Método de Estudio para el Cromosoma Y

Manuel Aspillaga H.⁽¹⁾, Isabel Avendaño B.⁽²⁾, María I. Aguirre O.⁽³⁾

A Method of Study for Y chromosome

This method has been used to verify the presence of the Y chromosome as well as screening for its numerical or structural aberrations. Bucal smear was done in 50 healthy males as controls, and in 10 cases of different sexual pathologies or deletion of the Y chromosome. The smears were stained with 0,5 % atebirin solution. The percentage of positivity and its morphological differences were found in agreement with those obtained in other countries.

Casperson (1968) (1) y Zech (1969) (2, 3) observaron que la porción distal del brazo q del cromosoma Y presentaba una gran fluorescencia, cuando se teñía con quinacrina mostaza. Pearson y Bobrow (1970) (4) investigaron la posibilidad de identificar el cromosoma Y en núcleos interfásicos, basándose en la propiedad de tinción que éste presentaba. Observaron que el material cromatínico era posible detectarlo en dicha etapa celular, tratándolo con quinacrina o sus derivados. El corpúsculo "Y" aparece como un cuerpo brillante bien delimitado dentro del núcleo, sobre un fondo oscuro, y debe diferenciarse de bacterias y otros restos cromatínicos. Desde que se describió la técnica de fluorescencia, se ha utilizado en el diagnóstico de aberraciones gonosómicas e identificación del sexo (esta última puede ser utilizada en diagnóstico prenatal) (5).

Los objetivos de este trabajo son:

1. Establecer el rango de positividad del corpúsculo "Y" fluorescente en una población normal, y compararlo con casos que presentan patología sexual y/o del gonosoma "Y".
2. Analizar las características morfológicas del

corpúsculo "Y", y su localización dentro del núcleo.

3. Determinar su utilidad como método de examen.

MATERIAL Y METODO

Se escogieron 50 varones sanos (fenotípicamente normales) entre 1 – 50 años de edad y 10 pacientes con anomalía clínica o de gonosoma Y, (vale decir, cariotipo anormal: 47, XYY; 47, XXY; 46, del Yq; pseudohermafroditismo masculino e hipogonadismo hipogonadotrófico). Mediante raspado de mucosa bucal se obtuvo células epiteliales, las que se fijaron con metanol-ácido acético en proporción 3 : 1, durante 30 minutos, y se tiñeron con una solución acuosa de atebirina al 0,5%. Las preparaciones fueron montadas usando "buffer" McIlvaine a pH 5,5. Se las observó al microscopio de fluorescencia (Leitz-Ortholuz), con lámpara de Hg de 200 HBO, filtro de excitación BG 12 y filtro de barrido K 530. (5, 6, 8).

RESULTADOS

La fluorescencia se presentó en forma "simple" (Y_S) o única, con un tamaño aproximado de 0,25 a 0,30 micrones de diámetro, pudiendo también expresarse como una doble estructura que llamamos "bífida" (Y_B); en esta última los corpúsculos son de menor tamaño que en la forma simple, y están separados por una distancia igual a una o dos

¹ Profesor titular de Pediatría de la U. Ch. Médico jefe Unidad de Genética. Hospital Luis Calvo Mackenna.

² Médico Pediatra. Unidad de Genética. Hospital Luis Calvo Mackenna.

³ Tecnólogo Médico. Unidad de Genética. Hospital Luis Calvo Mackenna.

veces el diámetro de un corpúsculo simple. Al existir dos cromosomas Y observamos dos corpúsculos, que designamos como "doble" (Y_D), el que podría ser "simple" o "bífido". (4, 6, 7, 8). Su localización dentro del núcleo no fue constante y se ubicó en cualquier zona, muy pocas veces adosado a la membrana nuclear. (Fig. 1).

Fig. 1 Aspectos esquemáticos del corpúsculo Y nuclear.

Los valores de positividad total encontrados en nuestro estudio, para el grupo control (comprendiendo los corpúsculos simples y bífidos), se distribuyeron en una curva normal, cuya media fue de 44% con una desviación standard de 11% (Fig. 2). En la Fig. 3 se analiza la diferencia de lecturas entre los corpúsculos Y_S y los Y_B . La curva de Y_S es una normal cuya media es 34% con una desviación standard de 10%. La curva del Y_B no es simétrica, está desplazada hacia la derecha, pues los porcentajes detectados fluctúan entre 4% y 24%, con una media de 10%, y desviación standard de 4%. El rango de valores hacia la derecha es más amplio que hacia la izquierda de la media, pero su frecuencia es mayor en el rango de valores menores.

Fig. 2 Valores totales expresados en %, del corpúsculo Y (+), en 50 varones normales (1-50 años)

$\bar{X} = 44\% \pm 11\% \text{ D.S.}$

Fig. 3 Valores expresados en % del corpúsculo Y_S (curva de trazo continuo). $\bar{X} = 34\% \pm 10\% \text{ D.S.}$ Valores expresados en % del corpúsculo Y_B (curva de trazo discontinuo). $\bar{X} = 10\% \pm 4\% \text{ D.S.}$

Los casos patológicos analizados se resumen a continuación. (Ver Tabla 1):

Caso 1.— L.M.V., 15 años de edad. Presenta agresividad marcada y problemas conductuales. El cariotipo reveló una constitución cromosómica 47, XYY, y con fluorescencia demostró un 15% de Y_D con una positividad total de 27%.

Caso 2.— R.R.O., 1 año 6 meses. Presenta Síndrome de Down, hiperquinesia y desarrollo genital normal. En el cariotipo se encontró un mosaicismo 48, XYY + 21/47, XYY en proporción de 50% en cada población. La fluorescencia reveló Y_D .

Caso 3.— Y.I.C., 3 años de edad, Intersexo con hipospadia perineoescrotal probablemente debido a deficiencia de 5 alfa reductasa. Cariograma 46, XY. Se verifica presencia de corpúsculo Y.

Caso 4.— H.B.C., 35 años de edad. Sin patología sexual. Cariograma 46, X del .Yq (tamaño del cromosoma Y es aproximadamente la mitad de un cromosoma G). La fluorescencia revela un porcentaje bajo y con un tamaño corpuscular muy pequeño.

Caso 5.— R.B.T., 2 meses de edad. Hijo de H.B.C. (Caso 4). Sin alteración de genitales externos. Cariotipo 46, X del .Yq. En este caso el corpúsculo fluorescente es prácticamente imposible de individualizar.

Caso 6.— E.C.S., 34 años. Síndrome de Klinefelter con 22% de cromatina de Barr, y corpúsculo Y positivo. Cariotipo 47, XXY.

Caso 7.— A.M.G., 22 años. Síndrome de Klinefelter. Presenta cromatina de Barr positiva y fluorescencia igualmente positiva, con un cariotipo 47, XXY.

Caso 8.— A.B.L., 1 año de edad. Ambigüedad sexual. Cromatina de Barr positiva y corpúsculo Y

presente. Cariotipo 47, XXY. Síndrome de Klinefelter.

Caso 9.— V.A.J., 16 años de edad. Hipogonadismo hipogonadotrófico con escaso desarrollo genital. La fluorescencia es positiva en porcentajes normales. Cariotipo 46, XY.

Caso 10.— I.P.Z., 15 años de edad. Sin desarrollo sexual secundario y criptorquidea con microorquidismo. Cariotipo 46, XY. Mediante estudios de laboratorio corresponde a un hipogonadismo hipogonadotrófico. Con fluorescencia se obtienen valores normales para el corpúsculo Y.

Tabla 1

Valores de positividad del corpúsculo Y en casos patológicos (expresados en %).

Patología	Y simple	Y bifido	Y doble	Y total	Cromat. X
47, XYY	12%		15%	27%	
48, XYY + 21/47, XYY	22%		8%	30%	
Pseud. herm. masculino 46, XY	26%			26%	
46, X del. Yq	9%			9%	
46, X del. Yq	1%			1%	
47, XXY	39%	11%		50%	22%
47, XXY	43%	7%		50%	23%
47, XXY	20%	20%		40%	26%
Hipog. hipogonadotrófico 46, XY	37%	10%		47%	
Hipog. hipogonadotrófico 46, XY	32%	10%		42%	

DISCUSION

La curva resultante para la positividad total ($Y_S + Y_B$) de nuestros casos controles, dio una desviación standard de 11%, vale decir que, más menos este porcentaje, incluye un 68% de los casos, y con 2 desviaciones standard un 96% de ellos. Si catalogáramos una muestra negativa por estar fuera del rango 22% — 66%, tendríamos una posibilidad de error de un 4% (Fig. 2). Este resultado es similar al encontrado por Sanz y colaboradores (6), y Pearson y Bobrow (4).

La causa de la captación selectiva de la atebirina por el ADN no está clara. Se sabe que la porción distal del brazo q del cromosoma Y, presenta la propiedad de fluorescer; siendo posible localizarlo aun en núcleos interfásicos; según la combinación de bases dependerá la intensidad de fluorescencia, ya que a mayor concentración de Adenina — Timina (A — T), mayor intensidad de ella (ADN saté-

te) (9). También se sabe que el cromosoma Y estaría constituido por heterocromatina, cuyas propiedades son: ADN altamente repetitivo (ADN satélite, rico en A — T), duplicación tardía, inactivación génica, gran intensidad de coloración con bandeo C (centrómero) y bandeo Q (quinacrina), y heterocromatinización durante la embriogénesis (10).

Se dice que la dimensión física del corpúsculo cromatínico es similar a la región fluorescente del cromosoma Y; esto implicaría que sólo una parte de éste estaría formando el punto fluorescente (6), que sería la porción condensada durante la interfase (Figs. 4 y 5). Sería posible explicar la estructura bifida (Fig. 6), suponiendo que ambas cromátides se condensan por separado, pero pudiendo observarse como un cuerpo único, si ellas permanecen muy adosadas. Por razones ópticas también aparecerían como un corpúsculo simple, al superponerse una cromátide sobre otra.

Fig. 4 Corpúsculo Y "simple" en núcleo interfásico.

Fig. 6 Corpúsculo Y "bífido".

Fig. 5 Porción fluorescente del brazo q del cromosoma Y.

Estaría de acuerdo el hecho de que el antígeno H-Y esté presente en los individuos con una fluorescencia pequeña o negativa, pues los genes que lo codifican se ubicarían en la zona cercana al centrómero, donde no se capta estos colorantes (11, 12), como sucedió en el caso 5, que tenía genitales normales.

Existe una relación directa entre el número de cromosomas Y, y el número de corpúsculos. La razón por la cual todos los núcleos no presentan el corpúsculo fluorescente, estriba en que no todos captan el colorante, o que se trate de un mosaico (si el conteo es bajo 2 desviaciones standard, podríamos estar ante un mosaico, en el cual una población celular no tiene el gonosoma Y: hay que hacer estudio en otros tejidos). Curiosamente en nuestros casos de doble Y el porcentaje encontrado no es mayor que el grupo control, como sería de esperar.

En el análisis de fluorescencia (13), se debe tener precaución con posibles errores (7), así: las bacterias son de mayor tamaño y de menor intensidad de fluorescencia. Para eliminarlas se puede hacer una hidrólisis suave con HCl 5 M. Los acúmulos cromatínicos de otros cromosomas o centríolos tienen forma y tamaño irregulares, y menor fluorescencia. Falsos negativos ocurren con variantes normales del cromosoma Y, como es el cromosoma "Y de Beiler", que es pequeño y cuya porción distal fluorescente ha sufrido delección.

Este correspondería a nuestros casos 4 y 5. En la técnica se debe tener presente: Utilizar preparaciones frescas, porque la intensidad de fluorescencia disminuye en preparaciones antiguas; el pH del "buffer" debe ser controlado a su valor óptimo que es 5,5 (al alcalinizarlo aumenta la fluorescencia de fondo, obteniéndose un menor contraste y al acidificarlo, disminuye su intensidad) (14).

El método de fluorescencia es rápido y relativamente fácil. Como "screening" ayuda al diagnóstico de aberraciones numéricas del cromosoma Y, en caso de ciertas disgenesias gonadales. También se puede detectar alteraciones estructurales (cromosoma Y de Beiler). Entre las desventajas que presenta, podríamos acotar la necesidad de un microscopio de fluorescencia, con sistema óptico y, una fuente de iluminación óptimos y que las preparaciones no son permanentes, pues la fluorescencia desaparece rápidamente necesitando de la fotografía para su mejor análisis.

De lo anteriormente expuesto se desprende que las indicaciones para este examen serían: Verificación de la existencia del gonosoma Y; genitales externos ambiguos; hombre con retardo mental, alteraciones conductuales, estatura superior a percentil 80, hipospadia (XO/XY), crítorquidea (XXY), infertilidad o ginecomastía; mujer con masa inguinal herniada (testículo feminizante XY), y en enfermedades ligadas al sexo (diagnóstico prenatal).

Como todo método de selección no da un diagnóstico definitivo, debe acompañarse de antecedentes clínicos de la patología y eventualmente de cariograma.

RESUMEN

El uso de colorantes fluorescentes se ha utilizado en el diagnóstico de aberraciones numéricas o morfológicas del gonosoma Y, y/o verificación de su presencia en el núcleo celular.

Lo investigamos en 50 varones sanos como control y en 10 pacientes portadores de patología

sexual o del gonosoma Y. Se usó células epiteliales de mucosa bucal, teñidas con una solución de atebriña al 0,5%. Estudiamos la positividad de este examen y la morfología del corpúsculo, comparándola con los resultados descritos en la literatura. Nuestras cifras concuerdan con los estudios publicados en el extranjero.

REFERENCIAS

- ¹ Caspersson, T.; Farber, S.; Foley, G.E.; Kudownowski, J.; Modest, E.J.; Simonsson, E.; Wagh, V.; Zech, L.: Exp. Cell. Res. 49: 219, 1968.
- ² Caspersson, T.; Zech, L.; Modest, E.J.; Foley, G.E.; Wagh, V.; Simonsson, E.: Exp. Cell. Res. 58: 141, 1969.
- ³ Zech, L.: Exp. Cell. Res. 58: 463, 1969.
- ⁴ Pearson, P.L.; Bobrow, M.: Technique for Identifying Y Chromosomes in Human Interphase Nuclei. Nature. 226: 78-80, 1970.
- ⁵ Khadr, G.; Benirschke, K.: Fluorescence of the Y chromosome: A rapid test to determine fetal sex. Am. J. Obstet. Gynecol. 110: 1091-1095, 1971.
- ⁶ Sans, J.; Barsby, F.; Marfull, N.: Diagnóstico prenatal de probables aberraciones heterocromosómicas mediante el estudio de la cromatina X e Y por técnicas complementarias. Rev. Chil. Obstet. Ginecol. 16: 122-127, 1976.
- ⁷ Lamborot-Manzur, M.; Tishler, P.V.; Atkins, L.: Quantitative studies of Y chromosomal fluorescence in human interphase nuclei. Clinical Genetics. 3: 103-115, 1972.
- ⁸ Lewin, P.K.; Conen, P.E.: Fluorescent Y Screening of Hospitalized Newborns. Nature. 233: 334-335, 1971.
- ⁹ Chernay, P.R.: A differential staining technique for chromosome identification and its comparison with fluorescence technique. Clinical Genetics. 3: 347-356, 1972.
- ¹⁰ Bianchi, N.: Duplicación Cromosómica y heterocromatina a nivel molecular y citológico. Monografía. Secretaría General de la O.E.A. Washington, D.C., 1978.
- ¹¹ Short, R.V.: Sex determination and Differentiation. Brit. Med. Bull. 35: 121-127, 1979.
- ¹² Bocian, M.; Mohandas, T.: Recent Cytogenetic Advances and Implications for Pediatric Practice. Pediatric Clinics of North America. 25: 517-537, 1978.
- ¹³ Dutrillaux, B.; Lefeune, J.: New Technique in the study of Human Chromosomes: Methods and Applications. Advances in Human Genetics. Plenum Press New York. 5: 119-150, 1975.