

EL NIÑO CON RASGOS DISMORFICOS Y/O RETRASO EN EL DESARROLLO.

LABORATORIO DE GENÉTICA: ¿Con qué pruebas contamos en la actualidad?.

Dra. Leire Otaolea . Lab. de Genética. Hospital Donostia.

Pruebas de Citogenética.

El laboratorio de citogenética juega un papel fundamental complementario de la genética clínica. Con los avances científicos y tecnológicos, la genética ha llegado a ser un aspecto fundamental de todas las áreas médicas. Es importante que el pediatra general conozca de qué medios disponemos en la actualidad en el laboratorio de citogenética, qué utilidades tiene para la clínica y qué significado tienen estos estudios. La genética se divide en dos áreas, la citogenética, que se encarga del estudio de los cromosomas mediante el cariotipo y la genética molecular que estudia los genes. La citogenética es una ciencia relativamente joven. A mediados del siglo XIX el hombre comenzó a observar los cromosomas al microscopio, pero hasta final de los años 50 no fue posible individualizar los cromosomas al microscopio, contarlos y conocer su estructura. Con los avances que se han producido en la última década, no sólo hemos podido identificar los cromosomas, sino que hemos llegado a identificar anomalías cromosómicas tan pequeñas que están fuera de la resolución del microscopio óptico. Estas últimas anomalías pueden ser diagnosticadas gracias a las técnicas de citogenética molecular (hibridación fluorescente *in situ* –FISH–, Multiple Ligation Probe Amplification –MLPA– y CGH-array. A continuación describiremos cada una de ellas.

El cariotipo detecta anomalías cromosómicas numéricas y estructurales. Hay que considerar realizar estudio de alta resolución si existe sospecha de cromosomopatía a pesar de un cariotipo previo normal.

El cariotipo, es la distribución ordenada de los cromosomas en metafase o prometafase, atendiendo a su tamaño y a su forma. Mediante su estudio, podemos ver la dotación cromosómica de un individuo y comprobar, por lo tanto, si un determinado paciente padece o no una anomalía cromosómica.

Las **indicaciones** para realizar un cariotipo son: rastreo prenatal de los defectos congénitos (Sd.Down,...), retraso mental inespecífico, niños y neonatos con dismorfias o formas sindrómicas, infertilidad, abortos de repetición y donantes de gametos.

En la especie humana los cromosomas se estudian sobre todo en linfocitos de sangre periférica, pero pueden estudiarse en cualquier otro tejido incluyendo médula ósea, fibroblastos, o tejidos prenatales (líquido amniótico y biopsia de corion) y de la concepción (tejidos fetales y membranas fetales de abortos).

Para la realización del cariotipo, se necesitan 1-3 mL de sangre heparinizada. Tras ello, se realiza la siembra de la sangre periférica (lo antes posible tras su extracción, pero puede obtenerse un crecimiento aceptable hasta 2-3 días después de la extracción). El medio de cultivo donde se siembra la sangre es un medio que lleva suero fetal de ternera enriquecido y protegido con antibióticos y antifúngicos, al que se le añade fitohemaglutinina para estimular el crecimiento y transformación de los linfocitos T. Después de 72 horas de cultivo, se detiene la división celular en metafase añadiendo colchicina (inhibe la formación de uso acromático y la división del centrómero). Posteriormente se añade una solución hipotónica para que las células se hinchen y se lisen, con lo

que los cromosomas se liberan y permanecen intactos los centrómeros, tras ello se fijan los cromosomas para que no se separen y luego se extienden en portaobjetos. Después se tiñen con diversas técnicas y entonces están disponibles para el análisis. Mediante estas técnicas, los cromosomas muestran unas zonas claras y oscuras llamadas bandas que son específicas de cada cromosoma. Entre las técnicas de bandeado disponibles tenemos las bandas G (son las habituales, de resolución estándar 450-550 bandas), bandas Q, bandas C, bandas NOR, bandas R, bandas DAPI y bandas de alta resolución.

Las imágenes cromosómicas obtenidas al microscopio se procesan y los cromosomas se ordenan en función de su longitud y estructura (sobre todo por la posición del centrómero). En la actualidad, se utiliza el análisis informatizado de la imagen para visualizar los cromosomas. Con las técnicas habituales de resolución *standard* es fácil el diagnóstico de anomalías cromosómicas numéricas. También pueden observarse anomalías estructurales groseras, pero no pueden observarse pequeñas deleciones o duplicaciones. Es importante recordar que nuestra capacidad para identificar alteraciones cromosómicas estructurales depende del desarrollo tecnológico. Así, hace unos años sólo disponíamos del bandeado cromosómico con un nivel inferior a 500 bandas; mientras que, las técnicas actuales permiten realizar cariotipos con más de 800 bandas (cariotipo alta resolución). Por todo ello, ante todo niño con defectos congénitos, debe realizarse cariotipo de alta resolución. Si un paciente tuviera un cariotipo previo realizado normal, pero con menos de 500 bandas, habría que repetirlo, para obtener un cariotipo de alta resolución. Esto es más importante aún si en la familia se han presentado varios hijos con defectos congénitos diversos. En algún caso, habría que realizar estudios dirigidos de citogenética molecular.

Por ello, un estudio normal de cariotipo no significa siempre que no hay presentes patologías de origen genéticos, ya que está limitado por su resolución (5-10Mb), con lo cual es el médico quien debe analizar a cada paciente en particular para seguir adelante con otros estudios.

La FISH es una técnica mixta de citogenética molecular que nos permite el diagnóstico rápido de anomalías cromosómicas en metafase (muy pequeñas, no visibles a la resolución del microscopio óptico) o interfase.

A veces, es difícil identificar ciertas anomalías cromosómicas, tales como marcadores cromosómicos, derivados cromosómicos, traslocaciones no balanceadas de novo y algunas regiones anormalmente bandeadas. Otro inconveniente de las técnicas citogenéticas habituales proviene del hecho de que el análisis cromosómico se realiza en células que se están dividiendo y los cromosomas deben detenerse en metafase. Muchas de las dificultades anteriormente enumeradas han podido solventarse con la introducción de la hibridación fluorescente *in situ* (FISH –*fluorescent in situ hybridization*–). Esta tecnología, proporciona una ayuda importante a las técnicas citogenéticas clásicas, debido al hecho único de valorar simultáneamente información citogenética y molecular. La capacidad para detectar y caracterizar anomalías cromosómicas mediante FISH ha aumentado y mejorado en los últimos años por el rápido incremento y perfeccionamiento de sondas cromosómicas específicas. En la actualidad, pueden detectarse regiones de 1- 10 kilobases de tamaño. Otro de los grandes avances que ha permitido la FISH, es la posibilidad de disponer de un test diagnóstico en 24-48 horas, en contraste con la gran cantidad de tiempo requerido para algunas técnicas citogenéticas. La FISH permite la determinación del número y localización de determinadas secuencias de DNA en células humanas, tanto en interfase como en cromosomas en metafase. La metodología del FISH se basa en la complementariedad entre las 2 cadenas de DNA de doble hélice.

Sin embargo, y esto es una de los avances más importantes, la FISH no necesita preparaciones obligatoriamente en metafase como sucede con las técnicas citogenéticas *standard*. Como cada cromosoma ocupa un territorio dentro del núcleo en interfase, es posible determinar el número de cromosomas o determinadas regiones cromosómicas contando el número de señales presentes.

Para su estudio necesitaremos una muestra recogida en un tubo verde (anticoagulante heparina). Existen sondas diferentes dependiendo de las necesidades para la detección de anomalías cromosómicas. La elección de la sonda variará con cada aplicación particular en cuestión. En general, hay 3 tipos de sondas: 1. Sondas locus-específicas; 2. Sondas centroméricas; y 3. Sondas que dibujan cromosomas completos (pintado cromosómico) o ciertas regiones cromosómicas (*painting*).

En los últimos años, se han perfeccionado las técnicas de FISH, y han aumentado el número de sondas comercialmente disponibles.

En lo que se refiere a las **aplicaciones** clínicas de la FISH, tenemos las siguientes:

1. *Aneuploidías*: tiene su utilidad sobre todo en el diagnóstico prenatal o en el período neonatal, o en ciertos tumores (sobre todo los sólidos) cuando la valoración y diagnóstico temprano de algunas trisomías puede ser importante.

2. *Traslocaciones e isocromosomas*.

3. *Marcadores cromosómicos*.

4. *Deleciones y duplicaciones*: el análisis de las pequeñas deleciones o duplicaciones en los cromosomas humanos es mejor enfocado mediante FISH con sondas dirigidas a detectar la región crítica que es responsable del síndrome. Actualmente, existen varios síndromes de microdeleción que pueden ser diagnosticados con esta técnica.

Para el estudio de anomalías subtelo méricas y diferentes síndromes de microdeleción y retraso mental, al igual que con el FISH puede ser estudiado también mediante MLPA (utiliza una estrategia de análisis diferente).

El MLPA es una técnica sensible, rápida y de bajo coste que, capaz de detectar deleciones y duplicaciones a partir de una muestra de ADN (tubo morado con anticoagulante EDTA).

Esta técnica se basa en la hibridación con sondas de la región de interés y sondas de otras regiones (controles), ligamiento y posterior amplificación (multiplicación) por PCR.

Permite identificar pérdidas o ganancias de material genético, atendiendo a la normalización de las áreas de cada pico con respecto a un control sano.

Los telómeros son una zona del genoma humano con alta concentración de genes y, por tanto, pequeñas alteraciones en esa zona podrían afectar a genes candidatos para síndromes con retraso mental. La mayoría de estas anomalías teloméricas son indetectables mediante la citogenética convencional, de ahí el nombre de "crípticas" o "sutiles"; ya que, el tamaño y patrón de bandas de estas regiones cromosómicas es muy similar y no se pueden distinguir en el caso de una traslocación, o bien el tamaño de la anomalía es tan pequeño que supera el límite de resolución de las actuales técnicas de bandas. De acuerdo con los conocimientos actuales, debería valorarse la realización de un estudio con sondas subtelo méricas en todo caso de retraso mental moderado-severo de causa desconocida, que presente anomalías dismórficas en el examen clínico o que tenga otros familiares con retraso mental (aunque el fenotipo de estos familiares sea diferente al probando, ya que la traslocación puede segregarse de diferentes formas y dar lugar por tanto a fenotipos diferentes) y existan antecedentes de abortos de repetición.

Debe quedar claro, que para realizar un estudio con estas técnicas (FISH, MLPA) previamente hay q tener una sospecha clínica de cual es la posible alteración y realizar el estudio para esa región cromosómica concreta, ya que sólo van a dar información sobre la región específica a estudio.

La CGH es una técnica de citogenética-molecular que permite la identificación de ganancia o pérdida cromosómica por rastreo del genoma completo.

El array CGH, también llamado Cariotipo Molecular, es una técnica utilizada en diagnóstico genético que permite analizar el genoma completo de un individuo detectando variaciones en el número de copias, es decir, ganancia ó pérdida de material genético de un tamaño del orden de Kilobases (Kb).

Consiste en un cristal donde están colocados los fragmentos de ADN (sondas u oligonucleótidos) normales que hibridan con una mezcla de : ADN del paciente que queremos analizar marcado con fluorocromo verde / ADN control normal marcado en rojo.

Si no falta ni sobre ADN el fragmento tomará un color amarillo, si falta un fragmento del ADN tomará color rojo y si el paciente tiene un fragmento duplicado tendrá un color verde.

Con un scanner se analiza el color de cada uno de los fragmentos y con un software específico se coloca cada punto en su posición exacta de cada uno de los cromosomas. Se considera una posible alteración si hay al menos 5 sondas consecutivas ganadas o perdidas y estas son analizadas para descartar la presencia de estas variaciones en la población sana consultando diferentes bases de datos para determinar la relación entre el cuadro clínico del paciente y las alteraciones observadas. En algunos casos, la presencia de alteraciones no descritas previamente, hace necesario el estudio de los padres para descartar la posibilidad de que sea una alteración heredada, que no sea responsable del cuadro clínico del paciente.

Las **limitaciones** del array-CGH son: no puede detectar anomalías cromosómicas balanceadas, mutaciones puntuales, ni mosaicismos (<30%). Una vez que hemos podido conocer la anomalía cromosómica, se comprueba la misma con FISH.

El array-CGH está **indicado** en pacientes con cariotipo normal y un cuadro clínico con:

- Retraso mental o del desarrollo no explicado.
- Anomalías congénitas o rasgos dismórficos.
- Desordenes autistas o presentaciones clínicas que sugieran un síndrome cromosómico concreto.
- fetos cruz

Además, está indicado en cariotipos alterados:

- En pacientes con translocaciones aparentemente balanceadas con un fenotipo clínico anormal el array-CGH puede detectar deleciones o duplicaciones crípticas en esas regiones.
- En presencia de duplicaciones o deleciones en el cariotipo para determinar los límites de las región alterada.
- Cuando se identifiquen cromosomas marcadores, para determinar su origen.

A pesar de ello, su uso debe hacerse con cautela, ya que esta en fase experimental y se desconoce el efecto de muchos de los cambios encontrados, pudiendo suponer un problema en el diagnóstico.