

Principales factores que producen fragilidad cromosómica transitoria en los pacientes referidos para estudio citogenético

Gloria Escribano R., Silvia Castillo T., Vera Daher N., Samuel Salazar C., Lorena Tobella P.

Sección Genética, HCUCh.

SUMMARY *The fragile sites are specific loci that show fractures during karyotyping perform under specific laboratory conditions. Are present in normal individuals and are classified by their population frequency. These sites have been associated with an increase in chromosome fragility, fractures and other chromosomal abnormalities. In recent years, the fragile sites have taken great importance because they represent regions in the genome that are particularly sensitive to replicative stress and are frequently rearranged in tumor cells. Multiple risk factors endogenous and exogenous have been involved in the increase in chromosome fragility, including microorganisms, drugs, illegal drugs and toxins. The fragile sites have provided insight into understanding of the effects of replicative stress on DNA damage and genomic instability in cancer cells. In this work we aim to summarize the limited information available about the topic, and the clinical significance of fragile sites in vivo in the laboratory.*

INTRODUCCIÓN

Los sitios frágiles son los cromosómicos específicos y heredables, susceptibles a presentar *gaps* o fracturas cuando el cromosoma es expuesto a inhibición parcial de la replicación del ADN (ácido desoxirribonucleico). Constituyen áreas de cromatina que no se compactan apropiadamente durante la mitosis debido a que presentan una replicación más tardía que el resto del cromosoma⁽¹⁾. Se heredan de forma codominante (es decir, ambos alelos se expresan en el fenotipo) y su ubicación es la misma en todas las células de un individuo o de

una familia. La primera descripción de ellos fue en 1965 en células de una mujer previamente irradiada. Al momento según el Genoma Database se han identificado más de 130 sitios frágiles distintos⁽²⁾.

Los sitios frágiles se clasifican basados en su frecuencia poblacional en tres grupos principales:

- 1. Raros:** que están presentes en un individuo por varios cientos de personas. Podrían ser exclusivos de la familia del paciente y no presentarse en otros grupos.

2. Intermedios: de los cuales existen dos más frecuentes en una población determinada.

fra (10q25) 2,5% de los individuos

fra (16q22) 1 – 5% de los individuos

3. Comunes: son universales y forman parte de la arquitectura cromosómica normal; por lo tanto, todos los individuos los portamos de forma normal en nuestros cromosomas.

Sólo los sitios frágiles raros e intermedios se clasifican como variantes cromosómicas.

Los sitios frágiles comunes no varían; se diferencian en la proporción de metafases en las cuales pueden verse en un individuo entre un 0 y un 20%⁽³⁾. A su vez, estos sitios frágiles se subdividen basados en la inducción química específica que los produce y que permiten su visualización microscópica en el laboratorio.

Los sitios frágiles comunes son inocuos. En algunos estudios, los de frecuencia intermedia o rara, se han descrito asociados con malformaciones congénitas, anomalías cromosómicas esporádicas y mayor predisposición a enfermedades malignas.

Existe evidencia de que estas regiones tienen relación con los rearrreglos cromosómicos producidos en tumores sólidos.

Después de la inducción *in vitro*, los sitios frágiles se ven envueltos en la formación de deleciones y translocaciones, intercambio de cromátidas hermanas, amplificaciones e integración de plásmidos⁽⁴⁾.

No existe una relación aparente entre los sitios frágiles comunes y el retraso mental. Sin embargo, dos sitios frágiles del cromosoma X son los responsables del síndrome de X frágil, la segunda causa más importante de retraso mental después del síndrome de Down.

Con esta revisión bibliográfica se pretende exponer de forma clara y sencilla los múltiples y complejos factores que pueden alterar la evaluación en el laboratorio de citogenética, y producir dificultades en el diagnóstico de los pacientes.

SÍNDROME DE X FRÁGIL

Los sitios frágiles del cromosoma X, Xq27.3 denominado FRAXA y Xq28 FRAXE, son los causantes de un cuadro patológico caracterizado principalmente por retraso mental y rasgos faciales característicos⁽⁵⁾.

Se debe a una mutación dinámica que produce expansión del triplete CGG. Según la cantidad de repeticiones que se tenga de este triplete se presentarán los fenotipos en los pacientes⁽⁶⁾. (Tabla 1)

Todos los inductores de fragilidad comparten la capacidad de inhibir la elongación de la replicación del ADN, por medio del bloqueo de las distintas partes del sistema de replicación.

FACTORES IMPLICADOS EN LA FRAGILIDAD CROMOSÓMICA

I. Patógenos

Son microorganismos que liberan exotoxinas y/o endotoxinas que actúan como químicos mutagénicos capaces de aumentar la cantidad de alteraciones cromosómicas en sangre periférica. A esto se suman las respuestas inmunológicas del organismo a la infección, lo que produce una mayor liberación de radicales libres de oxígeno y otras moléculas con capacidad de dañar el ADN. Se ha relacionado a dos bacterias: *Mycobacterium tuberculosis* (Gopal *et al* 1990,1991; Jaju *et al* 1983; Ekmekci 1995) y *Mycobacterium lepra* (de Souza, Thomas 1988) y a dos virus: virus hepatitis A y B (Chatterjee, Ghosh 1989) como capaces de inducir daño en el ADN y por tanto, aumentar la fragilidad cromosómica *in vivo*. No existen estudios más recientes que avalen estos hallazgos.

Tabla 1. Significado clínico de la expansión del trinucleótido CGG en el gen FMR1

Repeticiones	Categoría	Significado clínico
5 – 40	normal	Sin importancia clínica
41-58	rango intermedio	Zona gris: sin importancia clínica conocida hasta el momento
59-200	premutación	Portador X frágil En mujeres falla ovárica prematura En hombres ataxia
>200	mutación	Retraso mental Síndrome X frágil

Gen FMR1: *Fragile Mental Retardation 1*

(Adaptado de: The fragile X syndromes. En: Mc Kinlay R, Sutherland G. Chromosome abnormalities and genetic counseling. New York: Oxford University Press, 2004; 220)

II. Fármacos con acción genotóxica

Se han estudiado múltiples fármacos para conocer su capacidad de aumentar la fragilidad cromosómica y por tanto, de causar inestabilidad genética.

Existen estudios que relacionan a drogas antituberculosas⁽⁷⁾, derivados de nitroimidazol (metronidazol)⁽⁸⁾, benzodiazepinas⁽⁹⁾, quimioterapéuticos y drogas alquilantes (ciclofosfamida)⁽¹⁰⁾ con un aumento en la fragilidad cromosómica.

Otros medicamentos que producen aumento de la fragilidad cromosómica *in vitro*⁽¹¹⁾ se encuentran en estudio actualmente para corroborar o descartar alteraciones cromosómicas *in vivo*. (Tabla 2)

1. Drogas alquilantes

En pacientes con distintas indicaciones para tratamiento con drogas alquilantes (inmunosupresores) que recibieron altas dosis por períodos prolongados de tiempo, se encontró aumento de alteraciones cromosómicas⁽¹²⁾ que incluía deleción del brazo largo del cromosoma 5⁽¹³⁾. En el brazo

Tabla 2. Fármacos de uso común que aumentan la fragilidad cromosómica *in vitro*

Fármaco	Grupo farmacológico	Alteración citogenética
Furosemida	diurético de asa	produce alteraciones cromosómicas en linfocitos <i>in vitro</i>
Nimodipina	antagonista del calcio	aumenta la cantidad de micronúcleos
Eprosartan	IECA	produce alteraciones cromosómicas en linfocitos <i>in vitro</i>
Hidralazina		aumenta la cantidad de SCE
Diazepam	benzodiazepina	Micronúcleos
Oxacepam	benzodiazepina	Micronúcleos

IECA: Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina. **SCE:** Intercambio de cromátidas hermanas.

(Adaptado de: López Nigro MM, Palermo AM, Mudry MD, Carballo MA. Cytogenetic evaluation of two nitroimidazol derivatives.

Toxicol in Vitro 2003;17:35-40 / Brambilla G. Carrozzino R, Martelli A. Genotoxicity and carcinogenicity studies of benzodiazepines.

Pharmacol Res 2007;56:443-58 / Brambilla G. Martelli A. Genotoxicity and carcinogenicity studies of antihypertensive agents. Mut Res 2006;612:115-49).

largo del cromosoma 5 están presentes genes que codifican para diversos factores de crecimiento y reguladores de acción de oncogenes. La pérdida de esta información podría explicar por qué estos pacientes desarrollan síndromes mielodisplásicos⁽¹⁴⁾.

Los cambios en el cariograma serían secundarios a altas dosis acumulativas de los fármacos, los más frecuentemente observados son fracturas cromatídicas^(15;16). En la literatura se recomienda un seguimiento con monitorización hematológica en pacientes que reciban este tipo de tratamiento.

2. Tratamiento antineoplásico

Seis meses después de finalizado el tratamiento combinado de quimioradioterapia en pacientes con linfoma de Hodgkin, persiste daño cromosómico en el individuo. Estos cambios en el genoma podrían ser la causa de la activación de oncogenes y explicar el posterior desarrollo de una enfermedad maligna secundaria en estos pacientes⁽¹⁷⁾.

III. Tóxicos con acción clastogénica

Los clastógenos son agentes físicos o químicos capaces de producir daño del ADN. Se conoce que existen tóxicos que pueden aumentar la fragilidad cromosómica⁽¹⁸⁾: uno de ellos es la dioxina⁽¹⁹⁾. El candidato presidencial ucraniano Victor Yushchenko sufrió envenenamiento con dioxina en el año 2004, provocándole severas lesiones cutáneas, pancreáticas y hepáticas. Las drogas ilegales como la heroína, la cocaína y la marihuana pueden causar aumento de la fragilidad cromosómica⁽²⁰⁾. Los efectos de la radiación ionizante⁽²¹⁾ son ampliamente reconocidos a partir de la caída de la bomba atómica en Hiroshima el 6 de agosto de 1945.

IV. Condiciones del paciente que podrían aumentar la fragilidad cromosómica

La anemia perniciosa producida por el déficit de vitamina B12 y el déficit severo de folato también se han visto relacionados con una fragilidad cromosómica aumentada en estos pacientes⁽²²⁾.

V. Síndromes de alteraciones de la reparación del ADN

Por último, no hay que olvidar dentro del diagnóstico diferencial de la fragilidad cromosómica aumentada que existen diversos cuadros que se caracterizan por alteraciones en la reparación del material genético⁽²³⁾.

Estos síndromes tienen fenotipos característicos que generalmente permiten la sospecha diagnóstica inicial. Se confirman al realizar cariogramas con técnicas especiales para inducir la fragilidad con distintos químicos o radiación ionizante y confirmar el diagnóstico.

Dentro de estos síndromes se encuentran: anemia de Fanconi⁽²⁴⁾, ataxia-telangiectasia⁽²⁵⁾, síndrome de Bloom⁽²⁶⁾ y síndrome de Nijmegen⁽²⁷⁾.

EXÁMENES CITOGENÉTICOS

I. Estudio del síndrome de X frágil

Para el análisis de la presencia de sitios frágiles (X frágil) se realiza cultivo de los linfocitos del paciente en medios con cantidad reducida o ausencia total de ácido fólico. También se puede estudiar en un medio con cantidad normal de ácido fólico agregando un antagonista de folatos, que induce la fragilidad cromosómica⁽²⁸⁾. Sin embargo, actualmente es más útil realizar estudio molecular de ampliación del triplete CGG a los pacientes con

sospecha de síndrome de X frágil, en vez de los métodos descritos anteriormente, debido a que requiere menor tiempo, tiene menor costo y además tiene más de 99% de probabilidad de detectar la mutación⁽²⁹⁾.

II. Estudios para medir genotoxicidad

Se utilizan tres técnicas en el laboratorio para medir el efecto de los factores clastogénicos en los cromosomas:

1. Micronúcleos

Es una técnica citogenética rápida y sensible para evaluar el daño cromosómico en linfocitos humanos⁽³⁰⁾. Se originan de fragmentos cromosómicos o cromosomas completos que durante la mitosis no fueron incluidos en el núcleo de la célula hija. Estos fragmentos que son consecuencia de la fractura cromosómica, se retrasan y fallan en su incorporación durante la mitosis⁽³¹⁾.

Individuos normales tienen micronúcleos en un 5-6% de las células examinadas. Individuos con sitios frágiles de frecuencia intermedia pueden tener micronúcleos en un 12-15%.

La técnica citogenética consiste en frenar el proceso de división celular cuando la célula sólo haya sufrido una división mitótica; para ello se desarrolló la técnica del bloqueo de la citocinesis (CBMN: *cytokinesis-block micronucleus*)^(32;33).

En esta técnica se utiliza citocalasina B, una molécula aislada del hongo *Helminthosporium dematoidium* que es capaz de inhibir la polimeración de la actina, proteína fundamental que conforma junto con la miosina el anillo contráctil necesario para la partición celular en telofase mitótica. Al hacer esto impide la citocinesis al inhibir la formación del anillo⁽³⁴⁾.

2. Intercambio de cromátidas hermanas (SCE *sister chromatide exchange*)

Es la manifestación citológica de intercambio entre los productos de replicación del ADN, secundaria a la reparación por una agresión endógena o exógena. Implica intercambio recíproco de material cromosómico⁽³⁵⁾. Permite evaluar la respuesta celular a la exposición a diversos químicos. La técnica se basa en incorporar BrdU (5-bromo-deoxiuridina) un análogo de la timidina, nucleósido formado por la unión de timina con un anillo de deoxirribosa, en el que un átomo de bromo reemplaza al grupo metilo en la posición 5' de la timina, en los cromosomas en replicación lo que permite visualizar los segmentos recién replicados del ADN^(35,36).

3. Alteraciones cromosómicas

Secundarias a diferentes agentes clastogénicos, son variadas desde un fragmento cromosómico acéntrico - es decir, sin centrómero - hasta una fractura de ambas cadenas del ADN (bicatenaria) resultando en la formación de un cromosoma en anillo^(37,38).

Se utiliza una técnica citogenética tradicional de tinción con Giemsa y se analizan aproximadamente 100 a 300 metafases por paciente^(39,40).

CONCLUSIÓN

Se describen los factores conocidos actualmente que podrían aumentar la fragilidad cromosómica *in vivo* en los pacientes que no portan síndromes de fragilidad cromosómica que la justifiquen, y los factores que aumentarían esta fragilidad *in vitro* en el laboratorio de citogenética.

El aumento de la fragilidad cromosómica tanto *in vivo* como *in vitro* tiene gran importancia debido a que causa dificultad en la evaluación e interpretación de los resultados.

La información científica al respecto la mayoría de veces es contradictoria, además es escasa, existiendo unas pocas publicaciones respaldadas científicamente que permitan un análisis; sin embargo, su importancia radica en que se ha implicado al aumento de fragilidad cromosómica *in vivo* a un riesgo mayor de alteraciones estructurales cromosómicas que podrían ser acumulativas y por ende, producir inestabilidad del material genético.

Es necesario que se realicen más estudios con validez científica para saber con certeza si esta inestabilidad puede o no producir neoplasias a corto y largo plazo.

La fragilidad cromosómica incrementada *in vitro* puede dificultar el diagnóstico citogenético en el laboratorio; por esto es necesario conocer cuáles son los sitios frágiles cromosómicos normales, para diferenciarlos en el microscopio de sitios frágiles que nos obliguen a descartar la presencia de factores exógenos y/o endógenos que alteren la estabilidad cromosómica y con ello el resultado que se entrega al clínico que solicita el examen.

La fragilidad cromosómica incrementada *in vitro* puede dificultar el diagnóstico citogenético en el laboratorio; por esto es necesario conocer cuáles son los sitios frágiles cromosómicos normales, para diferenciarlos en el microscopio de sitios frágiles que nos obliguen a descartar la presencia de factores exógenos y/o endógenos que alteren la estabilidad cromosómica y con ello el resultado que se entrega al clínico que solicita el examen.

REFERENCIAS

1. Durkin S, Glover T. Chromosome fragile sites. *Annu Rev Genet* 2007;41:169-92.
2. Lukusa T, Fryns J. Human chromosome fragility. *Biochim Biophys Acta* 2008;1779:3-16.
3. Variant chromosomes and abnormalities of no phenotypic consequence. En: Mc Kinlay R, Sutherland G. *Chromosome abnormalities and genetic counseling*. New York: Oxford University Press, 2004; 233-46.
4. Natarajan A. Chromosome aberrations: past, present and future. *Mutat Res* 2002;504:3-16.
5. The fragile X syndromes. En: Mc Kinlay R, Sutherland G. *Chromosome abnormalities and genetic counseling*. New York: Oxford University Press, 2004;218-32.
6. Kniffin C. Fragile X mental retardation syndrome. OMIM 2007. Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov (Consultado el 18 de abril de 2008).
7. Masjedi M, Heidary A, Mohammadi F, Velayati A, Dokouhaki P. Chromosomal aberrations and micronuclei in lymphocytes of patients before and after exposure to anti-tuberculosis drugs. *Mutagenesis* 2000; 15:489-94.
8. López Nigro M, Palermo A, Mudry M, Carballo M. Cytogenetic evaluation of two nitroimidazol derivatives. *Toxicol in Vitro* 2003;17:35-40.
9. Brambilla G, Carrozzino R, Martelli A. Genotoxicity and carcinogenicity studies of benzodiazepines. *Pharmacol Res* 2007;56:443-58.
10. Schwartz JL. Monofunctional alkylating agent-induced S-phase dependent DNA damage. *Mutat Res* 1989;216:111-8.
11. Brambilla G, Martelli A. Genotoxicity and carcinogenicity studies of antihypertensive agents. *Mutat Res* 2006;612:115-49.
12. Drablos F, Feyzi E, Aas PA, Vaagbø CB, Kavli B, Bratlie MS *et al.* Alkylation damage in DNA and RNA repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair (Amst)* 2004;3:1389-1407.
13. Pedersen BJ, Andersen MK, Andersen MT, Christiansen DH. Genetics of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2008;22:240-8.
14. Mc Carthy C, Sheldon S, Ross C, Mc Cune J. Cytogenetic abnormalities and therapy related myelodysplastic syndromes in rheumatic disease. *Arthritis Rheum* 1998;41:1493-6.

15. Yabe M, Yabe H, Hamanoue S. In vitro effect of fludarabine, cyclophosphamide, and cytosine arabinoside on chromosome breakage in Fanconi anemia patients: Relevance to stem cell transplantation. *Int J Hematol* 2007;85:354-61.
16. Sanderson BJ. Mutagenic damage to mammalian cells by therapeutic alkylating agents. *Mutat Res* 1996;355:41-57.
17. Bilban-Jakopin C, Bilban M. Genotoxic effects of radiotherapy and chemotherapy on circulating lymphocytes in patients with Hodgkin's disease. *Mutat Res* 2001;497:81-8.
18. Kaina B. Mechanisms and consequences of methylated agents-induced SCEs and chromosomal aberrations: a long road travelled and still a far way to go. *Cytogenet Genome Res* 2004;104:77-86.
19. Revazova J, Yurchenko B, Katosova L, Platonova V, Sycheva L, Khripach L *et al.* Cytogenetic investigation of women exposed to different levels of dioxins in Chapaevsk town. *Chemosphere* 2001;43:999-1004.
20. Li J, Lih-Fang L. Genetic toxicology of abused drugs: a brief review. *Mutagenesis* 1998;13:557-65.
21. Byrne J. Long-term genetic and reproductive effects of ionising radiation and chemotherapeutic agents on cancer patients and their offspring. *Teratology* 1999;59:210-5.
22. Chintagumpala M, Dreyer A, Steuber C, Coolay L. Pancytopenia with chromosomal fragility: vitamin B12 deficiency. *J Pediatr Hematol Oncol* 1996;18:166-70.
23. Kastan MB. DNA damage responses: mechanisms and roles in human disease 2007. *Mol Cancer Res* 2008;6:517-24.
24. Taniguchi T. Fanconi anemia. *GeneReviews* 2008. Disponible en: www.geneclinics.org (consultado el 7 de junio de 2008).
25. Gatti R. Ataxia telangiectasia. *GeneReviews* 2005. Disponible en: www.geneclinics.org (consultado el 7 de junio de 2008).
26. Sanz M. Blooms syndrome. *GeneReviews* 2006. Disponible en: www.geneclinics.org (consultado el 7 de junio de 2008).
27. Surrallés J, Jackson S, Jasin M, Kastan MB, West SC, Joenje H. Molecular cross talk among chromosome fragility syndromes. *Genes Dev* 2004;18:1359-70.
28. Jacky P. Fragile X and other heritable fragile sites on human chromosomes. En: Barch M, Knutsen T, Spurbeck J. *The AGT cytogenetics laboratory manual*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1991; 527-49.
29. Saul R, Tarleton J. FMR1 related disorders. *Gene Reviews* 2007. Disponible en: www.genetests.org (consultado el 15 de mayo de 2008).
30. Rosin MP. The use of the micronucleous test on exfoliated cells to identify anti-clastogenic action in humans: a biological marker for the efficacy of chemopreventive agents. *Mutat Res* 1992;267:265-76.
31. Ishikawa H, Tian Y, Yamauchi T. Influence of gender, age and lifestyle factors on micronuclei frequency in healthy Japanese populations. *J Occup Health* 2003;3:179-81.
32. Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res* 1993;285:35-44.
33. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* 2000;455:81-95.
34. Zalacain M, Sierrasesumaga L, Patiño A. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *An Sist Sanit Navar* 2005;28:227-36.

35. Johannes C, Horstmann M, Durante M, Chudoba I, Obe G. Chromosome intrachanges and interchanges detected by multi-color banding in lymphocytes: searching for clastogen signatures in the human genome. *Radiat Res* 2004;161:540-8.
36. Allen JW, Shuler CF, Mendes RW, Latt SA. A simplified technique for in vivo analysis of sister-chromatid exchanges using 5-bromodeoxyuridine tablets. *Cytogenet Cell Genet* 1977;8:231-7.
37. Pinkel D, Thompson D, Gray J, Vanderisan M. Measurement of sister chromatid exchanges at very low bromodeoxyuridine substitution levels using monoclonal antibody chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* 1985;45:5795-8.
38. Albertson D, Collins C, McCormick F, Gray JW. Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat Genet* 2003;34:369-76.
39. Hagmar L, Brogger A, Hansteen I-L, Heim S, Högstedt B, Knudsen L *et al.* Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: nordic study group on the health risk of chromosome damage. *Cancer Res* 1994;54:2919-22.
40. Bonassi S, Hagmar L, Strömberg U, Montagud AH, Tinnerberg H, Forni A *et al.* Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. *Cancer Res* 2000;60:1619-25.

CORRESPONDENCIA



Dra. Gloria C. Escribano Röber
Sección Genética, Departamento de Medicina
Hospital Clínico Universidad de Chile
Santos Dumont 999, Independencia, Santiago
Fono/Fax: 978 8513
E-mail: gescribano@redclinicauchile.cl