

HALLAZGOS CITOGENÉTICOS EN LA TRISOMIA 21: Correlación con datos moleculares

César Paz y Miño¹⁻², Augusta Córdova¹, Sara Gutiérrez¹,
Paola Leone¹, Ma. Serena Peñaherrera¹, Ma. Eugenia Sánchez¹.

RESUMEN

La trisomía 21 es la alteración cromosómica más común en el hombre con una incidencia en la población mundial de 1 en 700 nacidos vivos y en el Ecuador de 1 en 526, de ahí la importancia de su estudio.

En este trabajo se analiza y compila 340 casos de individuos con Síndrome de Down, que actualmente constan en el Registro Nacional Colaborativo de Alteraciones y Variantes Cromosómicas Humanas.

Para el estudio citogenético se cultivaron linfocitos T y se realizó bandeo GTG. Los resultados muestran una serie de variantes cromosómicas: 321 corresponden a trisomía simple, 12 a mosaicos, 3 son trisomías por translocación, 2 isocromosomas y 2 podrían tratarse de mosaicos no detectados en sangre periférica o de la duplicación de la región crítica (21q22), no evidenciable por técnicas de bandeo standard (400 bandas). Nuestros datos mantienen, en términos generales, una tendencia similar a la informada en la literatura. En relación a la edad materna, se encuentra un notable incremento en la incidencia del síndrome a partir de los 35 años.

Palabras Claves: Trisomía 21, región crítica (21q22), Síndrome de Down, Registro Nacional Colaborativo de Alteraciones y Variantes Cromosómicas Humanas, variantes citogenéticas, alta edad materna.

Introducción

El cromosoma 21 es el autosoma más pequeño, con apenas un 2 o/o del total del genoma humano (1), a pesar de ello tie-

ne gran significado clínico, pues su presencia trisómica causa el Síndrome de Down. Por otro lado, el hecho de que una gran parte de este cromosoma esté constituido por heterocromatina (2) hace que dicha trisomía

1. Laboratorio de Genética Humana, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Pontificia Univer-

sidad Católica del Ecuador.

2. Unidad de Genética Médica. Fundación Simón Bolívar. Quito.

sea bastante bien tolerada, pudiéndose constatar un rango de vida de más de 30 años en estos individuos, llegando hasta los 50-60 años un 25 o/o de ellos. (3).

La trisomía del cromosoma 21 es la cromosomopatía de mayor frecuencia en los seres humanos, con un rango en la población mundial que va de 1/500 a 1/1000 nacidos vivos (2); para el Ecuador, estudios epidemiológicos de este síndrome revelan una frecuencia de 1/526 (4) nacidos vivos.

Se ha observado una serie de variantes cromosómicas que dan origen al S. de Down, tales como la trisomía simple, translocaciones, isocromosomas y duplicación de la banda 21q22 (1,3); esta última variedad citogenética proporeiona un interés especial al estudio del síndrome. La caracterización citogenética del S. de Down es indispensable para la comprensión de la evolución de la enfermedad, de su pronóstico y de las características físicas y mentales del afecto, así como también servirá para proporcionar un asesoramiento genético y reproductivo a las mujeres y parejas que presenten o tengan una alta probabilidad de presentar este problema.

Está bien establecida la relación entre la edad materna avanzada y el incremento del riesgo de producción de la trisomía 21, mientras en madres menores a 25 años la frecuencia del síndrome es de 1 en 1.700 nacidos vivos, esta se va duplicando cada 4 años hasta llegar a 1 en 25 en madres sobre los 45 años (5).

El propósito del presente trabajo es analizar e informar sobre los hallazgos citogenéticos del Síndrome de Down, tanto de los datos de nuestro laboratorio como de los que conforman el Registro Nacional Colaborativo de Alteraciones y Variantes Cromosómicas Humanas (6), correlacionarlos con las edades maternas y compararlos con los datos de la literatura. A partir de los datos de recientes investigaciones, se discuten las bases genéticas y moleculares que determinan el fenotipo y patología característica

del S. Down. Así como la posible causa para la no disyunción meiotica de los gametos femeninos.

Materiales y Métodos

El estudio citogenético se realizó en sangre periférica heparinizada (0,8 cc), se cultivaron linfocitos T por 72 horas en 5 cc de medio de cultivo RPMI 1640 enriquecido con 13,5o/o de suero fetal bovino (Gibco), penicilina-estreptomicina (0,075 ml), glutamina (0,075 ml), HEPES buffer (0,025 ml), Phytohematoglutinina (10 ml) e insulina (0,1 U/ml).

Para la cosecha del cultivo se agregó 100 microlitros de colchicina, se incubó por 2 horas a 37 grados centígrados, luego se aplicó choque hipotónico con cloruro de potasio al 0,54 o/o por 20 minutos; seguido de cuatro lavados consecutivos con fijador de Carnoy (1:3 ácido acético: metanol); se extendió los cromosomas y se tiñó con Giemsa. Para la identificación de los cromosomas se realizó técnica de bandas GTG (Tripsina-Giemsa), con una resolución de 400 bandas. Un mínimo de 20 metafases fueron contabilizadas en cada caso (7), anotándose las alteraciones numéricas o estructurales existentes siguiendo la nomenclatura de ISCN (8, 9).

Los datos de trisomía 21 también fueron obtenidos de los demás casos que conforman el Registro Nacional Colaborativo de Alteraciones y Variantes Cromosómicas Humanas, que recoge la información suministrada por diferentes instituciones, laboratorios de genética, recopilaciones bibliográficas y comunicaciones personales (4, 6, 10, 11, 12).

Se analizó la frecuencia de presentación del S. Down en relación a la edad materna.

Resultados

Los datos obtenidos para la trisomía 21, se encuentran distribuidos según

Cuadro 1.— *Hallazgos de acuerdo al tipo de variante citogenética en individuos con Síndrome de Down.*

Tipo de Variante Citogenética	Número	Porcentaje
Trisomía simple	321	94,4
Mosaico	12	3,5
Translocación:		
Simple	2	0,6
Mosaico	1	0,3
Isocromosoma	2	0,6
Mosaico no detectado (?) o duplicación 21q22 (?)	2	0,6
Total de casos	340	100

los diferentes tipos de alteraciones cromosómicas en el cuadro 1, se observa que la aberración más frecuente es la trisomía simple o primaria en un 94,4 o/o de los casos, seguida de las otras variantes que se mantienen en un porcentaje menor: 3,5 o/o para los mosaicos, 0,9 o/o para el total de las translocaciones, y en un 0,6 o/o para los isocromosomas, así como para los casos en que pudieran tratarse de mosaicos no detectados en sangre periférica o de la duplicación de la

banda 21q22, esta última alteración no puede ser evidenciada a través de la técnica de bandeado estándar empleada en nuestro laboratorio, que permite una resolución únicamente de hasta 400 bandas.

El análisis de las edades maternas de los individuos con S. Down, se presenta en el cuadro 2, los datos indican un mayor número de afectados en madres comprendidas entre los 30-40 años, así como un gran incremento en la incidencia del síndrome a partir de los 35-39 años.

Cuadro 2.— *Número de casos con trisomía 21 y tasa de fecundidad de acuerdo a grupos etarios.*

Grupo de Edad	o/o casos afectos	Tasa fecundidad (o/o) CEPAR (30)	Prevalencia Jackson, (1979) (5)
15 - 19	8,0	9,8	1/1.667
20 - 24	12,0	23,4	1/1.587
25 - 29	18,0	23,7	1/1.087
30 - 34	20,6	19,9	1/763
35 - 39	18,0	14,0	1/248
40 - 44	16,6	7,4	1/79
45 -	6,6	1,8	1/24

Discusión

La trisomía 21 puede ser fruto de un evento de no disyunción tanto en los gametos parentales dando lugar a trisomía primaria (el 95 o/o de los casos), como en una línea celular somática en los casos de mosaïcismo (en el 1-20/o) (2,5), confrontados en nuestro estudio con un 94,4 o/o y 3,5 o/o en el primero y segundo casos, respectivamente.

Un segundo mecanismo de formación se refiere a un fenómeno de translocación (principalmente del tipo robertsoniano), en el que una parte del cromosoma 21 se unirá a otro cromosoma, usualmente al 13, 14, 15, 21 o 22 (3), translocación que podrá ser de novo o heredada de un parental (5). Esta se presenta en un 3,5 o/o en la literatura y en un 1,5 o/o en nuestro análisis.

Una tercera causa para el apareamiento de la trisomía 21, es la formación de isocromosomas por un fenómeno de misdivisión. En estos casos es indispensable realizar un estudio cromosómico familiar con el objetivo de descartar una translocación 21; 21 (2).

Por último, casos que presentan características físicas propias de la trisomía 21, en que se piensa son mosaicos no detectados en sangre periférica o individuos que presentan duplicación de una sola banda del cromosoma 21, la 21q22, evidenciable únicamente por técnicas moleculares, tales como la hibridación in situ, o a través de técnicas de bandeado de alta resolución, hasta 1.200 bandas. Esta banda crítica parece ser la responsable de todo el fenotipo característico del síndrome (2, 3, 13). En esta región 21q22, se han detectado, hasta el año 1990, más de 16 genes la mayoría de los cuales están implicados en la patología del S. Down (1, 3, 13, 14, 15).

Algunos de estos genes han sido localizados en la sub-banda 21q22.1:

- Gen SOD 1, que codifica para la enzi-

ma Superóxido dismutasa (en su forma soluble), cuya alteración en los niveles de expresión contribuirá al apareamiento del retraso mental y explicará la acelerada tasa de envejecimiento.

- Genes GARTF (glucínamida ribonucleotido transformilasa), PRGS (phosphoribosylglucínamida sintetasa) y PAIS (phosphoribosylaminoimidazole sintetasa), para tres enzimas implicadas en la biosíntesis in novo de purinas, que constituirán una proteína multifuncional codificada aparentemente por un mismo locus. La presencia en triplicado de éste gen incrementa el nivel de purinas en la sangre, fenómeno que está asociado con el retraso mental.

En la sub-banda q22.3, constan los genes:

- Oncogenes y genes asociados a tumor; el oncogen ETS2, localizado cerca del punto de rotura 21q22, está involucrado en la translocación 8;22 asociada a la leucemia mielóide aguda (AML). La presencia de éste oncogen está probablemente relacionada con una incidencia incrementada de leucemia. El gen estrógeno estimulado BCE1, está también potencialmente asociado a malignidad.

- Gen PFKL, codifica para una de las formas de la fosfofructoquinasa cuya actividad es expresada en el cerebro durante el desarrollo pre y post natal, lo que talvez ayudaría a explicar la microcefalia y el grosor disminuido de la capa cortical cerebral así como el severo retraso mental.

- Gen CBS, para la Cistationina B-sintetasa, cuyo incremento en la expresión se ha especulado provocará la sobreproducción de cistationina y cisteína, lo que perturbará los mecanismos específicos de metilación. Esto podría provocar que genes activos poco metilados por error se inactiven debido a un mayor nivel de metilación, y que genes que deban estar altamente metilados y consiguientemente inactivos pierdan su grado de metilación y lleguen a expresarse, lo que de alguna manera influiría en el fenotipo.

— Gen CRYA1, para la Alfa-A-cristalina, componente protéico estructural del ojo, cuya expresión anormal aumentará el riesgo de apareamiento de cataratas y defectos en el cristalino.

— Genes CO16A1 y CO16A2 que codificarán también para proteínas encontradas en el ojo (colágeno tipo VI alpha 1 y alpha 2).

— Gen CD18 para la molécula de adhesión leucocitaria causando problemas inmunológicos a los cuales son propensos los individuos afectos.

Otros genes que han podido ser localizados en regiones más amplias del cromosoma son:

— Gen APP para el precursor de la proteína Beta amiloide, componente mayor de las placas neurofibrilares presentes en el cerebro de los individuos con demencia y neuropatología presente comúnmente en personas con trisomía 21 de edad avanzada, mapeado en la banda q21.05—q21.105.

— Gen AD1 para la enfermedad de Alzheimer 1, mal que afecta al 100 o/o de los casos con S. Down pasados los 35 años (13, 16). Se encuentra en la región q11.2—q21.2.

— Genes 1FNRA, 1FNRB, para los receptores de interferón Alpha y Beta, que jugarán un papel importante en la disfunción del sistema inmune comúnmente asociada con el síndrome de Down, están en la región q21—qter.

Una serie de trabajos recientes (16, 18) delimitan la "región crítica" o "región del síndrome de Down" ya no a toda la banda 21q22, sino simplemente a las sub-bandas 21q22.2—21q22.3, cuya presencia en triplicado provocará rasgos fenotípicos faciales anormales (epicanto, fisuras palpebrales hacia arriba, puente nasal ancho, boca abierta, macroglosia), defectos cardíacos congénitos, clinodactilia del quinto dedo, braquidactilia y cambios dermatoglíficos, aún con actividad normal de los genes

SOD-1 y APP mapeados en la sub-banda 21q22.1. Esto podría explicar de alguna manera las variaciones fenotípicas interindividuales de ciertos enfermos de S. Down.

Por otro lado, se ha descrito la presencia de un agrupamiento ("cluster") de genes para RNA ribosomal (1, 13, 16), que se encuentra en la constricción secundaria del brazo corto 21p12, asociado a las regiones de organización nucleolar (NOR), cuya variante dNOR (doble NOR) se presume jugará un papel importante en la promoción de eventos de no disyunción en la meiosis (13), predisponiendo a los sujetos a producir descendencia con alteraciones en el número de copias de cromosomas 21. Se propone que existiría una tendencia de los genes ribosomales para involucrarse en recombinaciones cromosómicas no homólogas a través de la formación de cromosomas dicéntricos, que llevarán a la no disyunción meiótica. A pesar de esto, datos posteriores muestran que marcadores de cromosomas acéntricos, tales como los dNOR, no contribuirían a la etiología de la no disyunción (19). Este aspecto aún queda por dilucidar.

Hoy se ha logrado determinar la procedencia del cromosoma 21 extra, mediante el uso de sondas de ADN y RFLPs (20, 21, 22). Con estas pruebas se ha visto que el cromosoma 21 extra se origina en la primera división meiótica materna en el 61,2 o/o, en la segunda división en el 19,1 o/o; en la primera división meiótica paterna en el 12,3 o/o, y en la segunda división en un 7,4 o/o de los casos (23). A pesar de la discordancia, únicamente se ha visto una clara relación de la mayor incidencia de la trisomía 21 con la edad materna, más no con la edad del padre; Hassold y Chiu (1985) proponen que en mujeres mayores de 40 años el 30 o/o de todas las concepciones reconocidas son trisómicas (24).

Ya que la no disyunción es la primera causa de formación de la trisomía, se ha planteado que esta se origina de la alteración en la estructura o función del huso

acromático durante la mitosis y meiosis (25). Polani (1981), propuso que esta disfunción al final de la edad reproductiva de la mujer es debida a la acumulación gradual de anomalías en el oocito durante su larga estancia en la primera profase de meiosis. Estudios posteriores plantean que será bien la proximidad a la menopausia y no la edad cronológica del oocito, la que afectará la dinámica del ensamblaje y desensamblaje de los microtúbulos y consecuentemente la tasa de separación y segregación cromosómica (25, 26). Sánchez Cascos (1185) (27), resume otras de las principales teorías enunciadas sobre la posible causa de la no disyunción:

— Teoría de la disgenesia ovular (Henderson-Edwards) propone que se ovularán primero las células dotadas de más quiasmas, mientras que las con menos quiasmas y más fácilmente disgenésicas serán las últimas en ser ovuladas. En ausencia de recombinación genética y formación de quiasmas, los cromosomas homólogos se disocian en el Diploteno (cuando el complejo sinaptonémico desaparece) y frecuentemente da lugar a la no disyunción en la anafase de la primera división meiótica (28).

— Teoría de sobremaduración ovular en la que pasadas las 12 horas de vida el óvulo empieza a degenerar rompiéndose los filamen-

tos del huso acromático. Esta teoría no tendría en realidad relación con la edad materna pues la fecundación tardía podría darse tanto en parejas jóvenes como en parejas añosas.

— Teoría de la selección relajada planteada por Hook dice que la producción de anolías no varía con la edad de la madre, sino que habría una más fácil retención de un embrión trisómico a medida que aumenta la edad materna.

Nuestras datos muestran un notable incremento de la incidencia del Síndrome de Down en el grupo de edad comprendido entre los 35-39 años en adelante, lo que concuerda con datos de otros estudios (2, 5, 29), apoyados, además, por las hipótesis planteadas sobre posibles causas de la nodisyunción.

Finalmente, el S. de Down tiene una trascendental importancia en la práctica médica y biológica humana. Su caracterización citogenética posibilitará un mejor conocimiento de la evolución y pronóstico de los individuos afectos, como también será de gran interés para el asesoramiento genético a parejas con este problema y a la población de riesgo. Este conocimiento servirá para una planificación adecuada de acciones de genética poblacional y diagnóstico prenatal.

ABSTRACT

Trisomy 21 is the most common chromosomal abnormality in man, the world incidence of this syndrome is 1/700 liveborns and in Ecuador the incidence is 1/526.

In this work 340 cases of individuals with Down Syndrome are analyzed and compiled; they are part of the National Collaborative Registry of Human Chromosomal Variants and Anomalies.

For the cytogenetic study, T Lymphocytes were cultivated and GTG banding was carried out. The results show some chromosomal variants: 321 are primary trisomies, 12 are mosaïcisms, 3 are trisomies due to a translocation, 2 are isochromosomes and 2 could be either undetected peripheral blood mosaïcism or the duplication of the critical region (21q22), that can not be evidenced by standard banding techniques (400 bands). Our data show a similar tendency with those reported in literature. We found a significant increase in the incidence of Down

Syndrome in women aged 35 years and older.

Key words: Trisomy 21, Critical Region (21q22), Down Syndrome, National Collaborative Registry of Human Chromosomal Variants and Anomalies, cytogenetic variants, high maternal age.

Referencias Bibliográficas

1. Stewart, G.D., Van Keuren, M.L., Galt, J., Kurauchi, S. and Buraczynska M.J.: Molecular structure of Human chromosome 21. *Annu Rev Genet* 23: 409-423, 1989.
2. Therman, E.: *Human Chromosomes*. New York Library of Congress Cataloging in Publication Data, 1986, pp. 53-54, 203.
3. Patterson, D.: The Causes of Down Syndrome. *Scientific American* 255:52-60, 1987.
4. Varas, C.: Malformaciones congénitas en recién nacidos y estudio cromosómico en polimalformados. *Tesis de Licenciatura*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, 1990.
5. Jackson, L.G. and Schmike, R.N.: *Clinical Genetics*. Canada, Wiley Medical, 1979, pp. 52-55.
6. Paz y Miño, C., Sánchez, M.E., Córdova, A., Gutiérrez, S., Leone, P., Peñaherrera, M.S. y Santillán, S.: Registro Nacional de Alteraciones y Variantes Cromosómicas Humanas. *Investigación y Ciencia*. 3: 1991 (en prensa).
7. Knutsen, T. Bixenman, H. Lawce, H. and Martin, P.: Chromosome Analysis Guidelines Preliminary Report. *Karyogram* 15 (6): 131-135, 1989.
8. ISCN: *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. Report of the Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. New York, S. Karger - Medical and Scientific Publishers, 1985.
9. Moorhead, P.S.: Chromosome Preparation of Leukocytes Cultured from Human Peripheral Blood. *Exptl Cell Res*. 10: 613, 1960.
10. Santillán, S.: Análisis Clínico y Citogenético del Síndrome de Down. *I Congreso Nacional de Ciencias*. Libro de Resúmenes. Quito, s.c., 1987, p. 153.
11. Huiracocha, J.H.: *Frecuencia de las enfermedades genético-hereditarias en el área de Pediatría del Hospital "Vicente Corral Moscoso" de Cuenca de 1982 a 1987*. Trabajo presentado en: I Encuentro Nacional de Investigación en Ciencias de la Salud, Cuenca, 1987.
12. Paz y Miño, C., Sánchez, M., Córdova, A., Gutiérrez, S., Leone, P., Peñaherrera, M. y Santillán, S.: Registro de Alteraciones y Variantes Cromosómicas. *Revista del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud* 6 (2): 1991 (en prensa).
13. Watkins, P.C., Tanzi, R.E., Cheng, S.V. and Gusella, J.F.: Molecular Genetics of Human Chromosome 21. *Journal of Medical Genetics* 24: 257-270, 1987.
14. Gardiner, L., Aissani, B. and Bernardi, G.A.: Compositional Map of Human Chromosome 21. *The EMBO Journal* 9: 1853-1858, 1990.
15. Serra, A. y Neri, G. Trisomy 21: Conference Report and 1990 Update. *Am J Med Genet Supplement* 7:11-19, 1990.
16. Korenberg, J.R., Kawashima, H., Pulst, S.M., et al Molecular Definition of a Region of Chromosome 21 That Causes Features of the Down Syndrome Phenotype. *Am J Hum Genet*. 47: 236-246, 1990.
17. Korenberg, J.R., Kawashima, H., Pulst, S.M., Allen, L., Magenis, E. y Epstein, C.J. Down Syndrome: Toward a Molecular Definition of the Phenotype. *Am J Med Genet Supplement* 7:91-97, 1990.
18. Pellissier, M.C., Laffage, M., Philip, M., Passage, E., Mattei, M.G. y Mattei, J.F. Trisomy 21q33 and Down's Phenotype correlation evidenced by in situ hybridization. *Hum Genet* 80: 277-281, 1988.
19. Spinner, N.B., Eunpu, D.L., Schimickel, R.D., et al The Role of Cytologic NOR Variants in the Etiology of Trisomy 21 *Am J Hum Genet* 44:631-638, 1989.
20. Dagna-Bricarelli, F., Pierluigi, M., Grasso, M.,

- Arslanian, A. y Sacchi, N. High Efficiency in the Attribution of Parental origin of Non-distribution in Trosomy 21 by Both Cytogenetic and Molecular Polymorphisms. *Hum Genet* 79: 124-127, 1988.
21. Rudd, N.L., Dimnik, L.S., Greetree, C., Mendes-Crabb, K. y Hoar, D.I. The Use of DNA Probes to Establish Parental Origin in Down Syndrome. *Hum Genet* 78: 175-178, 1988.
 22. Galt, J., Boyd, E., Connor, J.M. y Ferguson-Smith, M.A. Isolation of Chromosome-21-specific DNA Probes and their Use in the Analysis of Nondisjunction in Down Syndrome. *Hum Genet* 81: 113-119, 1989.
 23. Dagna-Bricarelli, F., Pierluigi, M., Grasso, M., Strigini, P. y Perroni, L. Origin of Extra Chromosome 21 in 343 Families: Cytogenetic and Molecular Approaches. *Am J Med Genet Supplement* 7: 129-132, 1990.
 24. Hassold, T. y Chiu, D. Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. *Hum Genet* 70: 11-17, 1985.
 25. Dotan, A. y Avivi, L. Increased spindle resistance to antimicrotubule agents in women of high risk for meiotic nondisjunction. *Hum Genet* 73: 199-204, 1986.
 26. Avivi, L., Dotan, A., Ravia, Y., Amiel, A., Shacham, H. y Nwumman, Y. Increased spindle resistance to antimicrotubule agents in cells prone to chromosomal nondisjunction. *Hum Genet* 83: 165-170, 1989.
 27. Sánchez Cascos, A.: *Genética Cardiovascular* Madrid, Jaroyo Editores S.A., 1985, pp. 13-14.
 28. Roeder, S.G. Chromosome Synapsis and Genetic Recombination. *Reviews TIG*. 6 (12): 386-389, 1990.
 29. Dexeus, S., Carrera, J.M., Alegre, M., Salvador, C. y Solé, M.Y. *El riesgo de nacer: El desafío de nacer* Barcelona, Ed. Labor, 1989, pp. 82-84
 30. CEPAR. Ecuador: *Compendio Estadístico sobre la mujer*. Artes Gráficas Señal, Quito, 1985, pp. 30 - 31. sobre la mujer. Artes Gráficas Señal,
 30. CEPAR. Ecuador: *Compendio Estadístico sobre la mujer*. Artes Gráficas Señal, Quito, 1985, pp. 30 - 31.