

M. GONZÁLEZ RAMOS*

CONTRIBUCION AL
ESTUDIO DE LOS
CROMOSOMAS EN LA
ESPECIE HUMANA.

HASTA ANTES DE 1956, los estudios citogenéticos se habían realizado principalmente en animales y plantas (*Drosophila melanogaster*, *Oenothera lamarckiana*, *Zea mais*, etc.).

Del descubrimiento de Tjio y Levan⁶ de que la especie humana tiene 46 cromosomas se derivó también el método para hacer estudios cromosómicos en los seres humanos y a partir de entonces (1956) se han sucedido numerosas investigaciones, que han hecho que la Citogenética llegue a la clínica diaria. Conviene señalar sin embargo que el valor de estos estudios no radica en que constituyan un "tema de moda" sino en su utilidad práctica como auxiliares del diagnóstico clínico, y además porque por medio de ellos es posible comprender mejor problemas médicos hasta ahora mal entendidos.

Era natural que la preparación de "cariotipos" humanos, exaltara al mismo tiempo las determinaciones, aparentemente más modestas, de "cromatina sexual" preconizadas por Barr y Bertram (1949)¹ y de los "palillos de tambor" que en 1954 Davidson y Smith² encontraron en los polimorfonucleares. Nosotros creemos que en la actualidad un estudio cromosómico debe comprender: *a*). La determinación de la "cromatina sexual". *b*). La cuenta de los "palillos de tambor" en los polimorfonucleares y *c*). El estudio del cariotipo. Es con este criterio que presentamos los métodos usados por nosotros en este tipo de estudios; métodos que aunque no totalmente originales, han sido derivados en gran parte de la experiencia acumulada al trabajar intensamente en Citogenética desde 1959.

* Laboratorio de Citología. Clínica Eugenio Sué No. 355. México, D. F., Octubre de 1963.

MATERIAL

Todas las muestras para estos estudios han sido obtenidas de nuestros colaboradores, de estudiantes de medicina y de nosotros mismos cuando hemos querido establecer un patrón normal; además hemos tenido oportunidad de estudiar en forma completa más de un centenar de cariotipos, en casos médicos que nos fueron enviados para aclarar algún problema patológico. La presentación detallada de estos casos será motivo de otras comunicaciones. Todos los estudios fueron realizados personalmente por el autor en nuestro Laboratorio privado.

MÉTODOS

A. *Estudio de la Cromatina Sexual.*

1. El paciente se deberá enjuagar la boca haciendo dos o tres buches con agua.
2. Con una espátula de plástico o con el mango de una pinza de disección se raspa, suavemente, una sola vez la cara interna del carrillo.
3. El producto obtenido se deposita sobre un portaobjetos desengrasado y se le agrega una gota de solución acética de Orceína Sintética al 2%.
4. Se hace el "squash" con cubreobjetos 22 x 22 mm. y se sella la preparación.
5. La observación microscópica puede hacerse inmediatamente, pero la preparación permanece en buen estado durante dos meses si se conserva refrigerada.

B. *Estudio de los "Palillos de Tambor" en los polimorfonucleares:*

1. Por punción capilar o con sangre venosa se llenan dos microhematocritos.
2. Se centrifugan a 12000 rpm. durante un minuto.
3. Se cortan con una lima, 1 mm. por abajo del "Buffy Coat" depositando éste con los glóbulos rojos subyacentes en el portaobjetos y extendiéndolo para hacer un frotis, en la forma habitual.

4. Con cada hematocrito se prepara un frotis que se tiñe después con Wright o Giemsa.

C. *Técnica del cultivo de sangre periférica para el estudio del Cariotipo:*

Método No. 1. Basado en la Técnica de González Ramos M y col.³.

1. A un frasco de 100 ml. de Medio 199 se le agregan: 100,000 Unidades de Penicilina, 100,000 mcg. de Streptomina y 2 ml. de solución de Heparina (Upjohn: 1000 U.S.P.U. por cc.).
2. Se marcan con los números 1, 2, 3 y 4, y el nombre del paciente cada uno de cuatro tubos estériles de 13 x 100 con tapa de bakelita y en cada uno se colocan 1 ml. de Medio 199, IV gotas de Phytohemagglutinin M (Difco) y 4 ml. de la sangre obtenida en ese momento por punción venosa.
3. Se mezcla el contenido de los tubos por rotación y se dejan en hielo picado durante 15 a 30 minutos.
4. Se centrifugan a 400 rpm durante tres minutos. Si al final de ese tiempo no se ha separado más de 1 ml. de plasma, se repite la centrifugación durante dos minutos más.
5. El plasma de cada tubo es transferido a frascos de cultivo de 60 ml. que también han sido numerados y que contienen 0.25 ml. de Phytohemagglutinin M o P.
6. Se centrifugan nuevamente los tubos a 2000 rpm durante diez minutos, y el plasma sobrenadante se añade a su correspondiente frasco de cultivo.
7. Los frascos de cultivo se incuban a 37 grados C. A las 56 horas, se agregan (previa agitación) a dos de ellos, 0.05 ml. de una solución de Colcemid que contenga 40 mcgrs. por ml. La cosecha se inicia dos horas después; en ese lapso los frascos han permanecido en la estufa.
8. Este tiempo se repite a las 70 horas con los dos tubos restantes.
9. La cosecha se efectúa como se indica al final del Método No. 2.

Método No. 2^o.

1. Con una jeringa de 20 ml. empapada con solución de Heparina Upjohn (1000 U.S.P.U. por cc.) se extraen 20 ml. de sangre venosa, que se depositan ascépticamente en un tubo de 50 ml. con tapón esmerilado o de bakelita, que contiene 0.40 ml. de Phytohemagglutinin "M" o "P".
2. Se mezcla rotando el tubo entre las manos y se deja reposar en hielo picado durante 45 minutos.
3. Al final de ese tiempo se centrifuga durante medio minuto a 400 rpm y se lleva después la velocidad a 1000 rpm, regresándola inmediatamente a cero.
4. Asépticamente se toman 2 ml. del plasma sobrenadante y se depositan en un frasco de cultivo de 60 ml.
5. El resto de la sangre se centrifuga durante diez minutos a 2000 rpm.
6. Mientras tanto, se agregan a los 2 ml. del plasma, 8 ml. de medio 199.
7. Finalmente, se agregan 2 ml. del plasma restante.
8. Se hace barbotear asépticamente una corriente de CO₂ al 10% dentro del frasco de cultivo, agitando hasta obtener un color amarillo naranja.
9. El frasco es incubado por 70 hs. a 37 grados C.

Cosecha

1. A las 70 hs.; se mezcla perfectamente el contenido del frasco y se le agregan 0.15 ml. de una solución Salina Buffer que contenga 40 mcgs. de Colcemid por ml., agitando después de la adición.
2. Se vuelve a la estufa a 37 grados C. durante dos horas.
3. Se centrifuga durante cinco minutos a 400 rpm.
4. Se retira el sobrenadante con una pipeta Pasteur provista de bulbo de goma, y el sedimento se suspende agitando enérgicamente en una solución de citrato de sodio al 1% (aprox. 10 a 15 ml.).
5. Después de media hora, se centrifuga cinco minutos a 400 rpm, se descarta el sobrenadante y el sedimento se suspende agitando enérgicamente con 8 ml. de solución de Carnoy aca-

- bada de preparar (6 ml. de Etanol o de Metanol y 2 ml. de ácido acético glacial).
6. Se deja reposar 15 minutos y al final de ese lapso se repite el tiempo anterior.
 7. Después de cinco minutos de estar nuevamente en fijador de Carnoy, se centrifuga a 400 rpm durante cinco minutos, se descarta el sobrenadante y el sedimento se resuspende en 0.5 ml. de solución de Carnoy.
 8. Con una pipeta Pasteur sin bulbo de goma, se toman dos gotas que se depositan separadamente en un portaobjetos desengrasado y seco; soplando varias veces hasta que el líquido se evapore.
 9. En la misma forma se preparan todos los frotis que sea posible y posteriormente se tiñen con Orceína Acética o con Giemsa.
 10. La observación microscópica se lleva a cabo con objetivo a seco débil para localizar la mitosis y con objetivo a seco fuerte para seleccionarlas. Finalmente con objetivo de inmersión se cuentan cuando menos cincuenta mitosis y se hace un análisis previo de ellas.
 11. Se seleccionan diez mitosis en las que los cromosomas estén totalmente separados, y descansen sobre un mismo plano, y se hacen impresiones fotográficas que posteriormente se amplifican a 4000 X a fin de hacer el "Cariotipo".

Preparación de Cariotipos utilizando células de la Médula Osea, sin cultivo previo⁶.

1. Con una jeringa heparinizada (Heparina Sódica de Upjohn) se toma 0.5 ml. de médula ósea, por punción esternal o de la cresta ilíaca.
2. El producto obtenido se suspende en 20 ml. de solución salina buffer, que contenga un microgramo de Colcemid por ml. y se deja reposar durante dos horas a la temperatura ambiente.
3. Al final de ese tiempo, se procede en la misma forma que fue indicado a propósito de la "cosecha de la sangre periférica".

RESULTADOS:

Los resultados pueden resumirse en la forma siguiente:

A. *Cromatina Sexual:*

1. En el varón normal, (25 casos) encontramos 0%.
2. En mujeres normales, (40 casos), todas las células muestran el corpúsculo de Barr. La cifra oscila entre el 20 y 80%.
3. En los casos de Pseudohermafroditismo masculino: (9 casos), ninguna de las células mostró "cromatina sexual".
4. En los casos de Síndrome de Turner: (7 casos), ninguna de las células presenta "cromatina sexual",
5. En casos de Síndrome de Klinefelter: (8 casos), más del 20% de las células mostraron el "corpúsculo de Barr".
En niñas con síndrome de Down: (6 casos), se encontró sistemáticamente en más del 20% de las células la "cromatina sexual".
7. En niños con Síndrome de Down: (5 casos), ninguna de las células presentó "cromatina sexual".

B. *"Palillos de Tambor" en los polimorfonucleares:*

1. En los varones normales la cantidad de "palillos de tambor" encontrados osciló entre 1 y 2 por cada 500 polimorfonucleares.
2. En las mujeres normales: La cifra fue siempre superior al 2%.
3. En los casos de Pseudohermafroditismo masculino: El resultado fue similar al de los varones normales.
4. En los casos de Síndrome de Turner: El resultado fue similar al de los varones normales.
5. En los casos de Síndrome de Klinefelter se encontraron más de 3% de "palillos de tambor", y en un caso se observaron por duplicado estos elementos.
6. En los niños con Síndrome de Down, el resultado estuvo conforme con el fenotipo.

C. *Cariotipos:*

1. En los varones normales y en el pseudohermafroditismo masculino, se encontraron 46 cromosomas, entre los que el grupo

- X-6-12, mostró 15 cromosomas submetacéntricos y el grupo Y-21-22, cinco cromosomas acrocéntricos, de tal manera que la fórmula final fue: 44-XY.
2. En las mujeres normales se encontraron 46 cromosomas entre los que el grupo X-6-12 mostró 16 cromosomas submetacéntricos y el grupo Y-21-22, 4 pequeños acrocéntricos. La fórmula final es 44-XX.
 3. En el Síndrome de Turner se encontraron 45 cromosomas; el grupo X-6-12 mostró 15 cromosomas submetacéntricos y 4 el grupo Y-21-22. La fórmula final es 44-XO.
 4. En un caso de Síndrome de Klinefelter 42% de las células mostraron la fórmula 44-XY de los varones normales. El 58% restantes mostró 47 cromosomas, con 16 submetacéntricos en el grupo X-6-12 y 5 acrocéntricos en el grupo Y-21-22. Este hallazgo se interpretó como un Mosaico con fórmula 44-XY, 44-XXY.
 5. En los casos restantes de Síndromes de Klinefelter se encontraron sistemáticamente 47 cromosomas con 16 submetacéntricos en el grupo X-6-12 y 5 acrocéntricos en el grupo Y-21-22. La fórmula final es: 44-XXY.
 6. En los niños varones con Síndrome de Down, se encontraron 47 cromosomas con 15 submetacéntricos en el grupo X-6-12 y 6 acrocéntricos del grupo Y-21-22. La fórmula final fue: 45-XY-Trisomía 21.
 7. En los niños con Síndrome de Down se encontraron 47 cromosomas con 16 submetacéntricos en el grupo X-6-12 y 5 acrocéntricos en el grupo Y-21-22. La fórmula final fue 45-XX-Trisomía 21.
 8. En los padres de los niños con Síndrome de Down (4 parejas) el cariotipo fue normal en número y de acuerdo con el fenotipo.

DISCUSIÓN

Todos los métodos antes expuestos son sencillos y altamente reproducibles. Los fracasos de muchos que han intentado este tipo de estudios son debidos: 1º A no seguir exactamente los diferentes tiempos señalados, tratando de imprimir modificaciones a una técnica que no han dominado, y 2º Al hecho de carecer de experiencia en Citología.

El método de "Squash-Orceína" para el estudio de la "cromatina sexual" aúna a su sencillez su eficacia puesto que la orceína es un colorante que tiñe electivamente el ácido desoxiribonucleico; por ello se evitan con él los resultados falsos positivos que aparecen cuando se emplean otras coloraciones.

La búsqueda de los "palillos de tambor" en los polimorfonucleares, se simplifica enormemente al hacer la concentración de células, con el método que proponemos, de esta manera la lectura es menos tediosa y los resultados (al evitarse el cansancio visual en una búsqueda prolongada), más exactos.

De los métodos 1 y 2 para el cultivo de sangre periférica, recomendamos el primero para los que no tienen experiencia en el cultivo y en la cosecha de células; ya que al hacer el estudio por cuadruplicado se multiplican las posibilidades de obtener buenos resultados. Por otra parte, una primera cosecha a las 56 horas, resulta conveniente en los casos en que se busque el cromosoma Philadelphia.

El método de Tjio y Whang⁶ para la preparación de cariotipos con médula ósea aúna a su sencillez su alta reproducibilidad; resulta ideal en los casos en que se sospecha la presencia de Mosaicismo, para hacer un estudio comparativo con el de la sangre periférica y en los casos de Leucemia Mieloide Crónica en que han de hacerse estudios seriados.

Nuestros hallazgos tanto en sujetos normales como en los casos patológicos concuerdan con los hallazgos de autores que se han referido antes a estos temas. Es interesante señalar que en seis casos de Síndrome de Down, de los estudiados por nosotros, se trataba de hijos de padres jóvenes, cuyas edades oscilan entre 19 y 29 años, una de estas parejas ha tenido 3 niñas, la mayor de 6 años de edad es normal y las 2 más pequeñas de 4 y dos años presentan el Síndrome de Down. En todos estos casos, (6 niños con Síndrome de Down) se encontró la Trisomía 21, y el cariotipo de los padres y de la niña mayor del caso mencionado en último término era normal. La presencia de la trisomía 21 y la ausencia concomitante de una translocación, indica que en estas parejas jóvenes, uno de ambos cónyuges debe haber tenido una alteración en la gametogénesis que ha conducido a la "no disyunción" del cromosoma 21 con la consiguiente producción de gametos aneuploides. En el caso de la pareja con 2 niños afectados cabe pensar que esta alteración a semejanza de la que ocurre en mujeres de más de 40 años es persistente y puede dar lugar a la repetición del "Síndrome de Down". Nues-

tras investigaciones se encaminan a aclarar este punto y a ese respecto creemos fundamental el estudio de la meiosis en el varón.

RESUMEN

1. Se presentan métodos ampliamente experimentados por el autor para:
 - a) El estudio de la "cromatina sexual".
 - b) La cuenta de los "palillos de tambor" en los polimorfonucleares.
 - c) El cultivo de sangre periférica para la preparación de cariotipos y
 - d) Un método para procesar la médula ósea, sin cultivo previo para hacer estudios cromosómicos.
2. Los resultados obtenidos tanto en sujetos normales como en los casos patológicos concuerdan con los de otros autores.
3. En relación con la aparición de niños con Síndrome de Down, que presentan la Trisomía 21 y que son hijos de parejas jóvenes, se insiste en la posibilidad de una lesión persistente en las gonadas, que provoque en las gametogénesis fenómenos de no disyunción del cromosoma 21, con la consecuencia hereditaria fetal. En estos casos el estudio de la meiosis en el varón probablemente aclararía o descartaría la contribución del padre en este tipo de alteración.
4. El estudio detallado de los casos patológicos se hará oportunamente y en colaboración con los médicos que nos los han enviado.

REFERENCIAS

1. Barr, M. L. and Bertram, E. C.: *Nature Lond.*, 163, (1949).
2. Davidson, W. M. and Smith, D. R.: *Brit. Med. J.*, 2, 6, (1954).
3. González Ramos, M. y col.: *Ginec. y Obst. de Méx.* XVII, 97, (1963).
4. Tjio, J. H. and Levan, A.: *Hereditas*, 42, 1, (1956).
5. Tjio, J. H.: *Comunicación personal*, Abril 1963.
6. Tjio, J. H. and Wang, J.: *Stain Technology*. 37, 17 (1962).