



211
2ej

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DE LA MITOMICINA C SOBRE LAS
TRANSLOCACIONES ROBERTSONIANAS

T E S I S

Que para obtener el Título de

B I O L O G O

p r e s e n t a

ZAVALETA ABREU MARIA DE JESUS

México, D. F.

1987



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

	PAG
INTRODUCCION.....	1
MATERIAL.....	10
METODO	13
RESULTADOS	17
DISCUSION	23
APENDICE	30
BIBLIOGRAFIA	32

A B R E V I A T U R A S

M M C

Mitomicina C.

A D N

Acido desoxirribonucleico.

N A D P H

Fosfato de nicotinamida-adenin-dinucleótido
en su forma reducida.

C d

del ingles "centromeric dots" .

g.l.

Grados de libertad.

g.

Fuerza de la gravedad.

INTRODUCCION

Las translocaciones Robertsonianas o fusiones céntricas consisten en la unión de dos cromosomas acrocéntricos homólogos o no, previa ruptura a nivel de brazos cortos o largos en la región proximal al centrómero (1, 2, 3). En el cario tipo humano los acrocéntricos están representados por los cromosomas de los grupos D: 13, 14, 15 y G: 21 y 22 (1).

Se han formulado dos hipótesis acerca del mecanismo por el cual puede realizarse esta fusión. La primera postula que en los dos cromosomas acrocéntricos ocurre una ruptura, en uno de ellos a nivel de los brazos largos muy cerca del centrómero y en el otro tiene lugar en los brazos cortos (fig. 1), de esta manera se forma un cromosoma de dos brazos que implica la pérdida de un centrómero (2, 4); en teoría los brazos cortos forman un cromosoma pequeño, sin embargo, este se pierde debido probablemente a su tamaño y a que está formado por ADN satélite (2).

La otra hipótesis propone que las dos rupturas ocurren en los brazos cortos de ambos cromosomas acrocéntricos, efectuándose a continuación la unión de éstos cromosomas, lo que produce un cromosoma con dos centrómeros, es decir un dicéntrico y pérdida de los fragmentos debido a que carecen de centrómero (4)(fig. 2).

Una translocación que se forma por este mecanismo repre

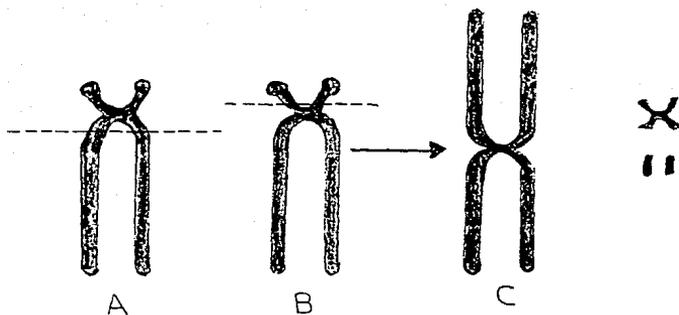


Figura 1.

Mecanismo de formación de cromosomas monocéntricos

El cromosoma A, se rompe en los brazos largos, cerca del centrómero, mientras que en el B, la ruptura ocurre en los brazos cortos, los brazos largos del cromosoma A se unen con los del B y se forma un nuevo cromosoma metacéntrico. El pequeño cromosoma que se forma con el centrómero del cromosoma A y el fragmento del B se pierde.

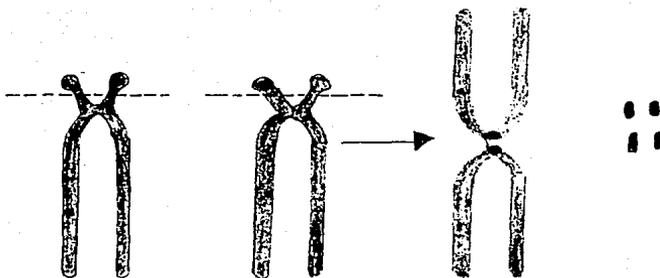
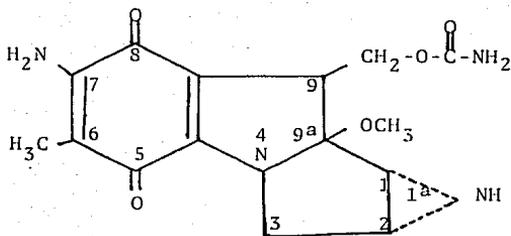


Figura 2. Mecanismo de formación de cromosomas decéntricos. La ruptura ocurre en los brazos cortos de ambos cromosomas acrocéntricos, al formarse la translocación se origina un cromosoma con dos centrómeros. Los fragmentos se pierden.

senta un cromosoma inestable debido a que contiene dos centrómeros, se esperaría entonces que la mayoría de las translocaciones Robertsonianas fueran monocéntricas, sin embargo de acuerdo a la revisión de Daniel (5), en el humano las translocaciones Robertsonianas son en su mayoría dicéntricos por lo cual es difícil explicar la estabilidad de estos cromosomas en la división celular. Una hipótesis postula que la estabilidad del cromosoma dicéntrico se debe a la estrecha proximidad de los centrómeros, lo que ocasiona que estos se comporten como un cromosoma monocéntrico (6, 7, 8, 9). La hipótesis alternativa propone que la estabilidad de estos cromosomas se debe a la supresión de la actividad de uno de los centrómeros en el dicéntrico (7, 8, 10, 11, 12, 13).

A pesar de esta estabilidad, existen algunos casos de pacientes (14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21) en los cuales el cromosoma translocado en algunas células se rompe a nivel centromérico, originando dos acrocéntricos, formándose por tanto una población celular con una constitución cromosómica diferente a la de la otra línea celular, por lo que se produce un mosaicismo en estos individuos. Esto podría deberse a que el punto de unión en el cromosoma translocado fuera estructuralmente frágil (11) y podría in vitro ser susceptible a la acción de agentes mutagénicos como la Mitomicina C (MMC).

La MMC es un antibiótico que se obtiene de Streptomyces caespitosus, tiene un peso molecular de 334 daltons y su estructura (22) es la siguiente:



En ella destacan tres grupos potencialmente activos: Una quinona en posición 5 y 8, un anillo de aziridina en posición 1, 2 y 1^a y un metiluretano en posición 9, que aunados a las sustituciones en las posiciones 7 y 9^a hacen que la estructura de este agente tenga una alta reactividad química (23, 24).

Este antibiótico muestra una acción selectiva sobre el ADN, que consiste a nivel molecular en la alquilación y -- unión en forma cruzada de las cadenas polinucleotídicas (23). Para convertirse en un agente alquilante activo (25) el compuesto original se tiene que reducir y sufrir un rearrreglo molecular. Se ha propuesto una serie de reacciones en la ac

tivación de esta substancia (25, 26) que consisten en lo si guiente (fig. 3):

1.- La Mitomicina C es reducida en presencia de NADPH - a el radical semiquinona y esta especie se une no covalente mente al ADN.

2.- Posteriores reducciones la convierten en hidroquino na, la que pierde fácilmente el metanol y origina ia aziridi nomitosina hidroquinona que constituye la forma activada del antibiótico.

3.- En la aziridinomitosina los grupos alquilantes se - vuelven altamente activos debido a que estan en conjugación con el grupo Indol, por lo que son capaces de unirse covalen temente al ADN. Al parecer primero se une el carbono 1 en - cuanto se produce el ion carbonio reactivo en el anillo de de aziridina, seguido del carbono 10 el cual previamente - - pierde el substituyente carbamoxilo (24).

Una vez que se ha unido este agente a las bases del ADN y puesto que es un agente alquilante bifuncional o trifuncio nal es capaz de formar dos o tres uniones covalentes y unir por tanto en forma cruzada las cadenas de ADN ya sea en for ma intercatenaria o intracatenaria (22, 23).

A nivel citogenético se ha observado que cuando se agre ga este antibiótico a cultivos de linfocitos de personas nor males produce fracturas de tipo cromatídico y cromosómico, -

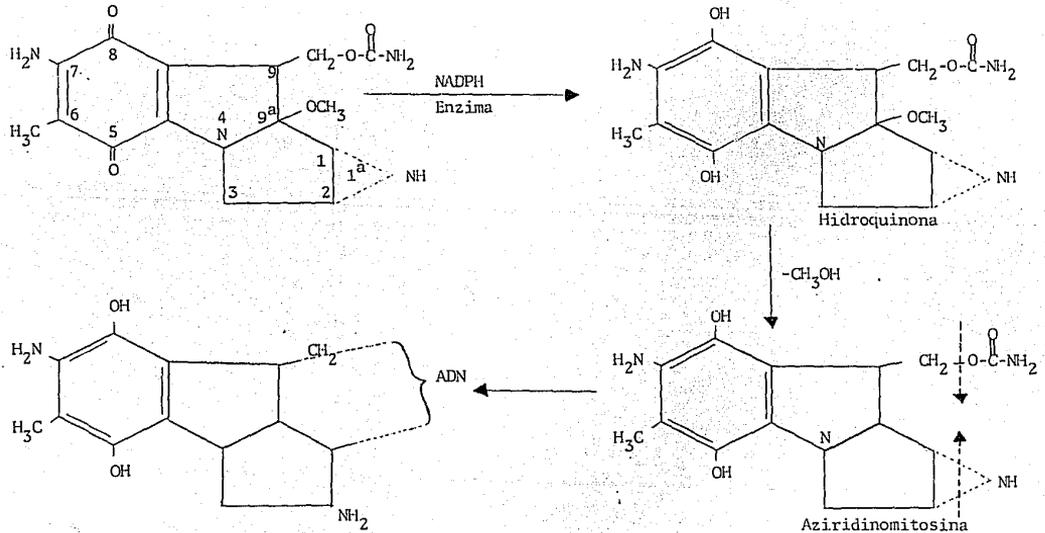


Fig. 3. Un mecanismo para la activación de la MCC con ADN. Las flechas punteadas muestran las uniones que se sabe que se rompen cuando se forman los iones carbonio reactivos. (Iyer y Szabalski, Lown).

fragmentos acéntricos y céntricos, además de rearrreglos como anillos, dicéntricos y figuras radiales, éstos dos últimos - con menor frecuencia en relación a los primeros (27, 28, 29). Varios estudios indican que la distribución de las fracturas producidas por este agente no es al azar, sino que muestra - predilección por las regiones heterocromáticas de los cromosomas 1, 9 y 16, y las zonas centroméricas de los cromosomas acrocéntricos (10, 27, 28).

OBJETIVO

Dada la acción de este agente sobre los cromosomas, el objetivo del presente trabajo es demostrar si la Mitomicina C es capaz de producir disociación de las translocaciones Robertsonianas en linfocitos in vitro.

HIPOTESIS

Si el punto de unión en las translocaciones Robertsonianas es, de alguna manera frágil, entonces cuando se expongan a la acción de la Mitomicina C se observará disociación de la translocación.

MUESTRA DE ESTUDIO

Pacientes: Se estudiaron 6 pacientes en los que previamente se había comprobado la presencia de una translocación Robertsoniana y cuya constitución cromosómica era la siguiente:

Caso 1 46,XY,-21,+t(21q;21q)/46,XY,21p-

Caso 2 45,XY,-13,-22,+t(13q;22q)/46,XY,13p-,22p-

Caso 3 46,XY,-21,+t(21q;21q)

Caso 4 46,XX,-21,+t(21q;21q)

Caso 5 46,XX,-21,+t(21q;21q)

Caso 6 45,XX,-15,-21,+t(15q;21q)

Los casos 1 y 2 presentaban dos líneas celulares; en el caso 1 una población celular era trisómica 21 por translocación 21/21 y en la otra se observó un cromosoma 21 telocéntrico. En el caso 2 una población celular presentaba una translocación balanceada que involucraba los brazos largos de los cromosomas 13 y 22, mientras que en la otra población se observó que los cromosomas 13 y 22 eran telocéntricos. En el caso 1 el cariotipo de ambos padres fue normal, mientras que en el caso 2, la madre era portadora de la translocación, sin que presentara línea normal, y el padre fue normal.

Los casos 3, 4 y 5 fueron trisómicos para los brazos largos del cromosoma 21.

El caso 6 fue de una portadora para la translocación -

que involucra los brazos largos de los cromosomas 15 y 21.

MATERIAL

REACTIVOS

Heparina sódica (Microlab)

Medio Mc Coy's 5a Modificado (Microlab)

Fitohemaglutinina (Microlab)

Antibiótico (Penicilina-estreptomicina) (Microlab)

Mitomicina C (MMC) (Sigma)

Colchicina (Sigma)

Cloruro de Sodio (NaCl) al 0.9% (Suero fisiológico)

Cloruro de Potasio (KCl)

Agua destilada y bidestilada

Tripsina (Gibco)

Acido etilendiamino tetracético EDTA ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$)
(Gibco)

Carbonato de Sodio ($NaHCO_3$) (Merck)

Giemsa (Merck)

Wright (Merck)

Fosfato ácido disódico (Na_2HPO_4) (Merck)

Fosfato ácido de potasio (KH_2PO_4) (Merck)

Glucosa ($C_6H_{12}O_6$) (Merck)

Hidróxido de Bario (Ba (OH)_2) (Merck)
Alcohol etílico ($\text{CH}_3 \text{ CH}_2 \text{ OH}$) (Merck)
Alcohol metílico (CH_3OH) (Merck)
Ácido Clorhídrico (H Cl) (Merck)
Citrato de Sodio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_2\text{O}_7$) (Merck)
Agua desionizada
Papel pH (Merck)

MATERIAL DE LABORATORIO

Frascos ampula de 60 ml. estériles
Tubos de ensaye
Pipetas Pasteur
Vasos de precipitado
Cajas de petri
Vasos de Koplín
Probetas 50 y 100 ml.
Matraces aforados 200 ml, 500 ml y 1000 ml.
Pipetas graduadas 10 ml.
Termómetro
Portaobjetos
Bulbos
Gradilla
Pinzas de disección

Tapones 00 estériles
Jeringas de 5 ml. con aguja
Jeringas de insulina de 1 ml. con aguja
Algodón
Papel filtro
Película fotográfica Technical Pan Kodak
Papel para impresión blanco liso brillante High
Contrast Kodak.

EQUIPO DE LABORATORIO

Incubadora para cultivo de linfocitos (National)
Centrífuga clínica (Solbat)
Baño María (Riossa)
Estufa a 60°C (Napco)
Balanza analítica (Mettler H31 AR)
Microscopio de contraste de fases (Carl Zeiss)
Microscopio óptico con cámara integrada (Carl Zeiss)
Mechero Bunsen

METODO

A cada uno de los pacientes se le extrajeron 5 ml. de sangre con una jeringa que contenía 0.1 ml de heparina.

Para cada caso se hicieron dos tipos de cultivos, los controles y los experimentales a los que se les agregó Mitomicina C durante las últimas 24 horas de incubación, la siembra fue realizada de la siguiente manera:

En un área estéril, se agregaron con jeringa 4.5 ml. de Medio Mc Coy's 5a Modificado a frascos ampola estériles, - 0.25 ml de Fitoheماغلutinina, 2 gotas de antibiótico y 0.5 ml. de sangre completa heparinizada. De cada paciente se sembraron 4 frascos, se taparon y se incubaron durante 72 horas a 37°C. A las 48 horas de incubación a dos frascos de cada caso se les añadió en un medio estéril, Mitomicina C a una concentración final de 40 ng/ml.

Una hora antes de la cosecha a todos los cultivos se les agregó colchicina a una concentración final de 50 $\mu\text{g/ml}$. de cultivo. Posteriormente el contenido de los frascos ampola se vació a tubos de ensaye debidamente etiquetados y se centrifugaron a 56.5 g. durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo se desechó el sobrenadante con pipetas Basteur y al paquete celular se le añadieron 5 ml. de solución hipotónica a 37°C (K Cl 0.075M), se resuspendieron las células y se incubaron a 37°C durante 10 minutos. Después se centrifu

garon bajo las condiciones ya citadas; luego se les quitó el sobrenadante y se agregaron 5 ml. de fijador (metanol: ácido acético 3:1), resuspendiendo y manteniéndolos a temperatura ambiente por otros 10 minutos. Posteriormente se centrifuga ron, de manera que se obtuvo un paquete de células, se dese chó el sobrenadante y se añadió fijador centrifugándose nue vamente. Esto se efectuó en repetidas ocasiones hasta obte ner un sobrenadante transparente.

Más tarde, se hicieron las preparaciones microscópicas, para ello se dejaron caer 4 gotas del contenido de cada tubo en un portaobjetos, se sopló un poco con el objeto de espar cir el material y se secaron a la flama.

Las preparaciones de cada tipo de cultivo se procesaron para obtener bandas G y bandas C.

Las bandas G se hicieron con el fin de identificar con máxima precisión los cromosomas. Para hacer esta técnica, se procedió de la siguiente manera:

Por una parte se colocó un vaso Koplín en el Baño María a 37°C, a este se le agregaron 50 ml de solución amortiguado ra de fosfatos libre de calcio y magnesio (ver apéndice) y - tripsina a una concentración de 0.06% (ver apéndice) ajustan do la solución a pH 7 con bicarbonato de sodio. Por otra - parte, en vasos Koplín, se colocó alcohol etílico al 70% y - al 100%, Wright (ver apéndice), Giemsa (ver apéndice), meta

nal al 10% y agua de la llave. Cada preparación se sometió a la acción de la tripsina por unos segundos, se enjuagó en alcohol al 70% y enseguida en metanol al 100%, se secó la la minilla con aire a presión y se observó al microscopio de - contraste de fase para monitorear el proceso digestivo de la enzima. Cuando los cromosomas aparecían claros e hinchados y con los bordes nítidos se consideraba que ya estaban con - bandas, de lo contrario se seguían sometiendo a la acción de la enzima. Una vez tripsinizados se tiñieron primero con so lución Wright durante 4 minutos y en seguida con el colorante de Giemsa por el mismo tiempo, luego se lavaron con metanol al 10% y finalmente con agua corriente.

Respecto a las bandas C, éstas se hicieron con el propó - sito de conocer si la translocación en cuestión poseía uno o dos bloques de heterocromatina pericentromérica. Para obte ner bandas C se procedió como sigue:

Se limpiaron las laminillas con ácido clorhídrico 0.2 N durante 15-20 minutos, luego se lavaron con agua destilada y en seguida se incubaron a 60-65°C durante 25 minutos. Trans currido este tiempo se les añadió solución de hidróxido de - bario al 5% a 37°C, se colocó un cubreobjetos y se incubaron las laminillas a 37°C durante 3 minutos. Se retiró el cubre obje tos con agua, se secaron, se montaron con solución sali na citrato (ver apéndice) y se colocaron en una cámara húme

da, previamente preparada con la misma solución. Se incubaron a 65°C durante una hora y media, transcurrido este tiempo, se les quitó el cubreobjetos y rápidamente se colocaron en un vaso Koplín que contenía solución salina citrato a 4°C durante 5 minutos, posteriormente se pasaron a etanol al 70% durante 5 minutos y luego a alcohol etílico al 95% por el mismo tiempo, después se secaron al aire para enseguida teñir las con Giemsa por 5 minutos y por último se lavaron con agua de la llave.

De las preparaciones con bandas G de cada paciente se analizaron 200 mitosis de los controles y 200 de los cultivos con Mitomicina C, con el objeto de identificar las rupturas centroméricas en el cromosoma translocado o bien la separación del cromosoma, lo que se consideró como disociación.

También se analizó la frecuencia de aberraciones en otros cromosomas.

Los resultados se analizaron mediante la prueba estadística de χ^2 (30).

RESULTADOS

Los resultados se muestran en los cuadros 1, 2 y 3. En el cuadro 1, se observa que en el primer mosaico (caso 1) el análisis de 200 células reveló 114 células que presentaban la disociación en forma espontánea; este número se incrementó a 156 células con la disociación cuando se añadió Mitomicina C, lo cual representa una diferencia estadísticamente significativa ($X^2=21.9$, g.l.=1, $p < 0.001$).

En el caso 2, que también tenía dos líneas celulares se encontraron 10 células con la translocación separada en ausencia del agente, en tanto que con Mitomicina C 38 células presentaban la disociación. Esto representa un aumento estadísticamente significativo ($X^2=18.4$, g.l.=1, $p < 0.001$).

En los otros cuatro pacientes, sin evidencia de mosaico, el análisis de 800 células en total sin la Mitomicina C, mostró dos células con la translocación disociada, mientras que en los cultivos con MMC en 3 células los acrocéntricos involucrados en el rearreglo estaban separados y en 8 el cromosoma translocado presentaba ruptura a nivel centromérico. Esto representa un 1.3% de rupturas en el mismo sitio.

Las aberraciones encontradas en los cultivos sin MMC fueron rupturas de tipo cromatídico y cromosómico. En los cultivos que contenían el antibiótico, además de estas aberraciones se encontraron figuras radiales y dicéntricos en

CUADRO 1

PROPORCION DE CELULAS CON RUPTURA O DISOCIACION DE LA TRANSLOCACION

CASOS	NO. DE CELULAS CON LA TRANSLOCACION		NO. DE CELULAS CON DISOCIACION		NO. DE CELULAS CON RUPTURA EN LA TRANSLOCACION			
	SIN MMC	CON MMC	SIN MMC	CON MMC	SIN MMC	CON MMC	SIN MMC	CON MMC
1	86	44	114	156	0	0		
2	190	162	10	38	0	0		
3	200	199	0	1	0	2		
4	200	200	0	0	0	3		
5	199	200	1	0	0	3		
6	199	200*	1	2	0	0		

En todos los casos se analizaron 200 células.

*En las 200 células se encontraba la translocación pero en 2 aparecía además uno de los dos acrocéntricos libre y telocéntrico.

CUADRO 2
PORCENTAJE DE ABERRACIONES EN OTROS CROMOSOMAS

CASOS	SIN MMC	CON MMC	χ^2	g.l.	$p <$ de
1	4	16	9	1	0.01
2	7	39	26.2	1	0.001
3	4	22	14.7	1	0.001
4	1.5	17	14.1	1	0.001
5	0.5	20	19.0	1	0.001
6	3	24	18.3	1	0.001

En todos los casos se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre el porcentaje de aberraciones espontáneas vs. aberraciones inducidas por MMC.

χ^2 = Chi cuadrada.

CUADRO 3
PORCENTAJE DE ABERRACIONES EN LA REGION HETEROCROMATICA
DE LOS CROMOSOMAS 1 y 9

CASOS	CROMOSOMA 1		CROMOSOMA 9	
	SIN MMC	CON MMC	SIN MMC	CON MMC
1	0	0	0	1
2	0	0	0	0
3	0	1	0	0
4	0	1	0	1
5	0	1	0	1
6	0	5	0	7

cuando menos un 0.5% para cada caso. En el cuadro 2 se muestra el porcentaje total de aberraciones tomando en cuenta todos los cromosomas, el cual se incrementó significativamente en todos los cultivos expuestos a la MMC. Los puntos de ruptura se distribuyeron preferentemente en los cromosomas de mayor tamaño y en particular en la región heterocromática del cromosoma 1 y en la del cromosoma 9 (cuadro 3).

En cuanto a las bandas "C", esta técnica mostró evidencia de un solo bloque heterocromático a nivel centromérico en todas las translocaciones.

Las figuras 4 y 5 ilustran los hallazgos citogenéticos.

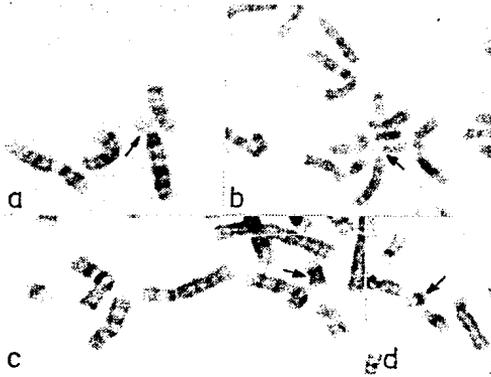


Figura 4.- Se muestran las translocaciones 13q/22q y 21q/21q (a y c) y su disociación (b y d).

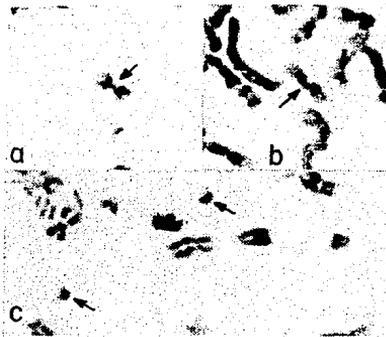


Figura 5.- Se muestra la acción de la MMC sobre las regiones centroméricas de las translocaciones Robertsonianas: a) Ruptura cromatídica; b) Ruptura cromosómica y c) Disociación de la translocación.

DISCUSION

Aunque por lo general las translocaciones Robertsonianas son estables, se ha propuesto la disociación de las mismas para explicar la presencia de mosaicismos en algunos pacientes. El mecanismo de la disociación se desconoce, sin embargo, Pallister (11) sugirió que el punto de unión en el cromosoma translocado fuera frágil y de alguna manera susceptible a sufrir rupturas espontáneas o por acción de agentes externos.

Los resultados de este trabajo mostraron que en los dos casos de mosaicismo celular por disociación espontánea de la translocación, la MMC amplificó significativamente el fenómeno actuando sobre un sitio inestable y susceptible. Por otra parte, en los linfocitos de los 4 pacientes que no tenían un mosaicismo evidente, en dos células se observó separación espontánea de los acrocéntricos lo cual sugiere que el evento no es tan raro, pero que no se identifica ya que en los estudios cromosómicos con fines diagnósticos se analiza un número reducido de células (menos de 25 figuras mitóticas).

En los cultivos expuestos a la Mitomicina C, la distribución de las rupturas fue preferencial para la región centromérica de los cromosomas translocados, la heterocromatina paracentromérica del cromosoma 9 y la del cromosoma 1. Aunque en estudios previos (27, 28, 31) se había demostrado es

te efecto selectivo de la MMC sobre la heterocromatina de los cromosomas 9, 1 y 16, en orden de importancia, y de las regiones centroméricas de los acrocéntricos, no se había investigado su acción sobre la región centromérica de las translocaciones Robertsonianas. Los resultados de este trabajo indican que ésta es otra zona de ruptura preferencial.

Anteriormente se mencionó que es probable que los cromosomas dicéntricos sean estables por la cercanía de los dos centrómeros o bien por la inactivación de uno de ellos. El mecanismo que produce esta inactivación no se conoce, pero se ha postulado que puede ser debido a una pérdida submicroscópica del centrómero (10, 11). Sin embargo, esta hipótesis no es muy aceptada como un mecanismo común en los cromosomas dicéntricos, debido a que es muy baja la probabilidad de que ocurra un gran número de rupturas espontáneas (7). Alternativamente se ha propuesto que tal supresión se debe a que el centrómero se inactiva por medios moleculares. Aunque se desconoce cual es el mecanismo que produce tal inactivación y no se ha detectado ninguna diferencia estructural o molecular entre centrómeros activos e inactivos (7), estudios de centrómeros con la técnica cd (centromeric dots), en dicéntricos, pone de manifiesto diferencias morfológicas entre ambos centrómeros de estos cromosomas. Con esta técnica solo uno de los dos centrómeros es positivo a la tinción, de ello se

ha inferido que el centrómero cd negativo es el inactivo; lo que indica que el cinetocoro se pierde o es alterado de manera que se impide la adhesión a las fibras del huso acromático. Esta alteración en la función del cinetocoro esta correlacionada con una alteración de la constricción primaria, ya que en ausencia de ésta no hay material cd positivo (12). De cualquier forma la inactivación de uno de los centrómeros - permite que el cromosoma sea estable y que se mantenga como miembro constante del complemento cromosómico. Lo anterior hace suponer que el hecho de que la translocación sea monocéntrica o dicéntrica tiene alguna relación con su estabilidad.

A pesar de que la técnica de bandas C no permitió diferenciar los dicéntricos de los monocéntricos ya que en todos los casos se observó un sólo bloque heterocromático, los hallazgos citogenéticos al disociarse la translocación, proporcionaron la información necesaria. Así, en el caso 1, la ruptura y separación originaron células con un cromosoma 21 telocéntrico y pérdida de los brazos largos del otro 21, probablemente por ser un fragmento acéntrico, lo cual indicó que la translocación era monocéntrica, mientras que en el caso 2, la formación de una población celular con dos cromosomas telocéntricos dio evidencia de un rearrreglo dicéntrico. De la misma forma, las translocaciones de los pacientes 3 y 4 fueron dicéntricas, la del caso 6 monocéntrica y quedó la

duda en el paciente 4 en el cual no se observó disociación - del cromosoma translocado.

En realidad, nuestros resultados al igual que los casos de mosaicismo descritos en la literatura no parecen indicar que el ser mono o dicéntrico predisponga al cromosoma translocado a una mayor inestabilidad espontánea o por efecto de la Mitomicina C, pero muestran que es determinante para la - constitución cromosómica de la población celular que se origina por la disociación. Tal es el caso reportado por Vianna-Morgante y Numesmaia (14) en el que la constitución del individuo fue $46,XY,t(15;21)/46,XY,i(21q)$. La fisión del - cromosoma translocado dicéntrico produjo una línea celular - con un cromosoma 15 y un cromosoma 21 inestable, que formó un isocromosoma, por lo que el individuo tenía trisomía de los brazos largos del cromosoma 21 en mosaico, a causa de la disociación. Otro caso interesante es el de Fujimoto et al, (16) cuya paciente tenía trisomía 14 en mosaico por translocación $14;15$, en este caso la disociación de la transloca---ción monocéntrica produce una línea celular normal, perdiéndose los brazos largos del cromosoma 14 por carecer de cen---trómero, debido a este evento el feto que originalmente se---ría abortado por tratarse de una trisomía 14 pura, es viable al producirse la disociación de la translocación.

Los casos descritos en la literatura y los dos observa

dos en este trabajo (cuadro 4) señalan que cuando la translocación es dicéntrica la disociación de la misma puede originar una clona con: a) los dos cromosomas separados y b) un acrocéntrico libre y otro que sufre una división anormal y forma un isocromosoma de brazos largos. Cuando el rearrreglo es monocéntrico, la ruptura produce un acrocéntrico generalmente telocéntrico y pérdida de los brazos largos del otro acrocéntrico.

Más aún, para que se forme un mosaicismo celular debe considerarse la viabilidad de las células, es decir, si la disociación de la translocación resulta en una célula de tal forma desbalanceada que no sea viable, no se establecerá una nueva línea celular. Este fue el razonamiento de Juberg et al (32) para explicar porque un sujeto portador de una translocación balanceada 12/21 tuvo 2 hijos con mosaico de trisomía 21 por translocación 12/21 y células normales. En el padre la disociación y pérdida de los brazos largos del cromosoma 21 hubiera producido células monosómicas 21, no viables mientras que en los hijos este evento originó células normales y en consecuencia el mosaicismo.

En base a estas consideraciones los casos de mosaicimos por disociación de las translocaciones se deben a la conjunción de diversos factores de los cuales el primero es la inestabilidad centromérica del rearrreglo, que de acuerdo a

CUADRO 4

COMPARACIONES DE LOS CASOS DE MOSAICISMO POR DISOCIACION DE UNA TRANSLOCACION

AUTORES	TRANSLOCACION MONO DIC.	+	FORMULA CROMOSOMICA	FENOTIPO	CARIOTIPO DE LOS PADRES
NIEBUHR a)		+	45,XX,t(13;13)/46,XX	NORMAL	?
1972 b)		+	45,XX,t(15;21)/46,XX	NORMAL	?
JACOBS Y COLS 1974		+	45,XY,t(D;D)/46,XY	NORMAL	?
ATKINS Y BART- SOCAS 1974		+	45,XX,t(15;21)/46,XX,t(21;21)	SINDROME DE DOWN	NORMALES
VIANNA-MORGANTE Y NUNESMAIA 1978		+	46,XY,t(15;21)/46,XY,i(21q)	SINDROME DE DOWN	NORMALES
FRYNS Y COLS. 1979		+	46,XX,t(13;13)/46,XX	DATOS CLINICOS DE TRISOMIA 13	NORMALES
JENKINS Y COLS 1981		+	45,XX,t(14;15)/46,XX,i(14q)	MALFORMACIONES MULTIPLES	NORMALES
JUBERG Y COLS 1983		+	46,XY,t(12q;21q)/46,XY	SINDROME DE DOWN	PADRE: 45,XY,t(12q;21q)
FUJIMOTO Y COLS 1985		+	46,XX,t(14;15)/46,XX	MALFORMACIONES MULTIPLES	MADRE: 45,XX,t(14;15)
CASO 1		+	46,XY,t(21;21)/46,XY	DATOS CLINICOS DE SINDROME DE DOWN	NORMALES
CASO 2		+	45,XY,t(13;22)/46,XY	BAJA TALLA E HIPO PLASIA DE PULGAR DERECHO	MADRE: 45,XX,t(13;22)
MONO = MONOCENTRICO					
DIC = DICENTRICO					

los resultados del presente trabajo es un sitio de ruptura - preferencial cuando se exponen los linfocitos a la Mitomicina C. Esto es comparable a lo que ocurre en la heterocromatina de los cromosomas 1, 9 y 16 y podría estar relacionado al hecho de que en estas regiones está localizado el ADN satélite altamente repetitivo lo que podría causar un incremento en la unión del químico (33) en estas regiones, además de que la replicación tardía del ADN en estos sitios provee períodos insuficientes para una síntesis eficiente de reparación del ADN (34).

Finalmente, cabe mencionar que aunque poco frecuentes, la disociación de las translocaciones Robertsonianas y la formación de mosaicismos tiene implicaciones clínicas interesantes: Las manifestaciones fenotípicas de una trisomía pueden atenuarse o agravarse por la presencia de una línea celular diferente y un feto que trisómico sería abortado puede nacer vivo por la presencia de una línea celular normal, aunque multiformado a causa de la línea celular trisómica. Más aún, podría especularse que en aquellos casos de portadores de translocación balanceada fenotípicamente anormales, la disociación del rearrreglo y sus consecuencias explicarían la detención en el crecimiento y las anomalías en la morfogénesis.

APENDICE

- SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS LIBRE DE CALCIO Y MAGNESIO.

Para preparar 1000 ml de esta solución:

8.0 g de cloruro de sodio, 0.3 g de cloruro de potasio, 0.073 g de fosfato ácido de sodio, 0.02 g de fosfato ácido de potasio y 2.0 g de glucosa, aforado a 1000 ml de agua destilada.

- SOLUCION DE TRIPSINA

50 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.03 g de tripsina y 0.01 g de EDTA. Ajustar el pH a 7 con bicarbonato.

- SOLUCION AMORTIGUADORA SORENSEN

Esta solución se prepara con 6.66 g de fosfato ácido de potasio y 2.56 g de fosfato ácido de sodio en 1000 ml de agua destilada.

- SOLUCION MADRE WRIGHT

Se preparó con 0.8 g de colorante Wright en 480 ml de metanol al 100%. Esta solución madre se diluye 1:1 con solución amortiguadora Sørensen.

- SOLUCION SALINA CITRATO

Para preparar 100 ml se colocaron 1.75 g de cloruro de sodio y 0.88 g de citrato de sodio en agua desionizada.

- GIEMSA

Se prepara con 10 ml de colorante al 100% en 40 ml de solución amortiguadora Sörensen.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Kelly, E. (1980). Clinical Genetics and Genetic Counseling. Ed. Year book Medical Publishers. Inc. Chicago 131-136 pp.
- 2.- Egozcue J., y Antich, J. (1972). Genética Médica. Ed. Espaxs. Barcelona. 173-180 pp.
- 3.- Eggen, M.D. (1965). Chromosome diagnostics in clinical medicine. Ed. Charles C. Thomas Publisher. 119-132 pp.
- 4.- Hsu, T.C. y Mead, R.A. (1969). Mechanisms of chromosomal changes in mammalian especiation. Comp. Mam. Cyto genetics. IV. 2.
- 5.- Daniel A., y Lam-Po-Tang PRLC. (1976). Structure and inheritance of some heterozygous Robertsonian translocation in man. J. Med. Genet. 13:381-388.
- 6.- Angel, R., Gianelli, F., y Polani, P. (1970). Three dicentric Y chromosomes. Ann. Hum. Genet. 34:39-50.
- 7.- Merry, D., Pathak, S., Hsu, T., y Brinkley, B. (1985). Anti-Kinctochore antibodies: Use as probes for inactive centromeres. Am. J. Hum. Genet. 37:425-430.
- 8.- Howard, P., y Berry, A. (1986). Familial transmission of a non-Robertsonian translocation dicentric. Clin. Genet. 29:246-250.
- 9.- Therman, E., Trunca, C., Kuhn, E., y Sarto, G. (1986). Dicentric chromosomes and the inactivation of the cen

- tromere. Hum. Genet. 72:191-195.
- 10.- Uehara, N., y Kida, M. (1986). A complex mosaic with -tdic(13;18)(p11;p11),+13p-,+18p-, r(13) etc. in a male infant. II. Increased dissociation of dicentric chromosome by Mitomycin C. Jpn. J. Human Genet. 31:37-43.
 - 11.- Pallister, P., Patau, Inhorn S., y Optiz, J. (1974). A woman with multiple congenital anomalies, mental retardation and mosaicism for an unusual translocation - chromosome t(6;19). Clin. Genet. 5:188-195.
 - 12.- Hutchinson, H., Aleck, K., Davis, J., Veomett, I., y Hauck, L. (1986). Mosaicism for ring and isopseudodicentric chromosome 13. Clin. Genet. 29:88-91.
 - 13.- Maraschio, P., Zuffardi, O., y Lo Curto, F. (1980). Cd bands and centromeric function in dicentric chromosomes. Hum. Genet. 54:266-267.
 - 14.- Vianna-Morgante, A., y Numesmaia, H. (1978). Dissociation as probable origin of mosaic 45,XY,t(15;21)/45,XY,i(21q). J. Med. Genet. 15:305-309.
 - 15.- Niebuhr, E. (1972). Dicentric and monocentric Robertsonian translocation in man. Humangenetik. 16:217-226.
 - 16.- Fujimoto A., Lin MS., Korula SR., y Wilson M.G. (1985). Trisomy 14 mosaicism with t(14;15)(q11;p11) in offspring of a balanced translocation carrier mother. Am. J. Med. Genet. 22:333-342.

- 17.- Jenkins, M., Kriel, R., y Boy, L. (1981). Trisomy 14 mosaicism in a translocation 14q15q carrier: probable dissociation and isochromosome formation. *J. Med. Genet.* 18:68-71.
- 18.- Daniel, A., Ekblom, L., Phillips, S., FitsGerald, J., y Opits, J. (1985). NOR Activity and centromere suppression related in a De Novo fusion t(9;13)(p22;p13) chromosome in a child with del(9p) syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 22:577-584.
- 19.- Fryns, J., Caesar, P., y Van den Berghe, H. (1979). Mosaic 13 trisomy due to de novo 13/13 translocation with subsequent fission Karyotype: 46,XX,-13,+t(13;13)(p11;q11)/46,XX,del(13)(q11). *Hum. Genet.* 46:237-241.
- 20.- Atkins, L., y Bartsocas, C., (1974). Down's syndrome associated with two Robertsonian translocation. 45,XX,-15,-21,+t(15q;21q) and 46,XX,-21,+t(21q;21q). *J. Med. Genet.* 11:306-309.
- 21.- Jacobs, P.A., Melville, M., Ratcliffe, S., Keay, A., y Syme, J. (1974). A cytogenetic survey of 11680 newborn infants. *Ann Hum. Genet.* 37:359-376.
- 22.- Crooke, S. (1979). Mitomycin C: An overview. En: Mitomycin C. Current status a new developments. Carter, S. K. and Crooke, S.T. Editions. Acad. Press, New York. E.U.A. 1-4 pp.

- 23.- Iyer, V. y Szybalski, W. (1963). A molecular mechanism of Mitomycin action: linking of complementary DNA - - strands. Proc. Natl. Acad. Sci. 50:355-362.
- 24.- Lown, JA. (1979). The molecular mechanisms of antitumor action of the mitomycins. En: Mitomycin C. Current status and New developments. IBID 17 Carter, S.K. and Crooke, S.T. Editions. Academic Press, New York. 5-26 pp.
- 25.- Goldstein, A., Aronou, L., y Kalman, S. (1979). Farmacología. Ed. Limusa. México. 4-8 pp.
- 26.- Remers, W.A. (1979). Mitomycin C and analog development En: Mitomycin C. IBID 17 Current status a new developments. Carter, S.K. and Crooke, S.T. Editions. - Academic Press, New York. 27-32 pp.
- 27.- Morad, M., Jonasson, J., y Lindsten, J. (1973). Distribution of Mitomycin C induced breaks on human chromosomes. Hereditas. 74:273-282.
- 28.- Bourgeois, C.A. (1974). Distribution of Mitomycin C induced damage in human chromosomes with special reference to regions of repetitive DNA. Chromosoma. 48:203-211.
- 29.- Gupta, P. y Sharma, T. (1980). Preferential effect of Mitomycin C on constitutive heterocromatin of the Indian Muntjac, Mutiacus muntiac Mutation Res. 72:335---

339 pp.

- 30.- Siegel, S. (1985). Estadística no paramétrica. Ed. Trillas. México, D.F. 343 p.
- 31.- Simi, S. (1985). Mitomycin C induced mosaicism in C - band regions of human chromosomes 1, 9, 16 and Y. Hum. Genet. 70:243-245.
- 32.- Juberg, R.C., Stallard, R., Morwrey, P., y Valid, C. - (1983). Dissociation of a t(12-21) resulting in a normal cell line in two trisomic 21 sons of a non mosaic t(12-21)father. Hum. Genet. 64:216-221.
- 33.- Schmid, M., Vogel, W., y Krone, W. (1975). Attraction - between centric heterochromatin of human chromosomes. Cytogenet. Cell. Genet. 15:66-80.
- 34.- Savage, J., y Cao, S. (1985). Some observations on the localizations of Mitomycin C-induced aberrations in - human lymphocytes. Mutation Res. 150:307-312.