

INESTABILIDAD CROMOSOMICA EN NEUROFIBROMATOSIS

Dr. Ramiro López¹; Dr. Camilo Félix¹; Dr. José Ruales¹;
 Dr. Galo Cantos¹; Sr. Marcelo López²; Sr. Patricio Quiroga²;
 Srta. Ma. Eugenia Gómez²; y Prof. Dra. Lucía Regina Martelli³

Resumen

Se realizó un estudio de aberraciones cromosómica (quebras, gaps, dicéntricos, fragmentos, anillos), de tres pacientes con Neurofibromatosis y cinco controles, mediante el cultivo temporario de linfocitos y utilizando Bleomicina. El estudio citogenético, revela una inestabilidad cromosómica en los pacientes neurofibromatosos por un incremento notable de gaps, dicéntricos y fragmentos en comparación con el grupo control. Nosotros comprobamos que la Neurofibromatosis es un síndrome de inestabilidad cromosómica de acuerdo con un reporte previo de Mohamed Hafez y cols. en 1985.

Introducción

La Neurofibromatosis (NF), es una de las alteraciones más comunes producidas por herencia autosómica dominante en el hombre (1, 2) el gen dominante está localizado en la región pericentromérica del cromosoma 17 (3), que afecta a hombres y mujeres por igual.

La NF fue descrita por primera

vez en 1768 por "Mark Akenside", quien reportó el caso de un hombre de aproximadamente 60 años de edad con múltiples tumores cutáneos y subcutáneos que fueron heredados de su padre y pensaba que dichas lesiones se debían a un hipercrecimiento de glándulas subcutáneas (4). Hace más de un siglo en 1822 "Friedrich Daniel von Recklinhausen" (6 - 7) reportó dos pacientes con numeroso neurofibromas y fue el primero en notar el origen neural de este tumor por lo que hoy la enfermedad lleva su nombre. En 1918 "Thomson" demostró que éste es un desorden autosómico dominante (8). La NF se presenta con una incidencia anual de 3 a 6 por cada 10.000 nacimientos (6, 9) con una tasa de mutación de 1 por 9.000 gametos (6) por generación y con una prevalencia en la población de 1 en 2.500 - 3.300

1. Postgrado de Ciencias Médicas Biomédicas. Laboratorio de Embriología Genética. Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Central. Quito.
2. Ayudante del Laboratorio de Genética. Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Central. Quito.
3. Laboratorio de Citogenética. Facultad de Medicina. Ribeirao Preto U.S.P. Brasil

(10, 11). El sitio primario donde se expresa la mutación parece ser a nivel de las células de Schwann y la neurona (12) por lo que la NF es el desorden prototipo para el estudio de mecanismos biológicos de expresividad variable y de una elevada penetrancia (80 o/o) (13, 14).

El paciente neurofibromatoso presenta diferentes grados de alteraciones que pueden estar presentes desde el nacimiento o aparecer durante las diferentes etapas de la vida inclusive hasta en la tercera edad.

Hallazgos en el cuadro clínico

a) **Alteraciones cutáneas:** manchas de color "café con leche" en la piel, cara, tronco, extremidades, de más de 1,5 cm de diámetro en el adulto y menores a 0,5 cm en el niño (6, 10, 15), y neurofibromas (10) (15).

b) **Alteraciones esqueléticas:** en un 2-3 o/o de los afectados (16), displasias óseas de tibia y peroné (17), fracturas patológicas (9), pseudoartrosis, alteraciones del esfenoides, alteraciones lamboidales, macrodactilia (1) y escoliosis (18).

c) **Alteraciones del sistema nervioso central y periférico (9):** tumores cerebrales, meningocoele torácico, meningiomas infantiles, síndrome diencefálico (1) y retardo mental (19).

d) **Alteraciones endócrinas:** pubertad precoz (1, 9), desórdenes del crecimiento (9), hiperactividad (19) y nódulos de Lisch en el iris (1).

e) **Alteraciones vasculares (17, 20):** Aproximadamente el 25 o/o de los pacientes con NF desarrollan una o más complicaciones, siendo la malignización la complicación más severa (6) de un 14 al 48 o/o (21) de los pacientes. Existe una incidencia altamente marcada y una predisposición genética para desarrollar malignidad en pacientes con NF, si se encuentran en contacto con ciertos factores ambientales. Por ejemplo:

radiaciones (22, 23).

Además se sugiere que existe un aumento de la susceptibilidad en pacientes neurofibromatosos para desarrollar cáncer, al parecer mediada hormonalmente (21).

Presumiblemente, el neurofibroma puede resultar de una mutación el neurofibrosarcoma generalmente se inicia como un neurofibroma (24).

No existe un test diagnóstico para neurofibromatosis y la mutagénesis de esa enfermedad es desconocida (18).

Recientemente se ha demostrado inestabilidad cromosómica en la NF (2) y por tanto predisposición para desarrollar cáncer (22). Ultimamente se ha observado que la NF está asociada a "X" frágil (19) o con un complejo cromosómico alterado que involucra a los cromosomas 1q, 8q, 15q, con dos puntos de rotura en el 8 (25), así como también la relación entre trisomía 8, mosaicismo, leucemia granulocítica crónica y neurofibromatosis (26). Inclusive se realizan estudios de hibridación in-situ (27) aunque esto podría ser altamente circunstancial, no deja de preocupar la relación que existe entre la NF y su tendencia a producir malignidad.

Objetivo

El objetivo del presente trabajo es demostrar inestabilidad cromosómica en la neurofibromatosis de acuerdo con el análisis estadístico de las frecuencias obtenidas después de la investigación citogenética detallada del material sometido al estímulo de sustancias alquilantes-radiomiméticas inductores de aberraciones cromosómicas (Bleomicina) (35).

Materiales y Métodos

a) El presente es un estudio citogenético controlado. Se incluyen 5 pacientes de sexo femenino entre 11 y 45 años de edad diagnosticados de NF en el Departamento

mento de Dermatología y Genética del Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto S.P. y 5 pacientes sanos de sexo femenino entre 10 y 46 años de edad, debiendo ellos cumplir los siguientes criterios de inclusión (28):

- No fumadores.
- No exposición a agentes químicos ni físicos.
- Clínicamente sanos a excepción del diagnóstico de NF en el grupo correspondiente.

Dos pacientes no fueron incluidos para el estudio por presentar resfriado común.

b) Para el cultivo temporario de linfocitos se procedió de acuerdo con la técnica descrita por Moorhead y cols. (29), modificada por Ferrari (30). En cada paciente se recolectó una muestra de sangre periférica por punción venosa con jeringuilla descartable y previamente heparinizada (Liquemine—Roche 5.000 U/ml). La sangre fue colocada en un tubo de ensayo estéril y mantenida en reposo por aproximadamente dos horas para sedimentación y obtención de mayor cantidad de linfocitos. Posteriormente se tomó 3 ml de plasma y se colocó 1 ml del mismo, en los frascos que contenían 10 ml de medio de cultivo compuesto por 70 o/o de medio RPMI 1640 (GIBCO, Grand Island, NY), 20 o/o de suero humano normal, 2 o/o de fitohemaglutinina y antibióticos (penicilina 100 U/200 ml y estreptomicina 0,025 U/20 ml). El medio fue incubado por un lapso de 72 horas. En dos medios de cultivo de las mismas características descritas anteriormente se añadió Bleomicina (Blenoxane — 15 mg Bristol) 2 ug/ml; se cultivó por 72 horas a 37°C 1 h 30 minutos antes de completar el período de incubación se adicionó a cada frasco 0,1 ml de solución de colchicina al 0,0016 g o/o. Se preparó la muestra para el extendido según las técnicas descritas (29, 30) y fueron preparadas las

láminas y coloreadas con solución Giemsa diluida en tampón fosfato 0,06 M, ph 6,8 (1:30) por 5 minutos.

c) El análisis se realizó en microscopio óptico (1.000 X) en metafases que presentaban cromosomas separados y sin superposición. Se estudiaron 100 metafases en cada individuo control y 200 metafases en cada paciente afectado, (50 o/o de las metafases con adición de Bleomicina).

d) El análisis comprendió: observación y diseño de los cromosomas, clasificándolos según los patrones de la conferencia de Chicago (31) y de París (32), para el estudio de aberraciones cromosómicas: quiebras, "gaps" (33, 34), cromosomas dicéntricos, cromosomas en anillo, figuras trirradiales y cuadrirradiales (31); fueron excluidas las metafases con número menor o igual a 44 cromosomas, así como las "pulverizadas".

Resultados

Se realizó comparación estadística entre los dos grupos mediante el uso de la T de student's, obteniéndose algunas diferencias significativas entre los pacientes con NF y los pacientes control. El cuadro 1 indica las diferentes alteraciones cromosómicas encontradas en los pacientes control.

Discusión y Conclusiones

La producción de quiebras cromosómicas en pacientes control, por adición de Bleomicina, es estadísticamente significativamente ($P < 0,001$), en comparación con los cultivos sin exposición a la misma; no sucede lo mismo con la producción de gaps en los cuales no encontramos una diferencia notable.

La producción de quiebras cromosómicas en pacientes con NF por adición de Bleomicina, no es estadísticamente signifi-

CUADRO No. 1
FRECUENCIA DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS ESPONTANEAS
EN LINFOCITOS DE PACIENTES CONTROL VS PACIENTES CON NF

PACIENTES	ABERRACION POR CELULA								
	TOTAL CELULAS X	QUIEBRAS X	GAPS X	POLIPLOIDIAS X	DICENTRICOS X	FRAGMENTOS X	ANILLOS X	FIGURAS X	ENDORREDUPLIC X
CONTROL No. 5	250	0,024	0,0192	0	0	0	0	0	0
NF No. 3	300	0,125	0,154	0,011	0,011	0	0	0	0

CUADRO No. 2
ABERRACIONES CROMOSOMICAS EN LINFOCITOS DE PACIENTES
CONTROL VS PACIENTES CON NF POR ADICION DE BLEOMICINA

PACIENTES	ABERRACION POR CELULA								
	TOTAL CELULAS X	QUIEBRAS X	GAPS X	POLIPLOIDIAS X	DICENTRICOS X	FRAGMENTOS X	ANILLOS X	FIGURAS X	ENDORREDUPLIC X
CONTROL No. 5	250	0,196	0,0408	0	0,0048	0,045	0,064	0,004	0
NF No. 3	300	0,1722	0,2188	0,01	0,017	0,05	0,035	0,0443	0,0443

CUADRO No. 3
EFFECTOS DE LA BLEOMICINA PARA PRODUCIR QUIEBRAS Y GAPS
EN LINFOCITOS DE PACIENTES CONTROL

VARIABLE	MEDIA	DESV. STD.	VARIANZA	COEF. VARIACION
1 Q - B	49.0	22.1246	489.5	45.1523
2 Q - C	6.0	1.7320	3.0	28.8675
3 G - B	10.2	4.7116	22.2	46.1930
4 G - C	4.8	2.7740	7.7	57.8102

NOTA: Q = Quiebras G = Gaps
 B = Bleomicina C = Control

CUADRO No. 4
EFFECTOS DE LA BLEOMICINA PARA PRODUCIR QUIEBRAS Y GAPS
EN LINFOCITOS DE PACIENTES CON NF

VARIABLE	MEDIA	DESV. STD.	VARIANZA	COEF. VARIACION
1 Q - B	51.66	19.8578	394.333	38.4345
2 Q - C	37.66	15.9400	254.333	42.3394
3 G - B	65.66	7.3711	54.333	11.2250
4 G - C	46.33	5.6862	32.333	12.2725

ficativa en comparación con los cultivos sin Bleomicina. En relación a los gaps, la diferencia es estadísticamente significativa ($P < 0,025$). (Cuadro 2, 3 y 4; Fig. 1).

La Bleomicina induce más quiebras en pacientes neurofibromatosos en comparación con los pacientes control, pero no existe una diferencia estadísticamente significativa.

Los pacientes con NF, con adición de Bleomicina, presentan más gaps que los pacientes normales a quienes también se les adicionó Bleomicina, con una diferencia estadística muy significativa ($P < 0,005$).

A los pacientes neurofibromatosos a quienes no se les adicionó Bleomicina, presentan más gaps que los normales con Bleomicina, existiendo una diferencia estadísticamente muy significativa ($P < 0,005$), al igual que en los cultivos sin Bleomicina ($P < 0,005$).

Los pacientes con NF presentan notablemente más quiebras cromosómicas en comparación con los controles ($P < 0,005$).

La Bleomicina es un excelente radiomimético para inducir la producción

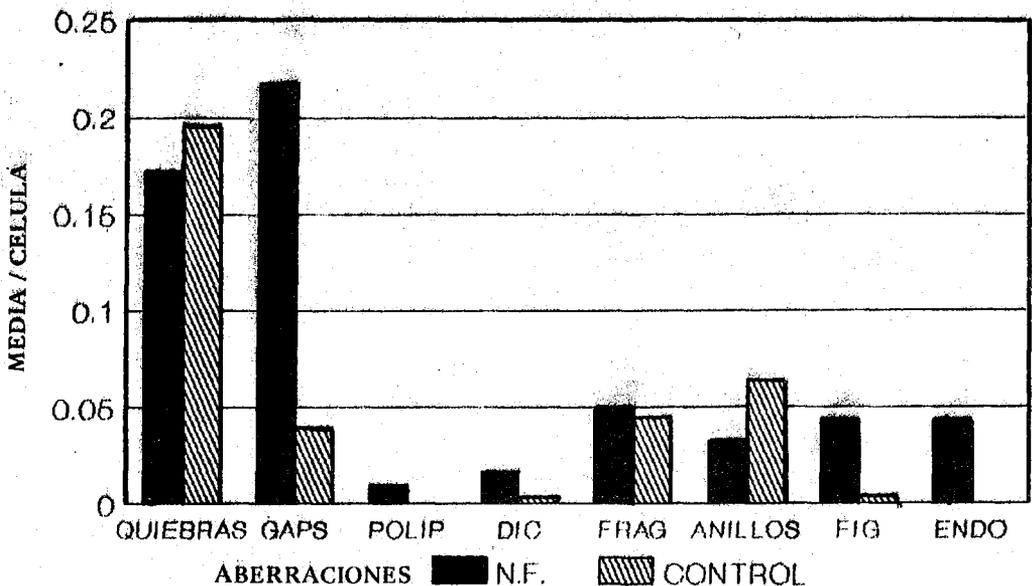
de aberraciones cromosómicas, quiebras y gaps entre pacientes controles y pacientes neurofibromatosos ($P < 0,001$ a $P < 0,025$).

Muchas condiciones son asociadas con una predisposición al cáncer, entre las cuales se incluyen una tendencia familiar hacia la malignidad, con una consistente anomalía en los cromosomas como es el caso de la NF (2). Los síndromes de inestabilidad cromosómica se han caracterizado por un aumento de la susceptibilidad a presentar aberraciones cromosómicas en presencia de sustancias mutagénicas específicas (36), lo cual ha sido comprobado según nuestros resultados utilizando Bleomicina la cual produce quiebras a nivel del ADN (37), por una acción degradativa del mismo (38).

La Bleomicina produjo un incremento notable de gaps, dicéntricos y fragmentos en pacientes NF en comparación con el grupo control.

El paciente neurofibromatoso presenta normalmente más quiebras y gaps cromosómicos in vitro que los pacientes sanos; in vivo estas aberraciones probablemente estarán alterando la estructura genética del individuo.

Figura 1.— Aberraciones cromosómicas por Bleomicina N.F. vs CONTROL



Agradecimiento

Al equipo del Laboratorio de Citogenética de FMRP-USP de una manera muy especial a la Prof. Dra. Cacilda Casartelli, Silvio Avelino dos Santos, María Lucia Machado, Rocelli Aquino, Vandersi Massaro, Fernando Mazucato, Mauricio Penha y María Helena Mamede da Costa, quienes colaboraron para la realización de este trabajo.

Referencias Bibliográficas

1. Carry, John; Bonnie J. Batty; Johnson, John *Et al.* "The Genetics Aspects of Neurofibromatosis". En: *Annals New Yorks Academy of Sciences*. 486, 45 - 46, 1986.
2. Hafez, Mohamed; Layla, Sharaf; M. Samya Abd El-Nabi and Gamal El Wehedy. "Evidence of Chromosomal inestability in Neurofibromatosis". *Cáncer* 52: 2334-2436, 1985.
3. Barker, D.; Wright E. and Nguyen K. *Et al.* "Gene for von Reeking hausen Neurofibromatosis" is in the Pericentromeric Región of Chromosome 17". *Science* 235: 1100-1102, 1987.
4. Akenside, M. "Observations on cancers" *Med Trans* 1768, 1 - 64.
5. Ober, W.B. "Mark Akenside M D (1721-1770) physician and philosophic poet". *New York State Journal Medical* 60: 3166, 1968.
6. Robert, J.M.; Trouillas, P. and Martini, L. "La Moladie de Recklinghausen Une estude Genetique et clinico-Patologique a propos de 67 genealogies". *Journal de Genetique Humaine* 23: 231-233, 1975 (Suppl.)
7. Von Recklinghausen, F.D. "Uber die multiplen fibrome der Haut und ihere. BezieHunzu den multiplen neuromen". Berlin, 1882.
8. Thomson, A. "On Neuroma and Neurofibromatosis". *Edimburg Turn Bull and Spears*, 1990.
9. Seashore, Margretta. "Neurofibromatosis: Clinical and Genetics features". *Connecticut Medicine*. 51 (4): 212-213, 1987.
10. Rock, A. *Test Book of Dermatology*. London, Ed. Blackwell Scientific Publications, 107-109, 1979.
11. Crowe, F.W.; Schull, W.J.; and Neel J.V. *A Clinical Pathological and Genetics Study of Multiple Neurofibromatosis*. Illinois, Chas Thomas Springfield Illinois, 1956.
12. The Lancet (Editorial). "Genetic Markers for Neurofibromatosis" *The Lancet* 719-720, 1988.
13. Sergeyev, A.S. "On the mutation rate of Neurofibromatosis". *Human Genetics* 28: 129-138, 1979.
14. Sergeyev, A.S. "On the mutation rate of Neurofibromatosis". *Human Genetics* 28: 129-138, 1975.
15. Riccardi, Vicente and Derrich, W. Elder. "Multiple Citogenetic Aberrations in Neurofibrosarcomas complicating Neurofibromatosis" *Cancer Genetics and Cytogenetics* 23: 199:209, 1986.
16. Riccardi, Vicent. "Medical Progress von Recklinghausen neurofibromatosis". *New England Journal Medical* 305: 1617-1631, 1981.
17. Ricardi, Vicent. "Neurofibromatosis: Clinical Heterogeneity". *Current Problems in Cancer* 7: 1 - 35, 1982.
18. Huson, S.M.; Meredith, A.L.; Sarfarazi M. *Et al.* "Linkage analysis of peripheral neurofibromatosis (Von Recklinghausen disease) and chromosome 19 markers linked to myotonic distrophy". *Journal of Medical Genetics* 23: 55-57, 1986.
19. Mitchell, Joyce; Wray, Jane and Karen, Michalski. "Brief Clinical Report: Neurofibromatosis and Fragile-x syndrome in the Same Patient". *American Journal of Medical Genetics* 22: 571-575, 1985.
20. Dunn, David. "Neurofibromatosis in Childhood" *Current Problems in Pediatrics*. 17 (8): 451-496, 1987.
21. Bader, Judith. "Neurofibromatosis and Cancer" *Annals New Yorks Academy of Sciences* 486: 57 - 65, 1986.
22. Hafez, Mohamed; Samya Abd El-nabi; Gamal El-Wehedy; and Yossef Al-Tonbary. "Enhaced responce to the induction of Sister Chromatid Exchange by Gamma Radiation in Neuro-

- fibromatosis" *Cancer* 57: 1937-1940, 1986.
23. Ducatman, B.S. and B.W. Scheithauer. "Post-irradiation Neurofibrosarcoma". *Cancer* 51: 1028-1033, 1983.
 24. Knudson, Jr Alfred. "A Geneticist's View of Neurofibromatosis" *Advances in Neurology* 29: 237-242, 1981.
 25. Dichl, S.R.; Bochnka, M.; Collins, F.S. *Et al.* "Linkage analysis of peripheral Neurofibromatosis to DNA markers on Chromosome 8". *Journal Medical Genetics* 24 (9): 532-534, 1987.
 26. Palmer, C.G.; Provisor, A.J.; Weaver, D.D. *et al.* "Juvenile Chronic granulocytic leukemia in patient with trisomy 8, Neurofibromatosis and prolonged Epstein-Barr virus infection". *Journal Pediatrics* 102: 88-892, 1983.
 27. Duncan, Alessandra; Michael, Partington and Dushan Soudek. "Neurofibromatosis in a man with a Ring 22 in-situ Híbridization Studies". *Cancer Genetics and Citogenetics* 25: 169-174, 1987.
 28. Martelli, Lucia. "Estudio Clínico e Citogenético de Pacientes con Síndrome de Gorlin". Faculdade de Medicina de Ribeirao Preto USP 1986, pp. 16. Tese de Mestrado.
 29. Moorhead, P.S.; Nowell, P.C.; Mellman, W.J. *et al.* "Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood". *Experimental Cell Research* 20: 613-616, 1960.
 30. Ferrari, Íris. "Estudio de Alteracoes cromosomicas em Pacientes portadores de anomalias físicas múltiples e retardo mental". Faculdade de Medicina de Ribeirao Preto USP, 1968, Tese de Doutorado.
 31. Chicago Conference. "Standardization in Human cytogenetics" *Birth Defects*. Original Article Series New York 2(20), 1966.
 32. Paris Conference. "Standardization in human cytogenetics" *Birth Defects*. Original Article Series New York 8, 1972.
 33. Savage, J.R.K. "Clasification and relationships of induced chromosomal structural changes". *Journal of Medical Genetics* 12: 103-122, 1975.
 34. ISCN, "An International System for Human Cytogenetic Nomenclature". *Cytogenetic cell Genetics*, 66 - 69, 1985.
 35. Iijima, K.; Morimoto, K.; Koizumi, A.; *et al.* "Bleomycin-induced chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in Down lymphocyte cultures". *Human Genetics* 66: 57-61, 1984.
 36. Gebhart, E.; Schinzel, M.; and Ruprecht, K.W. "Cytogenetic Studies using various clastogens in two patients with Werner syndrome and control individuals". *Human Genetics* 70: 324-327, 1985.
 37. Berry, D.E.; Chang, L.H.; and Hecht, S.M. "DNA damage and growth inhibition in cultured human cells by bleomycin congeners". *Biochemistry* 24: 3207-3214, 1985.
 38. Fisher, L.M.; Juroda, R.; and Sakai, T.T. "Interaction of Belomycin A2 with DNA". *Biochemistry* 24: 3199-3208, 1985.