



3 2ej.
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA

SECRETARIA DE SALUD

ACCION DE LAS RADIACIONES
GAMMA SOBRE LAS TRANSLOCACIONES
ROBERTSONIANAS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
ESPECIALISTA EN GENETICA MEDICA
P R E S E N T A
GABRIELA ORTIZ DE ZARATE ALARCON

TESIS CON
FALLA DE CALIFICACION

México, D. F. 1980



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

INTRODUCCION :

Las translocaciones Robertsonianas son rearrreglos cromosómicos que se producen por la fusión de dos cromosomas acrocéntricos. Esta fusión centromérica involucra la heterocromatina pericentromérica (1).

Las translocaciones Robertsonianas son relativamente frecuentes y se observan aproximadamente en 1/1000 recién nacidos (2). Se sabe que en la mayoría de los casos son dicéntricas, lo cual significa que ambos cromosomas involucrados en la fusión conservan su centrómero (3). Por otra parte, son estables, ya que se transmiten de generación en generación, aunque se han podido observar casos en los que existe disociación de la translocación y formación de un mosaico (4,5,6,7,8,9,10,11,12). Esto se puede deber a que el punto de fusión de los cromosomas involucrados en la translocación sea estructuralmente frágil (9).

En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio, se estudió el efecto de la Mitomicina C (MMC), un reconocido agente clastogénico, sobre las translocaciones Robertsonianas. De los 6 pacientes estudiados dos presentaban mosaicismo por disociación de la translocación. En dicho estudio se demostró que en los dos casos de mosaicismo la MMC amplificó el fenómeno de disociación y en los otros, la distribución de las rupturas producidas por este agente clastogénico fue preferencial para la región centromérica de los cromosomas translocados y

para la heterocromatina de los cromosomas 1 y 9, por lo cual se concluyó que el punto de fusión de las translocaciones Robertsonianas es susceptible a la acción de este agente (13).

Por otra parte, es bien conocido que cuando las células son sometidas a dosis de 2 Gy durante la fase G₁ del ciclo celular, se producen aberraciones cromosómicas y a la vez se permite la supervivencia de un buen número de células para su análisis (12,15). Dichas aberraciones se producen tanto por el efecto directo de las radiaciones, como por el efecto indirecto de los radicales OH formados durante la radiación (16).

Teniendo en cuenta los antecedentes ya mencionados, el objetivo del presente trabajo fué estudiar la acción de los rayos gamma sobre el punto de fusión de las translocaciones Robertsonianas con la siguiente hipótesis: Si el punto de fusión de las translocaciones Robertsonianas es de alguna manera susceptible a éste agente, entonces se observará ruptura o disociación a nivel centromérico en dichas translocaciones con mayor frecuencia que en las otras regiones del complemento cromosómico.

MATERIAL Y METODOS :

Se estudiaron 6 pacientes de la consulta externa del servicio de Genética del INP, en los cuales se había establecido por estudio citogenético previo la presencia de una translocación Robertsoniana. Su constitución cromosómica fue la siguiente :

- 1.- 46,XY,rob(21q21q)/46,XY,del(21)(p11)
- 2.- 46,XX,rob(14q21q)
- 3.- 45,XX,rob(14q21q)
- 4.- 46,XX,rob(14q21q)
- 5.- 46,XY,rob(21q21q)
- 6.- 46,XY,rob(14q21q)

Como se puede observar, el caso 1 corresponde a un mosaico celular con una población trisómica 21 por translocación 21;21 y otra aparentemente normal, aunque un cromosoma 21 se observaba telocéntrico.

De cada paciente se obtuvieron 5 ml. de sangre periférica en jeringa previamente heparinizada. Se sembraron 6 cultivos - por cada paciente, conforme a la técnica modificada de Moorhead (17); se colocaron en cada frasco de cultivo 0.5 ml de sangre total, 4.5 ml de medio de cultivo McCoy 5A modificado, 0.25 ml de fitohemaglutinina, 0.02 ml de antimicrobiano (penicilina - estreptomycin) y se incubaron a 37^o C durante 48 hrs. La mitad de los cultivos se sometieron a una dosis de 2 Gy de radiación gamma, en un aparato Theraton 765 Co 60, a las 16 hrs. de incubación, momento en el cual se calculó que la mayoría de las células se encontraban en fase G₁ del ciclo celular (18,19).

Los tres cultivos restantes de cada paciente sirvieron de control. Después de la exposición a la radiación, los cultivos continuaron su incubación hasta completar las 48 hrs. . La cosecha se realizó con la técnica de bandas G con tripsina. Se codificaron las laminillas con el fin de que el análisis se hiciera en forma ciega. En todos los casos se analizaron 200 metafases de los cultivos expuestos y 200 de los cultivos control. Se cuantificaron las rupturas o bien la disociación completa a nivel del punto de unión en las translocaciones Robertsonianas y las aberraciones en otros cromosomas. Se compararon los hallazgos de los cultivos controles con los obtenidos en los cultivos expuestos a las radiaciones gamma.

En 50 de las mitosis analizadas en cada caso (con excepción del caso 1), se identificó la localización en región centromérica, en brazo largo o corto, de los puntos de ruptura en cada cromosoma. En esas 50 mitosis se compararon las rupturas o disociaciones centroméricas de los cromosomas translocados, con las rupturas en las regiones centroméricas de los otros cromosomas . El análisis estadístico se realizó por medio de las pruebas de χ^2 y t pareada.

RESULTADOS :

Se analizó un total de 2,400 mitosis de las cuales 1,200 correspondieron a los cultivos no radiados y 1,200 a los cultivos radiados. La frecuencia de aberraciones cromosómicas en los cultivos no expuestos fué de 0.12 mientras que en los cultivos expuestos fué de 3.1 por célula, esta diferencia fue estadísticamente significativa al aplicar la prueba de t pareada con una $p < 0.001$. Con esto se demostró que las radiaciones a una dosis de 2 Gy tuvieron un efecto clastogénico (tabla 1).

En cuanto a la acción de las radiaciones sobre el punto de fusión de las translocaciones Robertsonianas, en la tabla 2, se puede observar que en el caso 1, que corresponde al no saico por disociación, de 200 células analizadas en los cultivos no radiados, 148 células presentaban la disociación de la translocación de la translocación; mientras que en los cultivos radiados, de 200 células analizadas, 166 mostraban la disociación. La diferencia fué estadísticamente significativa a un nivel de alfa de 0.05, al aplicar la prueba de χ^2 con corrección de Yates. En relación al resto de los casos, al analizar 1000 células no radiadas, se observó una célula con disociación espontánea de la translocación y una con ruptura cromatídica a nivel centromérico, mientras que en 1000 células radiadas se encontraron 8 células con disociación inducida de la translocación y 10 células con ruptura cromatídica a nivel centromérico. La diferencia fue estadísticamente significativa con una $p < 0.005$ ($\chi^2 = 12.92$ a 1 gl).

En las 50 mitosis seleccionadas al azar en cada uno de los 5 casos que no presentaban mosaicismo, se determinó si los sitios de ruptura se encontraban en la región centromérica o en euromatina, de cada cromosoma. Se graficó el número total de rupturas en cada cromosoma, separando las dos regiones como aparece en la figura 1 y se calculó el valor esperado de rupturas dependiendo de la longitud relativa de cada cromosoma (29). A pesar de que los cromosomas 1, 5, 8, 11, 12 y 16 mostraron un valor observado mayor al esperado y los cromosomas 2, 13, 14, 18, X y Y tuvieron menos rupturas de lo esperado, al aplicar la prueba de X^2 , la diferencia no fué significativa.

Por otra parte, la gráfica muestra que a pesar de que todos los cromosomas presentaron rupturas centroméricas, en el cromosoma translocado se observaron 7 de un total de 16 rupturas y esto no ocurrió en ninguno de los demás cromosomas, independientemente de su tamaño. La figura 3 ilustra algunos ejemplos en los cuales los cromosomas disociados formaron reemplagos con otros cromosomas.

TABLA 1

FRECUENCIA DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS
ESPONTANEAS E INDUCIDAS POR
RADIACION GAMMA

CASO	ABERRACIONES ESPONTANEAS POR CELULA	ABERRACIONES INDUCIDAS POR CELULA
1	0.09	2.9
2	0.13	3.5
3	0.11	3.1
4	0.16	3.5
5	0.15	2.8
6	0.08	3.0
TOTAL	0.12	3.1

tp= 12.34 p < 0.001

TABLA 2

FRECUENCIA DE LA DISOCIACION DE LA TRANSLOCACION EN CELULAS
RADIADAS Y NO RADIADAS

CASO	CELULAS NO RADIADAS			CELULAS RADIADAS		
	ANALIZADAS	CON DISOCIAC. ESPONTANEA	FRACTURAS	ANALIZADAS	CON DISOCIAC. INDUCIDA	FRACTURAS
*1	200	148	0	200	166	0
- 2	200	1	0	200	1	4
3	200	0	0	200	0	2
** 4	200	0	0	200	4	1
5	200	0	0	200	1	0
- 6	200	0	1	200	2	3

* $\chi^2 = 4.2$ $p < 0.05$

** $\chi^2 = 12.92$ $p < 0.005$

DISCUSION :

El efecto clastogénico de las radiaciones fué evidente al observar en los cultivos radiados una elevación significativa de la frecuencia de aberraciones cromosómicas, entre las que predominaron los rearrreglos del tipo de los anillos, dicéntricos y translocaciones.

Como ya se ha mencionado, las translocaciones Robertsonianas se consideran rearrreglos cromosómicos estables, sin embargo existen casos de mosaicismos en los cuales se encuentran dos líneas celulares diferentes, una con la translocación y otra en la que los cromosomas translocados se ha separado. Estos pacientes presentaban translocaciones Robertsonianas (4,5, 6,7,8,9,10) o bien translocaciones entre un acrocéntrico y otro cromosoma con puntos de fusión en la heterocromatina pericentromérica (11,12). Únicamente el paciente descrito por Pallister (9), presentaba una translocación dicéntrica entre un cromosoma 6 y un 19 con punto de unión inestable localizado en ambas cromosomas en la región telomérica que también se ha considerado heterocromatina. Los mecanismos por los cuales ocurre esta disociación espontánea se desconoce, pero se ha propuesto que el punto de la translocación sea estructuralmente frágil.

Los resultados del presente trabajo mostraron que en el caso que presentaba mosaicismo espontáneo, el número de células con la disociación se incrementó en los cultivos expuestos a los rayos gamma en forma significativa ($p < 0.005$). Dicho comporta-

--miento fué similar al observado en los linfocitos de 2 casos con mosaicismo cuyo cariotipo fué 46,XY,rob(21q21q)/46,XY,del(21)(p11) y 45,XY,rob(13q22q)/46,XY,del(13)(p11), en los cuales el incremento de la disociación en los cultivos expuestos a la MMC fué significativo con $p < 0.001$ (11). Así mismo coincide con los hallazgos de Uehara (11) al someter a la MMC los linfocitos del paciente con translocación dicéntrica (13;18) y mosaicismo por disociación. Estas observaciones revelan que ambos agentes clastogénicos amplifican el fenómeno de la disociación espontánea.

Por otra parte, en los casos no mosaico se observó disociación espontánea en una ocasión al analizar 1000 células no radiadas. Esto también se encontró en los cultivos no expuestos a la MMC en el trabajo anterior, en donde se observaron dos disociaciones en 800 células; lo que significa que este evento es relativamente frecuente, pero que no se observa en los estudios de diagnóstico porque el número de células analizadas por lo general es de 25 mitosis por caso. En estos mismos pacientes en los cultivos expuestos a la radiación, se encontraron 8 células con disociación de la translocación y 10 con ruptura cromatídica, lo que suma un total de 18 rupturas en el punto de fusión. Este elevado número de lesiones en un punto específico sugiere que se trate de un sitio especialmente susceptible a la radiación gamma.

Para que esta observación fuera más objetiva se analizaron 50 mitosis de cada caso en las que se identificó la locali-

zación de las rupturas en heterocromatina pericentromérica o en eucromatina en todos los cromosomas. Este análisis mostró que si bien el número total de rupturas por cromosoma no difirió de lo esperado de acuerdo a la longitud relativa de cada cromosoma, las rupturas centroméricas en el cromosoma translocado contribuyeron a casi el 50% del total, hecho que no se observó en otros cromosomas.

Los resultados son similares a los obtenidos al exponer las células de niños con translocaciones Robertsonianas a la MMC, en donde se observó un efecto preferencial de dicho agente sobre la heterocromatina pericentromérica de los cromosomas 1,9 y el cromosoma translocado (13).

Por otra parte, en el laboratorio recientemente se expusieron a la MMC los cultivos de 6 pacientes portadores de translocaciones recíprocas en las cuales los puntos de fusión se encontraban localizados en regiones eucromáticas y no se observó un efecto preferencial del agente clastogénico sobre dichos puntos (21).

Los resultados conjuntos de estos trabajos demuestran que la exposición a radiaciones gamma y a la MMC revelan la alta susceptibilidad de el punto de fusión de las translocaciones Robertsonianas a agentes clastogénicos y apoyan la hipótesis de que esta susceptibilidad se relaciona con la presencia de heterocromatina en el punto de unión.

Es posible que este fenómeno se deba, como ya se ha mencionado, al de que estas regiones contienen ADN repetitivo, rico en bases A-T, por una parte susceptible a ser dañado por la MMC o

--los radicales OH, que se liberan durante la radiación y por otra con una gran capacidad de cicatrización que produce cromosomas disociados estables (22,23,16,13).

Por lo tanto se postula que uno de los factores que predisponen a la disociación de las translocaciones Robertsonianas y a la formación de los neocismos observados en pacientes, es la inestabilidad del punto de fusión que se encuentra en una región heterocromática.

BIBLIOGRAFIA :

- 1.- Daniel A., Lamp-Po-Tang PRLC : Structure and inheritance of some heterozygous Robertsonian translocations in man. *J. Med. Genet.*, 13:381-388, 1976.
- 2.- Hook E.B., Hamerton JL : The frequency of chromosome abnormalities detected in consecutive newborn studies. Differences between studies. In *Populations cytogenetics*. Eds: Hook E.B., Porter I.A., New York, Academic Press Inc. p. 63, 1977.
- 3.- Niebuhr E., : Dicentric and monocentric Robertsonian Translocations in man. *Humangenetik* , 16:217-226, 1972 .
- 4.- Jacobs P.A., Melville M., Ratcliffe S., Keay A.J., Syme J.: A cytogenetic survey of 11680 newborn infants. *Ann. Hum. Genet.*, 37:359-376, 1974.
- 5.- Atkins L., Bartsocas C.S.: Down's syndrome associated with two Robertsonian 45,XX,-15,-21,+t(15q;21q) and 46,XX,21,+t(21q;21q). *J. Med. Genet.* , 11:305-309, 1974.
- 6.- Vianna-Morgante A.M., Nunesmaia H.G. : Dissociation as probable origin of mosaic 45,XY,t(15;21)/45,XY,i(21q). *J. Med. Genet.* , 15:305-309, 1978.

- 7.- Fryns J.P., Caesar P., Van den Berghe H. : Mosaic 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, 1979.
- 8.- Jenkins M.B., Kriel R., Boyd L. : Trisomy 14 mosaicism in a translocation 14q15q carrier: probable dissociation and isochromosome formation.
J.Med.Genet, 18:68-71, 1981.
- 9.- Pallister P.D., Patau K., Inhorn S.L., Opitz J.M. : A woman with multiple congenital anomalies, mental retardation and mosaicism for an unusual translocation chromosome t(6;19).
Clin. Genet., 5:188-195, 1974.
- 10.- Fujimoto A., Lin H.S., Korula S.R., Wilson M.G. : Trisomy 14 mosaicism with t(14;15)(q11;p11) in offspring of a balanced translocation carrier mother.
Am.J.Med.Genet, 22:333-342, 1985.
- 11.- Uehara H., Kida H. : A complex mosaic with t dic (13,18) (p11;p11), +13p⁻, +18p⁻, r(13) etc in a male infant. Increased dissociation of dicentric chromosome by mitomycin C
Jpn.J.Human Genet, 31:37-43, 1986.
- 12.- Juberg R.C., Stallard R., Morwrey P., Valido C.L. : Dissociation of a t(12;21) resulting in a normal cell line in two trisomic 21 sons of a mosaic t(12;21) father ?
Hum. Genet. 64:216-221, 1983.

- 13.- Frias S., Carnevale A., Zavaleta M.J., Molina B. : Mitomycin C effect on Robertsonian translocations.
Ann. Genet., 31:162-166, 1988.
- 14.- Cadirola S., Dutrillaux B., : Study of chromosome lesions induced by rays during the G₂ and mitotic phases of the cell cycle.
Ann. Genet., 27:154-157, 1984.
- 15.- Dutrillaux B., Viegas-Pequignot E., Prod'homme M., Sportes: Distribution of the various radiation induced chromosomal rearrangements in relation to the dose and sampling time.
Mutat. Res., 152:197-205, 1985.
- 16.- Schnelter R.F. : Nuclear medicine and environment radiation interactions.
Sem. Nucl. Med., 16:87-105, 1986.
- 17.- Moorhead T.S., Nowell P.D., Melman W.J., Battip D.H., - Hungerford D.A., : Chromosome preparation of leucocytes culture from human peripheral blood.
Exp. Cell Res., 20:630, 1960.
- 18.- Malkinson F.D. : Some principles of radiobiology. A selective review.
J. Inv. Derm., 76:32-38, 1981.
- 19.- Pantellas G.E. : Radiation induced cytogenetic damage - in relation to changes in interphase chromosome conformation.
Radiat. Res., 105:341-350, 1986.

- 20.- Paris Conference : Standarization in human cytogenetics.
Birth Defects:Original Articles Series,VIII:7The National
Foundation ,New York. 1971.
- 21.- Molina B., Frias S., Carnevale A. : Acción de la mitomicina
C sobre los puntos de fusión de translocaciones recíprocas
En prensa .
- 22.- Bourgeois C.a. : Distribution of mitomycin C induced damage
in human chromosomes with special reference to regions
of repetitive DNA.
Chromosoma,48:203-211,1974.
- 23.- Simi S. : Mitomycin C-induced mosaicism in C-band regions
of human chromosomes 1,9,16 and Y.
Hum. Genet.,70:243-245,1985.

FIGURA No.1
**DISTRIBUCION DE ABERRACIONES INDUCIDAS POR RADIACION
 GAMMA EN 50 CELULAS ANALIZADAS POR CADA CASO**

