

GENETICA

NEWSLETTER

CONCEPTOS Y NOVEDADES EN GINECOLOGIA, OBSTETRICIA Y NEONATOLOGIA

SETIEMBRE 1999

"Newsletter": el método más eficaz y económico para educación y actualización médica a distancia" (*).

NUMERO 7

Editorial

“La historia de la Tierra está escrita en sus capas geológicas y la del hombre, en sus cromosomas”. ¿Quién se atreve a leerlas?

Los esfuerzos por tratar de “leer” los cromosomas con enfoque clínico arrancan en la década de los '50. Desde entonces a la fecha se ha experimentado un avance vertiginoso con la explosiva difusión de esta disciplina y una avalancha de trabajos de delineación de patologías de causas cromosómicas. La década del '70 se caracterizó por el desarrollo de técnicas de identificación y las décadas posteriores por las técnicas de citogenética molecular.

¿Quién no ha acariciado, entre las bandas de alta resolución, un fantástico deseo de tender un puente entre lo cromosómico y lo molecular?

Estamos asistiendo, a no dudarlo, al momento privilegiado de poder materializar aquella fantasía a través de técnicas moleculares. Sin embargo, el elevado costo en infraestructura, equipamiento e insumo parecen

constituir el "peaje" para transitarlo en momentos en que los recursos en salud son limitados.

Esto ha generado un estado de oculta insatisfacción e infelicidad entre muchos citogenetistas y una sensación de labor inconclusa.

Hasía parece irreverente echar una mirada retrospectiva desde la arrogante comodidad del CCD e imágenes digitalizadas. Sin embargo, hubo épocas no tan lejanas ni tan privilegiadas donde se podía avanzar aún diseando larvas de *Drosófila* con pinches de cactus por falta de instrumental o cultivando linfocitos en una paila de cobre por falta de energía eléctrica, a puro pulmón, sí, pero se podía avanzar.

Dr. Tetsuji Matayoshi.

CITOGENETICA DE GAMETAS

Gametas masculinas

Técnicas

Los cromosomas de los espermatozoides humanos pueden analizarse mediante la aplicación de técnicas citogenéticas convencionales sobre las preparaciones obtenidas a través de inseminación de ovocitos de hamster o mediante el uso de técnicas de FISH interfásico sobre los extendidos de espermatozoides. En ambos casos la muestra se obtiene del semen recién eyaculado.

Para la recolección de la muestra en pacientes oligospermicos severos o azoospermicos se puede recurrir a los espermatozoides del epidídimo o a la biopsia testicular. No se han detectado diferencias en la frecuencia de defectos congénitos entre productos provenientes de FIV y los obtenidos por ICSI. Esto permite presumir que no existen diferencias entre el espermatozoide de diferente origen.

- Técnica de inseminación de ovocito de hamster (fig. 1).

Como se observa en la figura, la técnica consiste en la inseminación de ovocitos de hamster artificialmente desprovistos de cumulus celular y zona pelucida, con espermatozoides humanos capacitados.

Las técnicas citogenéticas convencionales facilitan de manera considerable el análisis del cariotipo pronuclear obtenido. Esto permite

En el estudio cromosómico se aplican técnicas diferentes para las gametas masculinas y femeninas.

obtener un diagnóstico preciso de las anomalías numéricas y estructurales.

Esta técnica resulta poco apta a nivel asistencial debido al costo que representa en cuanto a tiempo, recursos físicos y humanos.

- FISH interfásico

Esta técnica, por el contrario, es simple, de resultado rápido (en horas) y de bajo costo.

Consiste en hibridizar extendidos de espermatozoides con sondas numerales para detectar luego las anomalías numéricas.

Anomalías cromosómicas

La frecuencia de anomalías cromosómicas en espermatozoides de individuos sanos ronda el 10%, y existe un leve predominio de las estructurales sobre las numéricas. No se ha demostrado ninguna relación entre la frecuencia de anomalías numéricas y la edad del paciente, lo cual permite descartar la participación del factor edad-paterna en la producción de trisomías autosómicas, como por ejemplo, la trisomía 21.

La participación de las gametas masculinas en la formación de complementos sexuales anómalos parece seguir otro patrón, como se resume en la Tabla I.

Técnica de estudio del cariotipo pronuclear

Ovocito de *mesocricetus auratus*
1.- Pretratamiento
2.- Lavado del oviducto
3.- Remoción del cumulus celular
4.- Remoción de goma

Espermatozoide humano
1.- Recién eyaculado o criopreservado
2.- Liquefacción
3.- Swimming up
4.- Capacitación

• Inseminación
• Cultivo
• Cosecha

(* American Journal of Human Genetics 52:225 y 53:1336, 1993)

Origen paterno

- 47, XYY.....100%
- 45, X.....80%
- 47, XXY.....50%
- 47, XXX.....7%

Las alteraciones estructurales más frecuentes son: roturas, gaps, fragmentos acéntricos, etc. Las translocaciones alcanzan el 0,1% y las más frecuentes son las robertsonianas 13/14, particularmente entre los varones subfértiles.

Entre las causas más frecuentes de infertilidad masculina se encuentra la fibrosis quística de páncreas y la microdelección a nivel de AZF del cromosoma Y.

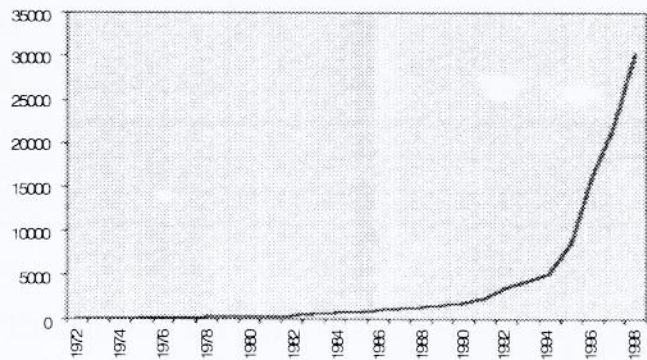
Merece un comentario especial la información obtenida a partir de las técnicas de genética molecular: se ha observado una alta frecuencia de microdelecciones en AZF que se ubica a nivel

de Yq11.23. En este segmento se distinguen tres partes: AZFa o proximal; AZFb o media; y AZFc o DAZ o distal.

Más del 15% de los azoospermicos no

obstructivos y el 10% de los oligospermicos severos presentan esta delección, contra sólo el 2% de los varones sanos. En la espermatogénesis intervienen múltiples genes de este segmento.

Mapeo génico



Número de genes mapeado por año

DIAGNOSTICO CITOGENETICO PREIMPLANTACION

Los programas de fertilización asistida han permitido desarrollar técnicas de micromanipulación orientadas al estudio citogenético de gametas, cigotas y blastómeras antes de su implantación. Estos estudios se pueden realizar exclusivamente en el marco de dichos programas y como parte de ellos.

TECNICAS

En la práctica existen dos grupos de técnicas: las preconcepcionales y las postconcepcionales, aunque en rigor sólo estas últimas apuntan al objetivo específico de estudiar un ovocito fecundado antes de su implantación. Las primeras consisten en el estudio de gametas femeninas durante un programa de fertilización asistida.

Preconcepcionales

Se trata del análisis de cariotipo de los globos polares o los ovocitos mediante técnicas citogenéticas convencionales o técnicas moleculares.

Teóricamente el estadio de ciclo celular en que se hallan permite obtener cromosomas metafásicos tanto en globos polares como en ovocitos, característica ésta que los vuelve aptos para un estudio citogenético detallado. Sin embargo, esta aparente ventaja queda seriamente limitada porque la cantidad de células realmente adecuada para ese tipo de estudio no supera el 30% en promedio.

El cariotipo de los globos polares permite deducir la condición citogenética de ovocito. Así, la detección de un set cromosómico desbalanceado en el globo polar I equivale a haber detectado otro set complementario, desbalanceado también, en el ovocito.

Estas últimas consideraciones no se aplican, por razones obvias, cuando se estudia directamente el ovocito. Se estima que la frecuencia de ovocitos maduros con anomalías cromosómicas es del 32% y la presencia de ovocitos en metafase II que continúan diploides es motivo de trabajos de investigación.

Uno de los aspectos destacables de las técnicas preconcepcionales es que pueden llevarse a cabo superando posiblemente válidas objeciones éticas y religiosas.

Postconcepcionales

Después de la fertilización el cigota sufre una división cada 24 horas, llega al estadio de morula al tercer día y al de blastocisto entre el quinto y

sexto día. Para realizar el estudio es preferible remover un cuarto de las células: 1 ó 2 células en el estadio de 8 células, o la biopsia de trofoectodermo (10 ó 20 células) del blastocisto.

Cuanto mayor sea la cantidad de células disponibles para el análisis, más alto será el grado de confiabilidad del diagnóstico. No obstante, la necesidad de preservar la viabilidad del embrión obliga a acotar la pretensión cuantitativa y depurar las técnicas. Es conveniente mantener la relación MCI/trofoectodermo en un nivel óptimo ya que la reducción de esta relación repercute en el desarrollo embrionario.

Indicaciones

Las principales son:

- grupo con alto riesgo de transmitir anomalías citogenéticas;
- parejas sub o infértiles;
- portadores de patologías ligadas al X; etc.

En los casos de portadores de rearrreglos cromosómicos (principalmente translocaciones) el riesgo reproductivo depende de los siguientes factores: los cromosomas involucrados, los puntos de rotura y re-unión, el número y la posición de quiasmas.

En base a estos elementos Jalvert propuso un modelo de segregación preferencial. La observación de más de un tipo de segregación entre espermatozoides de un mismo portador permite dudar de la validez de este modelo, por lo menos en estas etapas tempranas. Parece ajustarse mejor en el caso de embarazos más avanzados o recién nacidos.

La edad materna avanzada es el único factor de riesgo conocido para la producción de aneuploidías, que son los defectos genéticos de mayor frecuencia y siempre *de novo*. Existe una estrecha relación entre la edad materna avanzada y la baja tasa de implantación, que tiene como común denominador el aumento de aneuploidías.

Las parejas con una historia obstétrica signada por múltiples abortos o

muerres intrauterinas pueden beneficiarse con estudios citogenéticos preimplantación. Más del 50% de los abortos presentan anomalías cromosómicas.

Citogenética

La frecuencia de embriones haploides es de 1%; diploides 93% y triploides 6% y el 23% de ellos es cromosómicamente anómalo.

La aplicación de técnicas citogenéticas convencionales no siempre resulta exitosa por la calidad y cantidad limitadas de metafases analizables; son más eficaces las técnicas citogenéticas moleculares.

Los "probes" de enumeración pueden ser aplicados tanto en núcleos interfásicos como metafásicos y permiten detectar más del 70% de las

aneuploidías. Las trisomías del 15, 16, 21 y 22 y las anomalías numéricas de los cromosomas sexuales son las alteraciones más frecuentemente halladas.

Los "probes" de pintado de cromosomas permiten aclarar muchos casos de re-arreglo cromosómico si se los aplica sobre cromosomas metafásicos.

Existe una técnica de más reciente desarrollo que emplea probes especiales para cada translocación: centroméricos, teloméricos y subtroméricos. Dicha técnica parece haber elevado a más del 90% el nivel de eficacia en la detección de anomalías cromosómicas. A pesar de ello, sólo las experiencias acumuladas permitirán expedirse sobre su aplicabilidad en la práctica asistencial.

MOSAICISMO CONFINADO A LA PLACENTA Y DISOMIA UNIPARENTAL

Si en el curso de un estudio citogenético prenatal por aspiración de vellosidades coriales se detecta un mosaicismo en las preparaciones directas, en el cultivo de corto plazo o en el cultivo de largo plazo pero no en el líquido amniótico ni en el feto, se habla de mosaicismo confinado a la placenta. Su frecuencia es de 2% y se describen tres tipos:

- **Tipo I:** cuando las células anómalas están confinadas en el citotrofoblasto y se las detecta en preparaciones directas y en cultivos de corto plazo.
- **Tipo II:** cuando están confinadas en el mesodermo extraembrionario y se las encuentra en cultivos de largo plazo.
- **Tipo III:** cuando se las encuentra tanto en el citotrofoblasto como en el mesodermo extraembrionario. Se las detecta por las 3 vías: preparaciones directas, cultivos de corto plazo y cultivos de largo plazo.

Mecanismo de formación del mosaicismo

Las siguientes son las vías más conocidas de formación del mosaicismo:

- 1.- No disyunción temprana con placenta mosaico y feto normal.
- 2.- Rescate de un cigota trisómico.
- 3.- Células provenientes de un mellizo muerto.

Los mosaicismos confinados a la placenta del tipo I y III son, en general, consecuencia del mecanismo de rescate con alta proporción de células trisómicas a nivel del citotrofoblasto. Mientras que si son resultantes de no-disyunción mitótica, dichos mosaicismos son del tipo I o II, con baja proporción de células trisómicas.

Rescate de cigotas trisómicas y disomía uniparental

En un organismo diploide cada par cromosómico está constituido por un elemento proveniente de

Mosaicismo es la presencia de dos o más líneas celulares cariotípicamente diferentes.

cada uno de los progenitores. Cuando este equilibrio se rompe y ambos cromosomas del par tienen el mismo origen parental se crea una situación anómala llamada disomía uniparental. Según el momento en que se produce el error meiótico y la extensión del *crossing over*, la disomía puede ser: heterodisómica, isodisómica o la combinación de ambas. La causa más frecuente de esta situación es el mecanismo de rescate del cigota trisómico, que tiende a restituir la disomía normal a través de una de las siguientes vías:

- a) Anafase lag: una de las células hijas resultaría disómica y la otra seguiría siendo trisómica.
- b) No disyunción: una de las células hijas sería disómica y la otra tetrasómica letal.
- c) Demolición cromosómica: consistiría en una fragmentación o simple remoción de uno de los tres cromosomas; si esta corrección se realiza en la primera división poscigótica con resustitución de la disomía biparental en ambas células hijas, no quedaría ningún rastro del error meiótico inicial.

Consecuencia de la disomía uniparental

Aunque no existen evidencias en tal sentido, si la elección del cromosoma involucrado en el rescate fuera al azar, la probabilidad de que se produzca disomía uniparental sería del 33% para

cada instancia.

La primera consecuencia es la aparición de patologías recesivas en isodisomías a partir de uno de los padres heterocigota. Por ejemplo, se han documentado muchos casos de fibrosis quística y síndrome de Bloom.

La heterodisomía no suele crear situaciones anómalas, excepto cuando los dos cromosomas provienen de un padre afectado por una enfermedad dominante.

Otra consecuencia relevante es la expresión clínica del fenómeno llamado de *imprinting*. En algunos genes la expresión del alelo depende del origen parental del cromosoma que lo contiene. En la literatura existen casos documentados de disomía uniparental en los siguientes cromosomas: 2, 7, 9, 10, 11, 14, 15, 16 y 22.

Nota

Dado que la mayoría de las situaciones anómalas originadas por *imprinting* fueron abordadas en el Nro.5 de **GENETICA** (marzo 1998), se omite insistir en el tema.

Tipos de mosaicos

La proporción de mosaicismo placentario es de alrededor del 2%.

A continuación se mencionan los más frecuentes:

- Mosaico de trisomías no comunes.
- Mosaico de cromosomas sexuales.
- Mosaico de trisomías comunes (cromosomas 13, 18 y 21).
- Mosaico de marcadores.
- Mosaico de alteraciones estructurales.

Comentarios

Aunque no se conoce con exactitud la relación entre el mosaicismo placentario y la viabilidad fetal, el retardo del crecimiento intrauterino, los abortos y las malformaciones observadas entre los casos de mosaicismo placentario sugieren la existencia de efectos adversos en el embarazo.

Raúl Scarpati
Andrea Figueroa
Celina Oyuela

Curso intensivo de "Screening" Prenatal Ecografico-Bioquímico de Defectos Congénitos

8 y 9 de octubre de 1999 - de 9 a 18 hs.

Sección Genética - Departamento de Ginecología y Obstetricia
CEMIC-Hospital Asociado- Facultad de Medicina UBA

Galván 4102 (1431) Buenos Aires - Tel. 4546-8248 - Fax: 4541-3790 - e-mail: cemicinv@infovia.com.ar

- Dirigido a ginecólogos y obstetras, genetistas, ecografistas, bioquímicos y otros profesionales relacionados con el área de diagnóstico prenatal.
- Tratamiento integral de la metodología del tamizaje bioquímico y ecográfico con AFP, uE3, hCG, BhCG libre, PAPP-A, TN y otros signos ecográficos.
- Actualización de las metodologías de diagnóstico prenatal: aspiración de vellosidades coriónicas, amniocentesis.
- Talleres y aspectos prácticos del tamizaje prenatal.
- Prevención primario de defectos congénitos.

Director: Dr. Horacio Aiello
Asesor: Dr. Enrique C. Gadow
Secretarios: Dr. Hugo Krupitzki, Dr. Lucas Otaño
Secretaría: Norma Ginzo

Docentes: Dr. Horacio Aiello, Lic. Andrea Gadow,
Dr. Hugo Krupitzki, Dr. Santiago Lippold,
Dr. Jorge López Camelo, Dr. Lucas Otaño,
Dra. Silvia Quiroga, Lic. Marta Torres

PROGRAMA

Primer día

- Recepción. Bienvenida (*ECG*).
- Antecedentes históricos del diagnóstico y tamizaje prenatal (*ECG*).
- Principios del tamizaje I (un marcador) (*HA*).
- Principios del tamizaje II (múltiples marcadores) (*HA*).
- Taller: cálculo de riesgo para defectos congénitos (*HA* y otros).
- Epidemiología de las Anomalías de Cierre del Tubo Neural y Síndrome de Down (*JLC*).
- Comprensión de MoM, distribuciones y regresiones (*HK*).
- Factores que modifican los resultados del tamizaje: DBT, raza, peso (*HK*).
- Efectos del ultrasonido sobre los resultados del tamizaje bioquímico (*HA*).
- Marcadores bioquímicos del primer trimestre: PAPP-A, BhCG libre (*AH*).
- Impacto psico-social ante una prueba de tamizaje positiva (*AG*).
- Revisión y discusión (*todos*)

Segundo día

- Tamizaje ecográfico de Síndrome de Down en segundo trimestre (*SEL*).
- Tamizaje ecográfico de Síndrome de Down en primer trimestre: Traslucencia Nucal (*LO*).
- Diagnóstico ecográfico de anomalías de cierre del tubo neural y defectos de la pared abdominal (*SEL*).
- Fisiología y aspectos bioquímicos de AFP, hCG, uE3 (*SQ*).
- Control de calidad interna y externa del laboratorio (*MT*).
- Procedimientos diagnósticos en primer y segundo trimestres (*VC* y *LA*): eficacia y riesgos (*ECG*).
- Marcadores bioquímicos y otras anomalías del desarrollo (*LO*).
- Otros métodos de tamizaje prenatal (*HA*).
- Casos clínicos (*HA* y otros).
- Prevención primaria de defectos congénitos con ácido fólico (*HK*).
- Aspectos prácticos en implementación de un sistema de tamizaje prenatal (*HA*).

EDITORIAL

Sección Genética
Departamento de Ginecología y
Obstetricia
CEMIC - Hospital Asociado.
Facultad de Medicina
UBA.

- GENETICA CLINICA Y REPRODUCCION.
- CITOGENETICA Y GENETICA MOLECULAR.
- DISMORFOLOGIA.
- GENETICA POBLACIONAL.

Secretaría de Redacción:
Julia Raggi

Dirección Postal: "Newsletter"
Sección Genética, Galván 4102 (1431)
Buenos Aires - Argentina
Tel.: 4546-8248
Fax: 4541-3790

Todos los derechos reservados.

Registro de la Propiedad Intelectual: en trámite.

GENETICA

CONCEPTOS Y NOVEDADES EN GINECOLOGIA, OBSTETRICIA Y NEONATOLOGIA

NEWSLETTER

CORREO ARGENTINO CENTRAL (B)

FRANQUEO PAGADO CONCESION N° 7084