

11220
1
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Medicina

División de Estudios de Posgrado e Investigación

DETECCION DE HETEROCIGOTOS DE ATAXIA
TELANGIECTASIA BASADO EN SU
SENSIBILIDAD A LA RADIACION IONIZANTE

TESIS PARA OBTENER EL TITULO DE ESPECIALISTA EN

Inmunologia Clinica y Alergia

PRESENTA:

J. RAFAEL ARGUELLO ASTORGA

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1993



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.

T I T U L O

DETECCION DE HETEROCIGOTOS DE

ATAXIA TELANGIECTASIA BASADO

EN

SU SENSIBILIDAD A LA RADIACION

IONIZANTE

INDICE

INTRODUCCION.....	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	8
HIPOTESIS.....	9
OBJETIVOS.....	10
MATERIAL Y METODO.....	11
ANALISIS ESTADISTICO.....	22
RESULTADOS.....	22
DISCUSION.....	28
CONCLUSIONES.....	33
TABLAS.....	34
BIBLIOGRAFIA.....	38

INTRODUCCION

La ataxia telangiectasia (AT) es una enfermedad hereditaria autosómica recesiva, caracterizada por degeneración neurológica progresiva, telangiectasias oculocutáneas, hipoplasia tímica, grados variables de inmunodeficiencia celular y humoral, niveles elevados en suero de alfa fetoproteína, sensibilidad incrementada a la radiación ionizante y una alta incidencia de cáncer. [1]

Se han descrito hasta la fecha cinco variedades genéticas de AT. Estas variedades reciben el nombre de Grupos de Complementación y su distribución es la siguiente: Grupo A 55%, Grupo C 28%, Grupo D 14%, Grupo E 3% y Grupo Vi menos del 1%. Los primeros cuatro Grupos son clínicamente indistinguibles y el último se caracteriza por presentar microcefalia y retraso mental. [2]

La identificación de estos cinco Grupos se basa en lo siguiente: la sensibilidad que tiene un individuo a la radiación puede ser medida cuantificando el daño cromosómico inducido por ésta en sus células cultivadas; se sabe que las células de individuos con AT son hipersensibles a la radiación, entonces si se fusionan fibroblastos de dos pacientes con esta enfermedad y las células resultantes presentan una sensibilidad normal a la radiación, significa

que pertenecen al mismo Grupo, es decir que entre las células fusionadas existió "complementación" de tal forma que el defecto genético no se evidenció, de ahí el nombre de Grupos de Complementación, por el contrario, si las células resultantes persisten con la hipersensibilidad a la radiación, significa que pertenecen al mismo Grupo y por lo tanto comparten el mismo defecto genético. Aplicando este concepto a la clínica, tenemos que los individuos que presentan la enfermedad necesariamente tuvieron progenitores heterocigotos del mismo Grupo de Complementación.

Las investigaciones más recientes sugieren fuertemente que el gen de AT de los distintos Grupos de Complementación se encuentra en los brazos largos del cromosoma 11, específicamente en la región q22-23. [3] Sin embargo, hasta la fecha no se ha logrado determinar el defecto genético causante de la enfermedad; se ha sugerido la falta o el defecto en alguna o algunas enzimas involucradas en la reparación o procesamiento del DNA, como son las polimerasas, girasas, recombinasas y topoisomerasas, [4 y 5] sin embargo esto sólo explicaría una parte de las características del comportamiento de esta enfermedad, es por eso que formular una hipótesis que explique la fisiopatología total de ella ha representado para la comunidad científica todo un desafío intelectual.

Los estudios de la frecuencia e incidencia de AT reportan datos muy variados, algunos informan incidencias máximas de 1 en 40000 niños en edad escolar y otros tan bajas como 7 casos

en una población de 5,198,000 habitantes. [46] En Estados Unidos de Norteamérica se ha estimado una frecuencia de 0.003% al 0.006%. [7]

Con estos valores y teniendo en cuenta los cinco Grupos de Complementación, se ha estimado que la frecuencia de heterocigotos de AT puede ser de hasta un 5% de la población total. [3]

CARACTERISTICAS DE LOS HETEROCIGOTOS

Los heterocigotos de AT son asintomáticos, sin embargo también presentan hipersensibilidad a la radiación ionizante, la cual es intermedia entre homocigotos de la enfermedad y sujetos normales, [19 y 35] además muestran una gran susceptibilidad a desarrollar cáncer, particularmente cáncer de mama en las mujeres. Se dice que una de cada cinco mujeres con cáncer de mama son heterocigotos de AT. [3]

Se ha calculado que para inducir cáncer de mama con rayos X en la población general se requieren dosis arriba de 200 a 400 mGy, mientras que en heterocigotos dosis menores de 20 mGy pueden inducir este cáncer. [6,8,14 y 15]

Para los heterocigotos de AT se ha estimado que el riesgo de desarrollar cualquier tipo de cáncer es de 2 a 6 veces mayor que el de la población general, y de 3 y 2.6 veces mayor en hombres y mujeres, respectivamente, para morir de cualquier causa entre los 20 y 59 años de edad. [8]

Por otra parte se han asociado otras cinco enfermedades a la región cromosómica en donde está el gen de AT (11q22-23), tales enfermedades son el alcoholismo, la esquizofrenia, el cáncer de mama, la dicinesia tardía y las enfermedades autoinmunes relacionadas con el HLA. [9] Algunas de estas enfermedades comparten otras características con AT como es el hecho de que un porcentaje alto de los pacientes con alguna de estas enfermedades cursan con lateralidad cerebral

(zurdos), así como un incremento en la población de linfocitos T que expresan TCR gamma/delta. [9]

No se conoce, a excepción del cáncer de mama, si estas enfermedades sean significativamente más frecuentes en heterocigotos de AT. El principal problema que se tiene para poder establecer una asociación entre estos pacientes y aquellas enfermedades estriba en que no se cuenta hasta el momento con una prueba de laboratorio confiable, capaz de poder establecer la condición de heterocigoto de AT. La única población que se conoce de heterocigotos de AT, y que por lo tanto es susceptible de estudiar, son los individuos que han engendrado por lo menos un hijo con la enfermedad, los cuales representan menos de 1% del total de heterocigotos. Por otra parte no existen estudios respecto a las enfermedades más frecuentes en ellos durante la infancia, se desconoce si una proporción grande de ellos muera de algún tipo de cáncer frecuente en infantes y por lo tanto la población de heterocigotos adultos sea muy pequeña y esto explique la tasa de incidencia tan baja que se tiene de la enfermedad comparada con la incidencia relativamente alta de heterocigotos.

En base a la necesidad de poder estudiar y tomar ciertas medidas preventivas con la población de heterocigotos de AT, se han sugerido algunas pruebas de laboratorio para detectarlos.

Pawlak A. y colaboradores han demostrado que los linfocitos de heterocigotos son significativamente más sensibles al tratamiento con cafeína in vitro en términos de inducir un mayor número de rompimientos cromosómicos comparado con linfocitos de sujetos normales, por lo que sugieren que esta característica de comportamiento debe ser aprovechada para el diagnóstico de estos pacientes. Se desconoce la relevancia que este hecho in vivo, pero se puede suponer que los heterocigotos de AT que consumen grandes cantidades de cafeína tienen mayor riesgo de presentar daño cromosómico y por ende mayor susceptibilidad a desarrollar cáncer. [42]

Se ha demostrado también que los homo y heterocigotos de esta enfermedad tienen una mayor frecuencia de rompimientos cromosómicos espontáneos in vivo en las células del epitelio de la cavidad bucal, y se ha intentado aprovechar este aspecto con fines de diagnóstico, sin embargo no todos los heterocigotos presentan esta característica, por lo que hace a esta prueba poco sensible para tal propósito. [14]

Nosotros consideramos que la hipersensibilidad a la radiación ionizante que caracteriza a los homocigotos y a los heterocigotos de AT, y que puede ser cuantificada in vitro midiendo el número de alteraciones estructurales cromosómicas inducidas por ella, puede servir para establecer dichos diagnóstico, además, en homocigotos de AT se ha descrito que dichas alteraciones estructurales se presentan de manera espontánea o inducidas por radiación en forma relativamente

constante en los cromosomas 7 y 14, esto mismo creemos puede ocurrir en heterocigotos, de tal forma que aprovechando esta característica podemos crear una prueba de laboratorio que tenga un alto grado de especificidad y sensibilidad.

El presente estudio pretendió demostrar lo anterior.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿ Existirán diferencias significativas en el número de alteraciones estructurales cromosómicas inducidas por una misma dosis de rayos X en linfocitos cultivados de pacientes con ataxia telangiectasia, heterocigotos de esta enfermedad y normales ?

¿ Las regiones de los cromosomas afectados por la radiación tenderán a ser las mismas en el grupo de pacientes con ataxia telangiectasia y en el grupo de heterocigotos de la enfermedad ?

HIPOTESIS

Consideramos que el número de alteraciones estructurales cromosómicas inducidas por una determinada dosis de rayos X en linfocitos cultivados de pacientes con ataxia telangiectasia será significativamente mayor que en los sujetos normales.

Los heterocigotos de AT tendrán una cantidad intermedia entre los sujetos homocigotos de la enfermedad y los normales.

Los cromosomas afectados por la radiación tenderán a ser los mismos en los homocigotos y en los heterocigotos de AT, no siendo así en los sujetos normales.

OBJETIVO GENERAL

Investigar si existen diferencias significativas en el número de alteraciones estructurales cromosómicas inducidas por una misma dosis de rayos X en linfocitos cultivados de sujetos homocigotos y heterocigotos de ataxia telangiectasia, y en normales.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Determinar la dosis de rayos X que induzca una cantidad de rompimientos cromosómicos en cultivo de linfocitos de sujetos normales que no exceda de 20 en 25 metafases, ni sea menor del triple de los encontrados en cultivos de linfocitos sin radiar.

Investigar si las alteraciones estructurales cromosómicas inducidas por una misma dosis de rayos X tienen un patrón de distribución constante en los cromosomas tanto en los pacientes homocigotos como en los heterocigotos de ataxia telangiectasia.

MATERIAL Y METODO

Es un estudio experimental, de casos y controles.

Para su realización lo dividimos en dos partes:

PRIMERA PARTE

En la primera parte de este estudio se determinó cuál era la mayor dosis de rayos X que inducía, en linfocitos cultivados de sujetos normales, un número razonable de rompimientos cromosómicos, entendiéndose por esto no más de 20 en 25 metafases y no menos del triple de los encontrados en cultivos de linfocitos sin radiar.

Para establecer lo anterior se cultivaron linfocitos de individuos con los siguientes criterios de inclusión:

- + Clínicamente sanos.
- + Menores de 50 años de edad.
- + De cualquier sexo.
- + Sin antecedentes familiares de enfermedades hereditarias que cursen con alteraciones en el cariotipo.
- + Sin antecedentes familiares de ataxia telangiectasia u otras enfermedades que cursen con inestabilidad cromosómica.
- + Pacientes diestros sin antecedentes familiares de lateralidad cerebral.
- + Sin antecedentes personales ni familiares de cáncer.
- + Que no hayan recibido drogas citotóxicas por lo menos

6 meses antes del estudio.

**+ Que no hayan estado expuestos a radiación ionizante
por lo menos 6 meses antes del estudio.**

PROCEDIMIENTO DEL CULTIVO DE LINFOCITOS

SIEMBRA:

En condiciones de esterilidad se extrajo del sujeto de 5 a 10 ml de sangre periférica con una jeringa heparinizada (0.1 ml de heparina a concentración de 1000 U/ml).

Se colocó en un tupo de plástico estéril de 15 ml para centrifuga lo siguiente:

- + 4.5 ml de medio de cultivo McCoy.
- + 0.5 ml de suero fetal de ternera al 5%.
- + 0.3 ml de fitohemaglutinina.
- + 1.0 ml de sangre periférica.
- + 100 U de penicilina G sódica cristalina.
- + 20 mg de estreptomycinina.
- + Se incubó a 37 grados centígrados durante 4 ciclos celulares (48 horas).

COSECHA:

- + Se agregó al tubo 0.2 ml de colchicina.
- + Se incubó durante 15 minutos a 37 grados centígrados.
- + Se agitó y centrifugó 10 minutos a 1200 rpm.
- + Se eliminó el sobrenadante.
- + Se agregó 5 ml de solución hipotónica e incubó durante 15 minutos a 37 grados centígrados.
- + Se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos.
- + Se eliminó el sobrenadante.
- + Se agregó 5 ml de solución fijadora fría poco a poco y se agitó en el vortex.
- + Se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos.
- + Se desechó el sobrenadante.
- + Se repitieron los tres últimos pasos cinco veces.
- + Se diluyó el botón celular con solución fijadora hasta obtener una solución turbia.
- + Se elaboraron las laminillas utilizando portaobjetos limpios, fríos y secos.
- + Las laminillas se tiñeron con colorante de Giemsa al 6% en una solución amortiguadora de fosfatos al 0.06 M.
- + Finalmente se observaron al microscopio de luz.

RADIACION DE LOS CULTIVOS

Los cultivos fueron radiados en la fase G2 del último ciclo celular. Se utilizó un aparato de rayos X clínico, marca Siemens, modelo Tridors 512 MP, de KW, y con capacidad de 125 KV y 500 mAs.

Se utilizó una dosis determinada de rayos X en 5 cultivos de pacientes distintos. Por cada paciente se dejó un cultivo control al cual no se le sometió a radiación. En cada dosis de radiación se especificó el kilovoltaje y miliamperaje utilizado, así como la distancia a la cual se dio la radiación. El rango de dosis de radiación con la que se experimentó varió desde la que no provocó rompimientos cromosómicos hasta aquella que indujo la destrucción total de los cromosomas.

VALORACION DE LOS CARIOTIPOS

CULTIVOS NO RADIADOS:

De cada cultivo se determinó el número de rompimientos cromosómicos encontrados en 25 metafases seleccionadas al azar. Se promediaron las cantidades encontrados en todos los pacientes que se reclutaron en el estudio.

CULTIVOS RADIADOS:

De cada cultivo se determinó el número de rompimientos cromosómicos encontrados en 25 metafases seleccionadas al azar. Se promediaron las cantidades encontradas en los 5 cultivos en los cuales se utilizó una determinada dosis de radiación.

El promedio de rompimientos cromosómicos inducidos por cada dosis de radiación fueron comparados con el promedio obtenido en los cultivos control y se seleccionó la dosis que mejor cumplía los requisitos exigidos como objetivo de esta primera parte.

SEGUNDA PARTE

Se formaron tres grupos de pacientes, el primero con sujetos con ataxia telangiectasia, el segundo con heterocigotos obligados de esta enfermedad y el tercero con sujetos normales. Cada grupo con los siguientes criterios de inclusión:

GRUPO I

- + Pacientes con diagnóstico de ataxia telangiectasia demostrado por cuadro clínico y exámenes de laboratorio.
- + De cualquier edad.
- + De cualquier sexo.
- + De cualquier Grupo de Complementación.
- + Que no hubieran recibido drogas citotóxicas o que interfirieran en el procesamiento de los ácidos nucleicos, por lo menos 6 meses antes del estudio.
- + Que no hubieran estado expuestos a radiación por lo menos 6 meses antes del estudio.
- + Sin evidencia de proceso infeccioso o neoplásico en el momento del estudio.

GRUPO II

- + Pacientes heterocigotos obligados de ataxia telangiectasia (que hubieran tenido por lo menos un hijo con la enfermedad).
- + De cualquier edad.
- + De cualquier sexo.

- + Heterocigotos de cualquier Grupo de Complementación.
- + Que no hubieran recibido drogas citotóxicas o que inter-
fieran con el procesamiento de los ácidos nucleicos, por
lo menos 6 meses antes del estudio.
- + Que no hubieran estado expuestos a radiación por lo menos
6 meses antes del estudio.
- + Sin evidencia de proceso infeccioso o neoplásico en el -
momento del estudio.

GRUPO III

- + Pacientes clínicamente sanos.
- + Menores de 50 años de edad.
- + De cualquier sexo.
- + Sin antecedentes familiares de enfermedades hereditarias que cursen con alteraciones en el cariotipo.
- + Pacientes diestros y sin antecedentes familiares de lateralidad cerebral.
- + Sin antecedentes personales ni familiares en primer grado de cáncer.
- + Sin evidencia de proceso infeccioso en el momento del estudio.
- + Que no hubieran recibido drogas citotóxicas o que interfirieran con el procesamiento de los ácidos nucleicos, por lo menos 6 meses antes del estudio.
- + Que no hubieran recibido radiación por lo menos 6 meses antes del estudio.

A todos los pacientes se les tomó una muestra de sangre periférica y se realizaron dos cultivos de linfocitos por paciente bajo las condiciones anteriormente descritas, un cultivo no fue radiado en tanto que el otro sí. La radiación que dada en la fase G2 del cuarto y último ciclo celular y la dosis de rayos X que se dio fue la que se seleccionó en la primera parte del estudio.

El total de cultivos (radiados y no radiados) fueron cosechados y se prepararon las laminillas con la tinción de Giemsa para observar los cariotipos al microscopio de luz. Por cada cultivo se cuantificaron los rompimientos cromosómicos encontrados en 25 metafases seleccionadas al azar, de cada una de las metafases escogidas se anotó su ubicación en el Bernier del microscopio, posteriormente las laminillas fueron desteñidas y sometidas a una tinción de bandeó de cromosomas, cuya técnica se describe a continuación:

TINCION DE BANDAS G

- + Colocar en un vaso de Koplín 50 ml de bouffer de fosfatos y adicionar una alícuota de tripsina (2.5 ug/ml).
- + Colocar en esta solución 10 a 20 segundos la laminilla.

- + En un vaso de Koplín colocar 40 ml de agua destilada más un gramo de EDTA, y enjuagar la laminilla por 10 segundos en esta solución.
- + En un vaso de koplín con 40 ml de bouffer de fosfatos co-

locar la laminilla durante 10 segundos.

+ Teñir con Giemsa al 5% en bouffer de fosfatos de 5 a 7 minutos.

+ Secar al aire y observar al microscopio.

El propósito de realizar esta tinción de bandeado de cromosomas fue determinar en qué cromosoma y en qué región de éste habían ocurrido los rompimientos cromosómicos que previamente se habían localizado en 25 metafases previamente escogidas. Así mismo se investigo si existían aberraciones cromosómicas que no eran posibles de ver con la tinción primera de Giemsa, como por ejemplo inversiones, deleciones y translocaciones.

Realizado lo anterior, se promediaron en cada grupo el número total de alteraciones estructurales (rompimientos, inversiones, deleciones y translocaciones cromosómicas), así como el número total de metafases leídas por grupo en las diferentes condiciones.

ANALISIS ESTADISTICO

Las proporciones de metafases analizadas y alteraciones estructurales encontradas en cada grupo fueron comparadas entre los tres grupos utilizando la Prueba Exacta de Fisher.

RESULTADOS

PRIMERA PARTE:

Los resultados de la primera parte del estudio se presentan en la tabla 1.

Se experimentó con 14 dosis de rayos X haciendo distintas combinaciones de kv, mAs y distancia. Se inició con dosis pequeñas sin encontrar diferencias respecto a los cultivos sin radiar, al utilizar 125 kv, 25 mAs a 50 cm se indujo en los 5 cultivos radiados un promedio de 1 rompimiento en 25 metafases, al incrementar la dosis de radiación se fue encontrando mayor número de rompimientos cromosómicos, sin embargo al utilizar la dosis de 125 kv, 125 mAs a 50 cm el índice mitótico disminuyó de manera muy considerable de tal forma que no era posible hacer la lectura de 25 metafases, por otra parte los cromosomas con esta dosis perdían su estructura normal, de tal forma que se hacía imposible su análisis.

En base a lo anterior decidimos seleccionar dos dosis de radiación para continuar con la segunda parte del estudio.

Las dosis seleccionadas fueron la de 125 kv, 50 mAs a 30 cm y la de 125 kv, 100 mAs a 30 cm.

RESULTADOS

SEGUNDA PARTE:

Se reclutaron 5 pacientes para el Grupo I, 3 hombres y 2 mujeres, con una edad media de 7.4 años. El Grupo II estuvo constituido por 7 pacientes, 2 hombres y 5 mujeres, con una edad media de 31.2 años. El Grupo III estuvo formado por 10 sujetos, 3 hombres y 7 mujeres, con una edad media de 32.8 años.

El índice mitótico en los cultivos del Grupo I fue muy bajo, de tal forma que no fue posible hacer la lectura de 25 metafases en ninguno de los pacientes.

En el Grupo II el índice mitótico también se observó disminuido, y solo en 3 pacientes se pudo hacer la lectura de 25 metafases.

En el Grupo III el índice mitótico fue normal a excepción de los cultivos que recibieron la dosis de 125 kv, 100 mAs a 30 cm, en donde se observó un ligero decremento en el número de metafases.

Debido a que no se pudo hacer en todos los pacientes la lectura de 25 metafases, se obtuvo de cada paciente la proporción de alteraciones estructurales por metafases leídas.

En la tabla 2 se presenta el promedio de alteraciones estructurales encontradas en cada Grupo.

Para investigar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos, se obtuvo de cada grupo y en las diferentes condiciones a las que se sometieron los cultivos, las proporciones de metafases leídas y el número de alteraciones estructurales, y fueron comparadas utilizando la Prueba Exacta de Fisher, las diferencias se reportan a continuación:

CULTIVOS SIN RADIAR

Grupo I VS Grupo III	$p = 0.0024$
Grupo II VS Grupo III	$p = 0.0238$
Grupo I VS Grupo II	$p = 0.2460$

CULTIVOS RADIADOS CON 125 kv 50 mAs 30 cm

Grupo I VS Grupo III	$p < 0.0001$
Grupo II VS Grupo III	$p = 0.0525$
Grupo I VS Grupo II	$p < 0.0010$

CULTIVOS RADIADOS CON 125 kv 100 mAs 30 cm

Grupo I VS Grupo III	$p = 0.0014$
Grupo II VS Grupo III	$p = 0.0028$
Grupo I VS Grupo II	$p = 0.4215$

DISTRIBUCION DE LAS ALTERACIONES ESTRUCTURALES

La calidad de la tinción de bandeado de las metafases en los tres grupos fue deficiente, por lo que la identificación exacta de la ubicación de las alteraciones estructurales cromosómicas no se logró en el 100%.

En el Grupo I el número total de alteraciones estructurales fue de 44, y solo en 6 de ellas (13.6%) se logró identificar el cromosoma afectado, que fueron los siguientes: (2) 1q, (2) 2q, (1) 3p y (1) 14q.

El 86.4% de las alteraciones estructurales solo se logró identificar el grupo al que pertenecía el cromosoma afectado, así como si se trataba de los brazos cortos o largos. La distribución fue la siguiente: Grupo A = 0 (0%), Grupo B = 8 (21%), Grupo C = 28 (73%), Grupo D = 2 (5%), Grupo E = 0 (0%), Grupo F = 0 (0%) y Grupo G = 0 = (0%).

De las 28 alteraciones estructurales ubicadas en el Grupo C, 20 (71%) ocurrieron en los brazos largos y 8 (29%) en los brazos cortos. (tablas 3 y 4)

En el Grupo II, de 80 alteraciones estructurales observadas, solo 23 de ellas (28.7%) se logró identificar el cromosoma afectado, y la distribución fue la siguiente: (3) 1q, (2) 1p, (7) 2q, (1) 2p, (3) 3p, (1) 3q, (1) 6p, (1) 7q, (2) 12q, (1) 17q y (1) 18q.

En el 71.3% de las alteraciones estructurales de este Grupo de pacientes, solo se identificó el grupo al que pertenecía el cromosoma, y su distribución fue la siguiente: Grupo A = 5 (8.7%), Grupo B = 5 (8.7%), Grupo C = 31 (54.3%), Grupo D = 7 (12.2), Grupo E = 6 (10.5%), Grupo F = 1 (1.7%) y Grupo G = 2 (3.5%).

De las 31 alteraciones ocurridas en el Grupo C, 24 (77%) de ellas se ubicaron en los brazos largos y 7 (23%) en los brazos cortos. (tablas 3 y 4)

En el Grupo III se encontraron 34 alteraciones estructurales y solo en 12 (35.3%) se estableció el cromosoma afectado, que fueron los siguientes: (4) 1q, (2)2q, (2) 3q, (2) 5q y (2) 13q.

La distribución por grupo de las 24 alteraciones restantes fue la siguiente: Grupo A = 4 (18%), Grupo B = 6 (27%), Grupo C = 6 (27%), Grupo D = 4 (18%), Grupo E = 0 (0%), Grupo F = 0 (0%) y Grupo G = 2 (9%).

De las 6 alteraciones estructurales ocurridas en el Grupo C, 3 (50%) de ellas ocurrieron en los brazos largos y 3 (50%) en los brazos cortos. (tablas 3 y 4)

DISCUSION

Los resultados obtenidos en la primera parte del estudio nos indican que se requieren dosis muy altas de rayos X para inducir de 1 a 5 rompimientos cromosómicos en 25 metafases en sujetos normales.

Los rompimientos cromosómicos no fueron incrementandose en forma gradual cuando se utilizaron dosis crecientes de rayos X. Como podemos observar en la tabla 1 no hubo diferencias importantes en el número de rompimientos cromosómicos inducidos por una dosis baja de 42 kv 12.5 mAs a 84 cm en comparación de una relativamente alta de 125 kv 50 mAs a 50 cm.

Una diferencia significativa de rompimientos cromosómicos en cultivos radiados comparados con los no radiados se encontró solamente en un rango muy pequeño de dosis de radiación (de 125 kv 50 mAs 50 cm a 125 kv 100 mAs 30 cm), ya que al incrementar ligeramente la última dosis de radiación el índice mitótico disminuía considerablemente, esto probablemente debido a que era muy considerable el daño cromosómico inducido por esa dosis, lo que hacia que las células afectadas se detuvieran a reparar su DNA y no pasaran a la fase M, que es en la cual detenemos el ciclo celular con colchicina. Además la calidad de los cariotipos con esta dosis de radiación (125 kv 125 mAs 50 cm) era muy mala, de tal forma que no era posible realizar su análisis.

Consideramos que hubiera sido interesante usar combinaciones de dosis de radiación con un mayor kilovoltaje y menor miliamperaje, sin embargo nuestro equipo de rayos X solo tenía una capacidad de 125 kv.

Decidimos continuar la segunda parte del estudio seleccionando dos dosis de radiación para investigar si alguna de ellas nos daba una mayor diferencia en el número de alteraciones estructurales cromosómicas entre los tres grupos de pacientes estudiados.

En la segunda parte del estudio nos enfrentamos al problema del bajo índice mitótico encontrado en los cultivos del Grupo I, lo que nos imposibilitó hacer la lectura de 25 metafases como se tenía planeado.

El bajo índice mitótico en estos pacientes del Grupo I era de esperarse, ya que una de las características de los linfocitos de pacientes con ataxia telangiectasia es su pobre respuesta a la proliferación inducida por mitógenos como la fitohemaglutinina, suponemos que este problema pudiera haber resuelto utilizando otros mitógenos con diferente mecanismo de acción, como son el ester de phorbol o el ionoforo de calcio, sin embargo no hay estudios que analicen el comportamiento in vitro de linfocitos de pacientes con ataxia telangiectasia en presencia de estos mitógenos.

Otra forma de resolver el problema del bajo índice mitótico en este grupo es utilizar cultivos de fibroblastos en lugar de cultivo de linfocitos, sin embargo se desconoce si los cromosomas que frecuentemente se afectan en forma espontánea o por la radiación ionizante en linfocitos de pacientes con ataxia telangiectasia sean los mismos en cultivos de fibroblastos de estos mismos pacientes.

En el Grupo II (heterocigotos) el índice mitótico también se vio ligeramente disminuido en comparación con el grupo control, probablemente debido a que el daño cromosómico en estos pacientes fue mayor que en los normales, lo que inducía a las células a no entrar a fase M hasta no reparar parte de dicho daño. Consideramos que esta fue la razón ya que los cultivos no radiados de los pacientes de este grupo mostraron un índice mitótico normal, además no se ha descrito que los linfocitos de heterocigotos de ataxia telangiectasia presenten una mala respuesta de proliferación al estímulo de la fitohemaglutinina.

Debido al problema de las diferencias entre los tres grupos respecto al índice mitótico, fue necesario utilizar la Prueba Exacta de Fisher para comparar las proporciones en el número de alteraciones estructurales y metafases leídas por cada grupo. En base a lo anterior, pudimos observar que inclusive en los cultivos sin radiar existen diferencias significativas en el número de alteraciones estructurales entre el grupo de homocigotos y heterocigotos comparado con los normales, sin embargo no existieron diferencias significativas entre los homocigotos y heterocigotos en los cultivos sin radiar ($p = 0.2460$).

Con respecto a los cultivos radiados con las dosis utilizadas, existieron diferencias entre homocigotos y heterocigotos en comparación con los normales, siendo más considerable la diferencia con la dosis mayor (125 kv 100 MAS 30 cm), sin embargo con esta dosis no existió diferencia

significativa entre homocigotos y heterocigotos, en tanto que sí existió con la dosis menor (125 kv 50 mAs 30 cm).

Para los objetivos de este estudio, consideramos que la dosis de 125 kv 100 mAs 30 cm es la mejor para la detección de heterocigotos de ataxia telangiectasia.

La distribución en los cromosomas de las alteraciones estructurales no se logró identificar en el 100% debido a la mala calidad de los cariotipos obtenida con la tinción de bandas G, lo que imposibilitó la identificación de los cromosomas y regiones afectadas. Por la misma razón no se pudieron identificar inversiones y translocaciones, solo se logró identificar el grupo del cromosoma afectado y si se ubicaba la alteración estructural en brazos cortos o largos.

En base a estos datos obtenidos observamos una clara tendencia a ser afectado un solo cromosoma del grupo C en los paciente heterocigotos y homocigotos, no observandose en el grupo control.

Probablemente el cromosoma afectado del grupo C sea el cromosoma 7, que es el que posee el gen de la cadena beta y el de la cadena gama del TCR, 7q35 y 7p15 respectivamente, sin embargo se necesitan más estudios al respecto y mejorar la técnica de bandeado para poder establecer la ubicación precisa de las alteraciones estructurales y valorar verdaderamente si tienen un patrón de distribución constante en homocigotos y heterocigotos de ataxia telangiectasia.

CONCLUSIONES

Si existen diferencias estadísticamente significativas en el número de alteraciones estructurales cromosómicas espontáneas e inducidas por los rayos X en linfocitos cultivados de heterocigotos de ataxia telangiectasia u sujetos normales, de la misma manera esto ocurre entre homocigotos y normales.

Si existen diferencias en el número de alteraciones estructurales cromosómicas en linfocitos radiados in vitro de pacientes con ataxia telangiectasia y heterocigotos de la enfermedad, sólo que estas diferencias no son significativas.

Las alteraciones estructurales cromosómicas se presentan preferentemente en algún cromosoma del grupo C en homocigotos y heterocigotos de ataxia telangiectasia, no siendo así en sujetos normales.

R E S U L T A D O S

TABLA No. 1

Kv	mAs	Distancia	Romp. cromosómicos *
42 Kv	12.5 mAs	84 cm	0
77 Kv	12.5 mAs	50 cm	0
60 Kv	12.5 mAs	50 cm	0
77 Kv	12.5 mAs	84 cm	0
125 Kv	12.5 mAs	84 cm	0
125 Kv	12.5 mAs	50 cm	0
125 Kv	12.5 mAs	30 cm	0
125 Kv	25 mAs	50 cm	1
125 Kv	25 mAs	30 cm	2
125 Kv	50 mAs	50 cm	1
125 Kv	50 mAs	30 cm	4
125 Kv	100 mAs	50 cm	1
125 Kv	100 mAs	30 cm	5
125 Kv	125 mAs	50 cm	No valorable

* El número de rompimientos es en 25 metafases.

TABLA No. 2

GRUPO	SIN RADIAR	125kv 50mAs 30 cm	125kv 100mAs 30 cm
Grupo I	0.134	1.146	0.672
Grupo II	0.064	0.228	0.320
Grupo III	0.000	0.058	0.101

* Las cantidades expresan en promedio el número de alteraciones estructurales por metafase.

Tabla No. 3 DISTRIBUCION POR GRUPOS DE LAS ALTERACIONES ESTRUCTURALES

GRUPO CROMOSOMICO	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III
A	0 %	8.7 %	18 %
B	21 %	8.7 %	27 %
C	73 %	54.3 %	27 %
D	5 %	12.2 %	18 %
E	0 %	10.5 %	0 %
F	0 %	1.7 %	0 %
G	0 %	3.5 %	9 %

TABLA No. 4 DISTRIBUCION EN EL GRUPO C

GRUPO C	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III
Cq	20 - 71 %	24 - 77 %	3 - 50 %
Cp	8 - 29 %	7 - 23 %	3 - 50 %

B I B L I O G R A F I A

1. N. Lahat, N. Zelnik, P. Froom, et al. Impaired autologous mixed lymphocyte reaction (AMLR) in patients with Ataxia-telangiectasia and their family members. *Clin Exp Immunol* 1988; 74; 32-35.
2. Richard A. Gatti, Elena Boder, Harry V. Vinters, et al. Ataxia-telangiectasia: an interdisciplinary approach to pathogenesis. *Medicine* 1991; 70;99-117.
3. Richard A. Gatti, Izzet Berkel, Elena Boder, et al. Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22-23. *Nature* 1988; 336; 577-580.
4. Richard A. Gatti. Speculations on the ataxia-telangiectasia defect. *Clin Immunol Immunopathol* 1991; 61; S10-S15.
5. J. M. Cunningham, G. E. Francis, M. J. Holland, et al. Aberrant DNA topoisomerase II activity, radioresistance and inherited susceptibility to cancer. *Br J Cancer* 1991; 63(1); 29-36.
6. Taylor A., Metcalfe J., McConville C. Increased radiosensitivity and the basic defect in ataxia telangiectasia. *Int J Radiat Biol* 1989; 56(5); 677-684.
7. Swift M., Morrell D., Cromartie E., et al. The incidence and gene frequency of ataxia-telangiectasia in the United States. *Am J Hum Genet.* 1986; 39; 573-583.
8. Michael Swift, Daphne Morrell, Ruby B. Massey, et al. Incidence of cancer in 161 families affected by ataxia-telangiectasia. *N Engl J Med* 1991; 325; 1831-1836.
9. Wayne P. London. Gamma/delta T-cell receptors. *Lancet* 1991; 337; 613.
10. Stern M., Lipkowitz S., Aurias A., et al. Inversion of chromosome 7 in ataxia telangiectasia is generated by a rearrangement between T-cell receptor beta and T-cell receptor gamma genes. *Blood* 1989, 74(6); 2076-2080.
11. Lahmann A., Jaspers N., Gatti R. Fourth International Workshop on Ataxia Telangiectasia. *Cancer Res* 1989, 49(21); 6162-6163.
12. Mirzayans R., Smith B., Paterson M. Hypersensitivity to cell killing and faulty repair of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine-

detectable sites in human (ataxia telangiectasia) fibroblasts treated with 4-nitroquinoline 1-oxide. *Cancer Res* 1989; 49(20); 5523-5529.

13. Hilgers G., Abrahams P., Chen Y., et al. Impaired recovery and mutagenic SOS-like responses in ataxia telangiectasia cells. *Mutagenesis* 1989; 4(4); 271-276.

14. Rosin M., Ochs H., Gatti R., et al. Heterogeneity of chromosomal breakage levels in epithelial tissue of ataxia telangiectasia homozygotes and heterozygotes. *Hum Genet* 1989; 83(2); 133-138.

15. Humphreys M., Nevin N., Wooldridge M. Cytogenetic investigations in a family with ataxia telangiectasia. *Hum Genet* 1989; 83(1); 79-82.

16. Mozdarani H., Bryant P. Cytogenetic response of normal human and ataxia telangiectasia G2 cells exposed to X-rays and ara C. *Mutat Res* 1989; 226(4); 223-228.

17. Kumar S., Seymour G., Lavin M. Immunoglobulin synthesis and gene rearrangement in ataxia telangiectasia B-lymphoblastoid cell lines. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1989; 89(2-3); 264-268.

18. Curry C., Oplague P., Tsai J. et al. ATFresno: a phenotype linking ataxia telangiectasia with the Nijmegen breakage syndrome. *Am J Hum Genet* 1989; 45(2); 270-275.

19. Cohen M., Levy H. Chromosome instability syndromes. *Adv Hum Genet* 1989; 18; 43-149.

20. Young B., Painter R. Radioresistant DNA synthesis and human genetic diseases. *Hum Genet* 1989; 82(2); 113-117.

21. Hannan M., Smith B., Sigut D., et al. Chronic gamma-radiation sensitivity of skin fibroblasts from patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Mutat Res* 1989; 226(1); 49-53.

22. Rudolph N., Latt S. Flow cytometric analysis of X-ray sensitivity in ataxia telangiectasia. *Mutat Res* 1989; 211(1); 31-41.

23. Rudolph N., Nagasawa H., Little J., et al. Identification of ataxia telangiectasia heterozygotes by flow cytometric analysis of X-ray damage. *Mutat Res* 1989; 211(1); 19-29.

24. Becker Y., Tabor E., Asher Y. Ataxia telangiectasia fibroblasts have less fibronectin mRNA than control cells but have the same levels of integrin and beta-actin mRNA. *Hum Genet* 1989; 81(2); 165-171.

25. Ziv Y., Amiel A., Jaspers N., et al. Ataxia telangiectasia: a variant with altered in vitro phenotype of fibroblast cells. *Mutat Res* 1989; 210(2); 211-219.

26. Mozdarani H., Bryant P. Kinetics of chromatid aberrations in G2 ataxia telangiectasia cells exposed to X-rays and ara A. *Int J Radiat Biol* 1989; 55(1); 71-84.

27. Kojis T., Schreck R., Gatti R., et al. Tissue specificity of chromosomal rearrangements in ataxia telangiectasia. *Hum Genet* 1989; 83(4); 347-352.
28. Waghray M., Gascon G., al-Sedairy S., et al. Cytogenetic investigations in three cell types of a Saudi family with ataxia telangiectasia. *Hum Genet* 1991; 87(3); 285-289.
29. Ziv Y., Rotman G., Frydman M., et al. The ATC (ataxia telangiectasia complementation group C) locus localizes to 11q22-q23. *Genomics* 1991; 9(2); 373-375.
30. Houldsworth J., Cohen D., Singh S., et al. The response of ataxia telangiectasia lymphoblastoid cells to neutron irradiation. *Radiat Res* 1991; 125(3); 277-282.
31. Kojis T., Gatti R., Sparkes R. The cytogenetics of ataxia telangiectasia. *Cancer Genet Cytogenet* 1991; 56(2); 143-156.
32. Mouchet F., Ninane J., Gosseye S., et al. Leiomyoma of the suprarenal gland in a child with ataxia telangiectasia. *Pediatr Hematol Oncol* 1991; 8(3); 235-241.
33. Gatti R. Ataxia telangiectasia (group A): localization of ATA gene to chromosome 11q22-23 and pathogenetic implications. *Allergol Immunopathol (Madr)* 1991; 19(1); 42-46.
34. Ejima Y., Qshimura M., Sasaki M. Determination of the chromosomal site for the human radiosensitive ataxia telangiectasia gene by chromosome transfer. *Mutat Res* 1991; 250(1-2); 337-343.
35. Weeks D., Paterson M., Lange K., et al. Assessment of chronic gamma radiosensitivity as an in vitro assay for heterozygote identification of ataxia telangiectasia. *Radiat Res* 1991; 128(1); 90-99.
36. Blocher D., Sigut D., Hannan M. Fibroblasts from ataxia telangiectasia (AT) and AT heterozygotes show an enhanced level of residual DNA double-strand breaks after low dose-rate gamma-irradiation as assayed by pulsed field gel electrophoresis. *Int J Radiat Biol* 1991; 60(5); 791-802.
37. Kobayashi Y., Tycko B., Soreng A., et al. Transrearrangements between antigen receptor genes in normal human lymphoid tissues and in ataxia telangiectasia. *J Immunol* 1991; 147(9); 3201-3209.
38. Jaspers N., Gatti R., Baan C., et al. Genetic complementation analysis of ataxia telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome: a survey of 50 patients. *Cytogenet Cell Genet* 1988; 49(4); 259-263.
39. Noda A. Replicon initiation in normal human cells and in ataxia telangiectasia cells: its differential inhibition by cycloheximide and bleomycin. *Cell Biol Int Rep* 1988; 12(11); 943-950.

40. De Jonge J., Tijssen C. Ataxia telangiectasia in a brother and sister at older age. Clin Neurol Neurosurg 1988; 90(3); 279-281.
40. Sanal O., Wei S., Foroud T., et al. Further mapping of an ataxia telangiectasia locus to the chromosome 11q23 region. Am J Hum Genet 1990; 47(5); 860-866.
42. Pawlak A., Kotecki M., Ignatowicz R. Increased frequency of chromatid breaks in lymphocytes of heterozygotes of ataxia telangiectasia after in vitro treatment with caffeine. Mutat Res 1990; 230(2); 197-204.
43. Swift M. Genetic aspects of ataxia telangiectasia. Immunodeficiency Rev 1990; 2(1); 67-81.
44. Schwartzman J., Sole D., Naspitz C. Ataxia telangiectasia: a clinical and laboratory review study of 14 cases. Allergol Immunopathol (Madr) 1990; 18(2); 105-111.
45. Sanford K., Parshad R., Price F., et al. Enhanced chromatid damage in blood lymphocytes after G2 phase X irradiation: a marker of the ataxia telangiectasia gene. J Natl Cancer Inst 1990; 82(12); 1050-1054.
46. Woods C., Bunday S., Taylor A. Unusual features in the inheritance of ataxia telangiectasia. Hum Genet 1990; 84(6); 555-562.
47. Swift M., Chase C., Morrell D. Cancer predisposition of ataxia telangiectasia heterozygotes. Cancer Genet Cytogenet 1990; 46(1); 21-27.
48. Rybczynska M., Pawlak A., Hoffmann S., et al. Carriers of ataxia telangiectasia gene display additional protein fraction and changes in the environment of SH groups in erythrocyte membrane. Biochim Biophys Acta 1990; 1022(3); 260-264.
49. Concannon P., Malhotra U., Charmley P., et al. The ataxia telangiectasia gene (ATA) on chromosome 11 is distinct from the ETS-1 gene. Am J Hum Genet 1990; 46(4); 789-794.
50. Komatsu K., Kodama S., Okumura Y., et al. Restoration of radiation resistance in ataxia telangiectasia cells by the introduction of normal human chromosome 11. Mutat Res 1990; 235(2); 59-63.
51. Kapp LN., Painter RB., Yu LC., et al. Cloning of a candidate gene for ataxia-telangiectasia group D. Am J Hum Genet 1992; 51(1); 45-54.
52. Petkovic I., Ligutic I., Dominis M., et al. Cytogenetic analysis in ataxia-telangiectasia with malignant lymphoma. Cancer Genet Cytogenet 1992; 60(2); 158-163.
53. Pandita TK., Hittelman WN. Initial chromosome damage but not DNA damage is greater in ataxia telangiectasia cells. Radiat Res 1992; 130(1); 94-103.

54. Paganelli R., Scala E., Scarselli E., et al. Selective deficiency of CD4+/CD45RA+ lymphocytes in patients with ataxia telangiectasia. *J Clin Immunol* 1992; 12(2); 84-91.

55. Ziv Y., Frydman M., Lange E., et al. Ataxia telangiectasia: linkage analysis in highly inbred Arab and Druze families and differentiation from an ataxia-microcephaly-cataract syndrome. *Hum Genet* 1992; 88(6); 619-626.