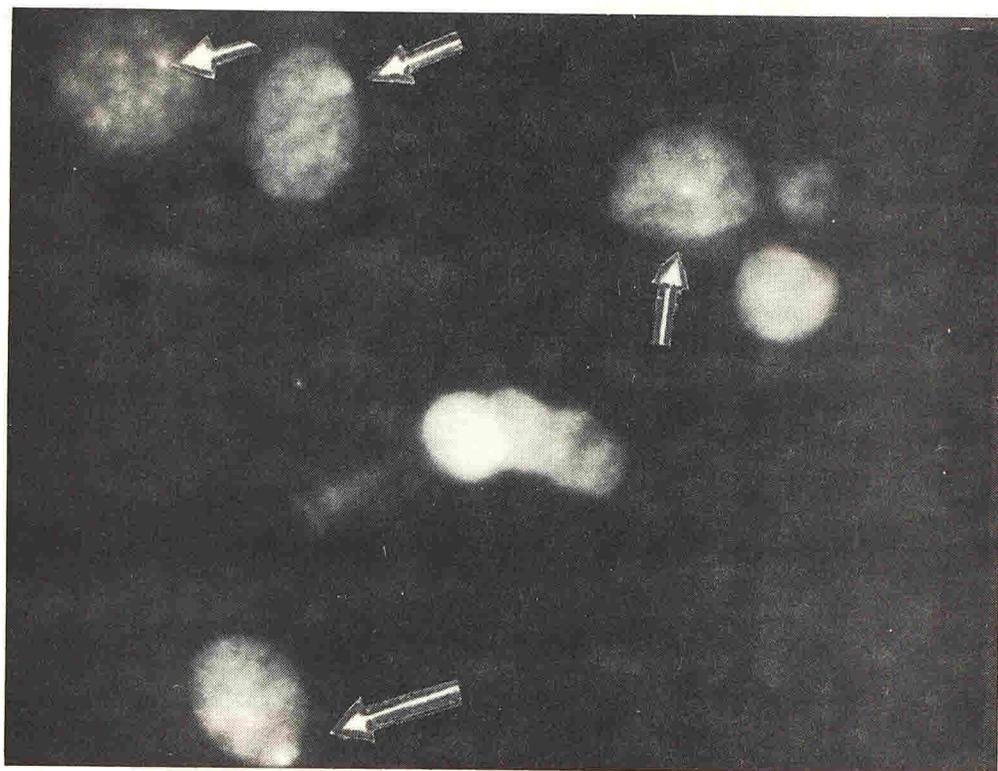
CUADRO Nº 1 CELULAS EN INTERFASE Y METAFASE ANALIZADAS CON CLOR - METACRINA

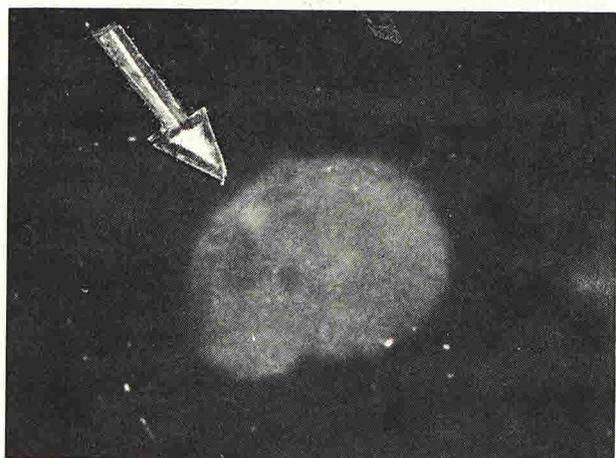
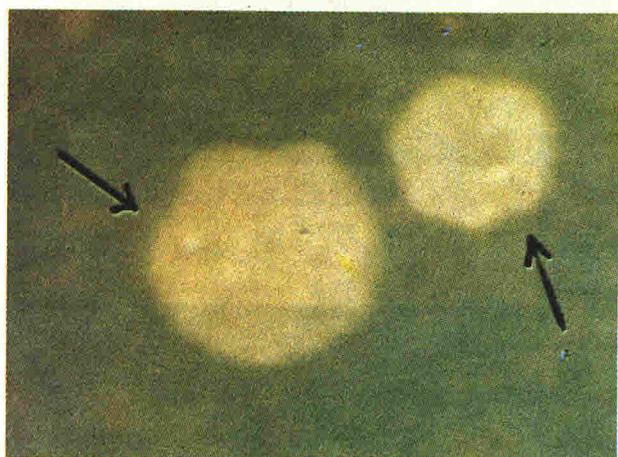
Fluorescencia	MUCOSA BUCAL		CULTIVO DE SANGRE PERIFERICA			
	Nº DE CELULAS		INTERFASE		METAFASE	
	+	-	+	-	+	-
Hombres	620	380	717	283	300	
Mujeres		500		500		100

Todas las metafases masculinas analizadas revelaron la presencia de un cromosoma Y con intensa fluorescencia en la porción distal de los brazos largos según se observa en las Figuras N°s. 6, 7 y 8. No se observó fluorescencia similar en los cariotipos femeninos analizados, a pesar de que otros cromosomas en estas células y en las células masculinas también presentan fluorescencia con un patrón característico, lo cual constituye un gran avance de la técnica al permitir la identificación de los autosomas (cromosomas distintos a los cromosomas sexuales X y Y), y será objeto de otra publicación. La fluorescencia de los autosomas generalmente es menos intensa que la del cromosoma Y (Figuras N°s. 6, 7, 8,). Para comparar los resultados con esta nueva técnica fluorescente, se muestra en la Figura Nº 9 un cariotipo masculino normal obtenido según la técnica habitual con coloración de Giemsa, procedimiento en el cual solamente se pueden diferenciar los distintos



FIGURAS N^os. 1 y 2 Se aprecia el cuerpo fluorescente que evidencia el cromosoma Y, en células en interfase de la mucosa bucal de un individuo normal de sexo masculino.





FIGURAS N^os. 3, 4 y 5 Fluorescencia del cromosoma Y en linfocitos (interfase) procedentes de cultivo de sangre periférica en un individuo normal de sexo masculino.

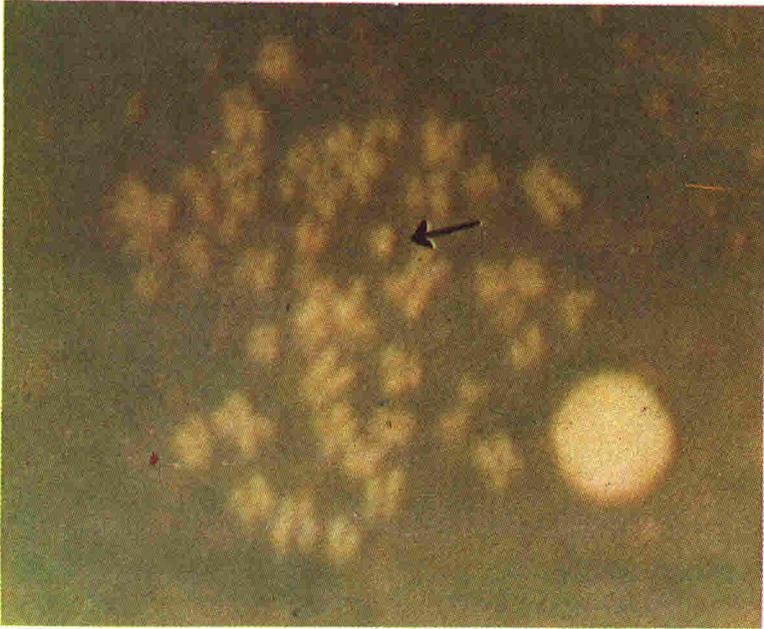


FIGURA N° 6 Metafase de una célula de un sujeto normal de sexo masculino. Se muestra la fluorescencia de la porción distal de los brazos largos del cromosoma Y. Se aprecia a la derecha de la metafase un núcleo en interfase.

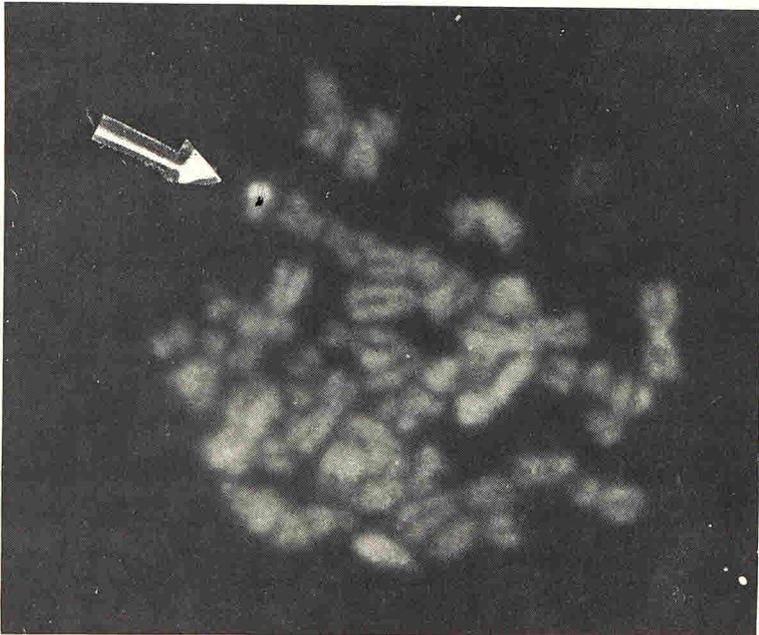


FIGURA N° 7 Fluorescencia de la porción distal de los brazos largos del cromosoma Y en una metafase de una célula de varón normal. A la izquierda se aprecia un núcleo en interfase

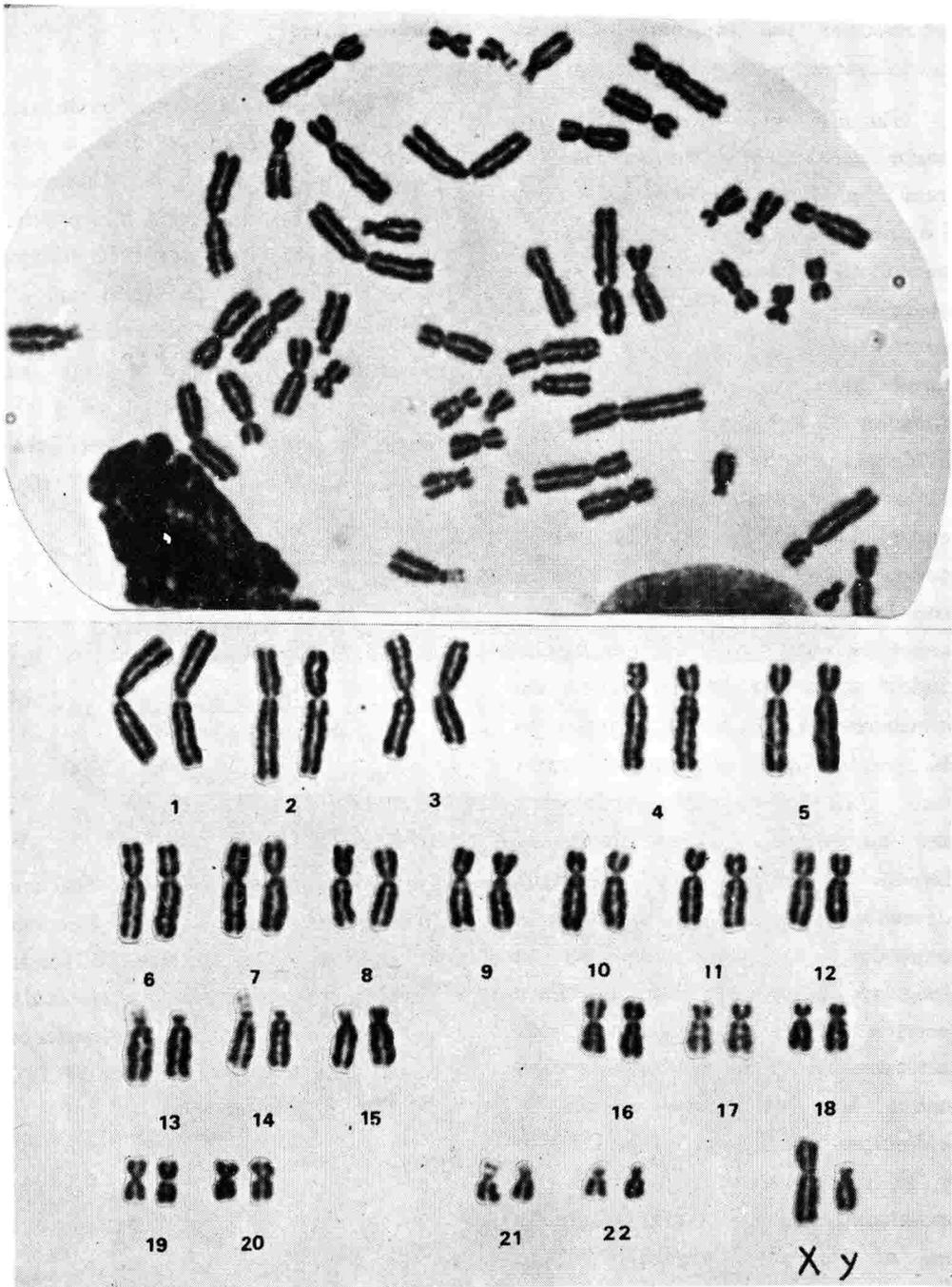


FIGURA Nº 9 Metafase y cariotipo correspondiente a un individuo normal de sexo masculino. Con la técnica citogenética habitual los cromosomas solo se diferencian por su morfología.- Se aprecia el complemento sexual XY del varón normal. Los números del 1 al 22 indican los autosomas (cromosomas distintos a los cromosomas sexuales X y Y).

cromosomas por sus características morfológicas.

En el hombre el papel determinante masculino del cromosoma Y está plenamente aceptado (8). La regulación de la diferenciación sexual en la vida embrionaria se ha atribuido a la interacción de las heterocromatinas de los cromosomas heterocromáticos X y Y (16). Algunos autores han presentado evidencia de que en el hombre los factores determinantes masculinos están localizados en los brazos cortos del cromosoma Y (17). Nosotros en un reciente trabajo hemos señalado que estos factores localizados sobre los brazos cortos del cromosoma Y, no están situados en la porción más próxima al centro mero (14). La variación morfológica del cromosoma Y, en cuanto al tamaño se refiere, en individuos aparentemente normales se hace a expensas de variaciones en la longitud de los brazos largos. Esta porción es la que fluoresce más intensamente con las substancias hasta hoy utilizadas (mostaza e hidrocloreuro de quinacrina, proflavina) y lo hace también con ésta nueva substancia que hemos empleado en el presente estudio. Por qué algunos cromosomas y especialmente la porción distal de los brazos largos del cromosoma Y muestran gran afinidad por las substancias

fluorescentes?

Caspersson et al han postulado que dicha afinidad se debe a una prevalencia de los pares Citosina-Guanina en los segmentos fluorescentes de la molécula del DNA (ácido desoxiribonuléico), pensando que el grupo alquilante de la molécula de mostaza de quinacrina fuera el responsable de ésta afinidad y se uniera a los segmentos del DNA ricos en Guanina (Figura Nº 10).

a) Mostaza de Hidrocloreuro de Quinacrina.

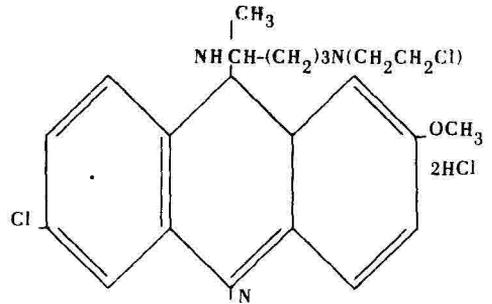


FIGURA Nº 10

Sin embargo el hallazgo de una fluorescencia similar por Pearson et al (11) y George (12) utilizando hidrocloreuro de quinacrina molécula que ha perdido el grupo alquilante en la cadena lateral (Figura Nº 11),

b) Hidrocloreuro de Quinacrina.

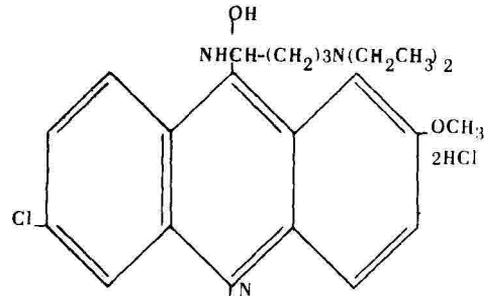


FIGURA Nº 11

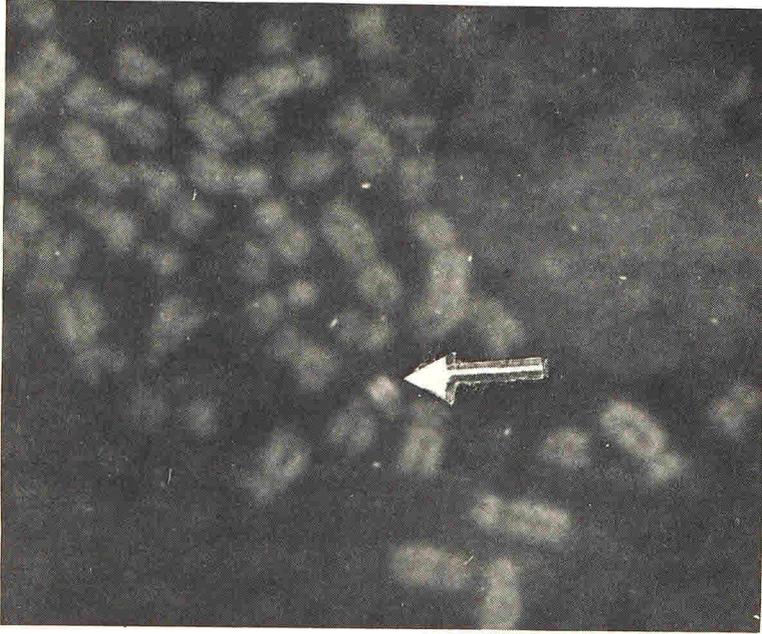


FIGURA N° 8 Intensa fluorescencia de la porción distal de los brazos largos del cromosoma Y en una metafase de una célula de un individuo normal de sexo masculino.

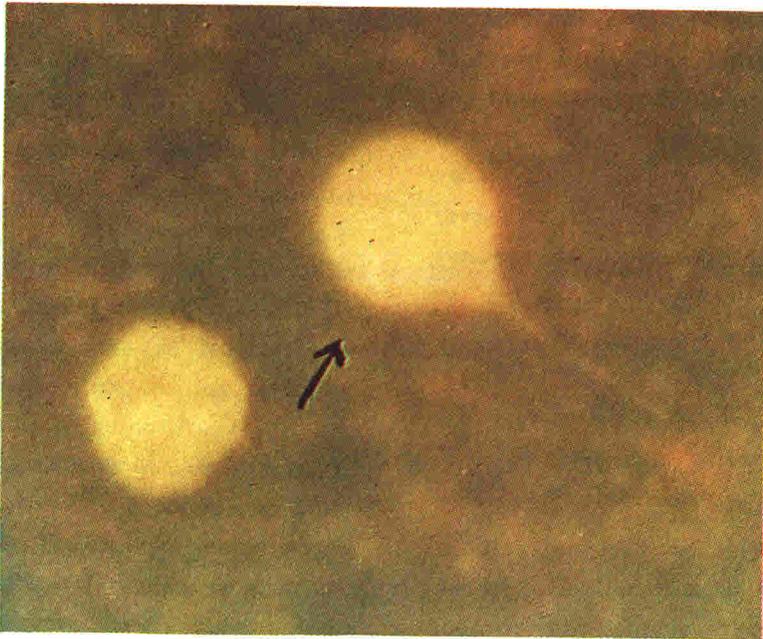


FIGURA N° 13 Cuerpo fluorescente en un espermatozoide que porta el cromosoma Y. Los espermatozoides que portan cromosoma X no presentan este corpúsculo fluorescente.

está en contra de la posibilidad sugerida por Caspersson y su grupo. Nuestro hallazgo utilizando clormetacrina, molécula que también sufre una modificación en la cadena lateral (Figura Nº 12) habla en favor de que la afinidad química específica está dada más bien por el anillo o núcleo central que por la cadena lateral.

e) Clor-Metacrina.

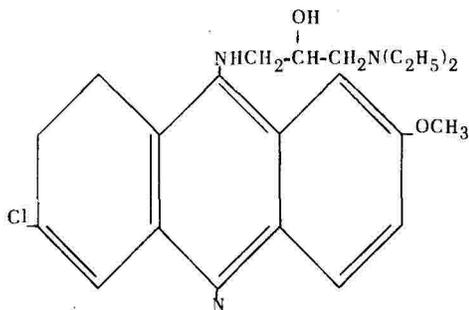


FIGURA Nº 12

La técnica con substancia fluorescente ha permitido no solo un nuevo método citogenético para evidenciar el dimorfismo sexual en el hombre, tal como lo demuestra el presente trabajo, sino que además ha revolucionado las técnicas citogenéticas, al permitir una identificación más precisa del cariotipo humano ya que la substancia se incorpora de manera específica en los distintos cromosomas (Figuras Nºs. 6, 7 y 8). De ésta manera se pueden diferenciar los cromosomas que pertenecen a los grupos C, F y G, los cuales no se diferenciaban de modo concluyente por estudios de autorradiografía

siguiendo la incorporación con timidina triatida (18). Con el método fluorescente se logra la identificación más exacta de los cromosomas envueltos en alteraciones estructurales del tipo por ejemplo de la translocación, en la cual se intercambia segmentos de distintos cromosomas. Por este método se ha establecido igualmente que el cromosoma extra en el síndrome de la Trisomía G1 (mongolismo) no es el mismo que se encuentra en la leucemia mieloides crónica y que tiene una deleción o amputación en sus brazos largos (cromosoma Philadelphia o Ph¹) (19), como se venía afirmando hasta ahora. El método ha sido útil también en el estudio de la relación de anomalías cromosómicas con el cáncer, habiéndose encontrado en algunos trabajos una mayor frecuencia de lo esperado de translocaciones y deleciones cromosómicas. Otro empleo de la técnica es el averiguar el sexo genético del feto durante el embarazo, investigación adelantada desde hace varios años por muchos laboratorios en el mundo. Gracias al método fluorescente es posible hacer una identificación más adecuada y segura del sexo genético del feto. Algunos de estos estudios se están adelantando en nuestro laboratorio.

Una empresa ambiciosa en el campo de la Genética ha sido la de separar los espermatozoides que

portan cromosoma Y de los que portan cromosoma X, con el objeto de hacer fecundaciones selectivas en cuanto al sexo se refiere. La técnica descrita en este trabajo permite identificar los espermatozoides que portan el cromosoma Y tal como se muestra en la figura N^o 13 en donde se aprecia un espermatozoide que porta el corpúsculo fluorescente correspondiente al cromosoma Y.

La técnica reportada en el presente trabajo no solo facilita

estudios citogenéticos en nuestro medio, ya que la clormetacrina es de más fácil obtención que otras sustancias fluorescentes que se incorporan selectivamente en los cromosomas, sino que además permite estudios de gran importancia en el campo de la Biología y particularmente de la Genética. Por otra parte contribuye a precisar el mecanismo por el cual las sustancias fluorescentes se unen a porciones específicas del Genoma Humano.

RESUMEN

Se presenta el primer informe aparecido en la literatura sobre una nueva técnica de Identificación Cromosómica mediante el empleo de la Clor-Metacrina. Se señalan algunos usos de esta técnica en el campo de la Biología y particularmente de la Citogenética tales como Identificación del Sexo Genético en Anomalías de Desarrollo Sexual y del Sexo del Feto durante el Embarazo. Se discuten los posibles mecanismos de la acción específica de esta substancia sobre el genoma Humano.

AGRADECIMIENTOS:

Los autores expresan sus agradecimientos a los doctores Pablo Morillo C., Luis J. Villamizar H., Hemando Groot L., Augusto Corredor A. y Alfredo Lleras P., por las facilidades otorgadas para la realización de éste trabajo

SUMMARY

This is the first Cytogenetic Study using the fluorescent compound Clor-Metacrine. Utility of this technique in detecting the genetic sex of a foetus during pregnancy, in detecting sex of patients with sex malformations, detecting male germ cells (Zpermatozoa) bearing Y-chromosome and in other branches of Biology are discussed.

In the other hand, this study is one approach to clarify the chemical Mechanism responsible for binding of fluorescent compounds to the specific portions of human Karyotype.

REFERENCIAS

1. Geitler, L., *Z. Zellforsch. Mikroskop. Anat.*, 26: 641, 1937.
2. Barr, M.L. y Beltran, E.G., *Nature*, 163: 676, 1949.
3. Marberger, E., Boccabella, R.A., y Nelson, W.O., *Proc. Soc. Exptl. Biol. (N.Y.)*, 89: 488, 1955.
4. German, J.L., *Trans. N.Y. Acad. Sci.* 24: 395, 1962.
5. Lyon, M.F., *J. Hum. Genet.*, 14: 135, 1962.
6. Gross, R.T., Huewitz, R.E., y Marks, P.A., *J. Clin. Invest.* 37: 1176, 1958.
7. Harris, H., Hopkinson, D.A., Spencer, N., Court-Brown, W.M. y Mantle, D., *Ann. Hum. Genet. (London)* 27: 59, 1963.
8. Polani, P.E., en *Molecular Genetics and Human disease* (edit. por Gardner, L.I.) 132 (c.c. Thomas, Springfield, Illinois), 1961
9. Caspersson, T., Farber, S., Foley, G.E., Kudynowski, J., Modest, E.J., Simonsson, E. Wagh, U., y Zech, L., *Exptl. Cell Res.*, 49: 219, 1968.
10. Caspersson, T., Zech, L., y Johansson. *Exptl. Cell Res.* 60: 315, 1970.
11. Pearson, P.L., Bobrow, M. y Vosa, C.G., *Nature*. 226: 78, 1970.
12. George, K.P., *Nature* 226: 80, 1970.
13. Pearson, P.L., Bobrow, M. y Vosa, C.G., *Nature*. 226: 78, 1970.
14. Amendares, S., Salamanca, F., Buentello, L., Cantú, J., *J. Med. Genet. (en Prensa)*.
15. Moorhead, P.S., Nowell, P.C., Mellman, W.J., Battips, D.M. y Hungerford, D.A., *Exptl. Cell Res.*, 20: 613, 1960.
16. Mittwoch, U., en *Sexchromosomes* (Academic Press, New York and London) 1967.
17. Jacobs, P.A., y Ross, A. *Nature* 210: 352, 1966.
18. Chicago Conference, *Standardization in Human Cytogenetics, Birth Defects, Original Article Series II: 2* (The National Foundation, New York, 1966).
19. O'Riordan, M.L., Robinson, J.A., Buckton, K.E., Evans, H.J. *Nature* 230: 167, 1971.
20. George, K.P. y Polani, P.E., *Nature* 228: 1215, 1970.