



11216
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACION
SECRETARIA DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA

ESTUDIO DE 13 PACIENTES CON ALTERACIONES
ESTRUCTURALES DEL CROMOSOMA 18 POR
MEDIO DE HIBRIDACION IN SITU
CON FLUORESCENCIA (FISH)

TRABAJO DE INVESTIGACION
QUE PRESENTA
DRA. MARIA DEL CARMEN /ESMER SANCHEZ
PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALISTA
EN GENETICA MEDICA

TUTOR: SARA FRIAS VAZQUEZ



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



[Signature]
Dr. Hector Hernández Varela
DIRECTOR GENERAL

[Signature]
Dr. Rigoberto Martínez Benavides
SUBDIRECTOR GENERAL
DE ENSEÑANZA

[Signature]
Dr. Luis Heshier Nakandari
JEFE DPTO DE ENSEÑANZA
PRE Y POSTGRADO

[Signature]
Dra. Alessandra Carnevale Cantoni
PROFESOR TITULAR DEL CURSO.

[Signature]
Dra. Victoria del Castillo Ruiz
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION
EN GENETICA HUMANA

[Signature]
Dra. Sara Frías Vazquez.
TUTOR DEL TRABAJO DE INVESTIGACION.



ESTUDIO DE 13 PACIENTES CON ALTERACIONES DEL CROMOSOMA 18 POR MEDIO DE HIBRIDACION IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH).

María del Carmen Esmer.

Departamento de Investigación en Genética Humana.
Instituto Nacional de Pediatría.
Secretaría de Salud.
México, D.F. México

A mis padres, David y Rosalinda, por el apoyo incondicional no sólo durante la elaboración de la tesis sino durante toda la vida.

A mis hermanos, Rodrigo, Martín y David por ser el mejor ejemplo de lucha y superación que he tenido.

A Celina, Mónica, Martín, Juan Carlos y Rodolfo y muy en especial a la Familia GARRIDO GARCIA, por su amistad incondicional durante todos estos años.

A Silvia amiga y compañera en todas las batallas.

A la Dra. Sara Frias por su confianza en mí y por haber dirigido y evaluado mi trabajo de tesis.

A la Biol. Laura Gómez por su colaboración y apoyo durante la elaboración de éste trabajo.

A la Dra. Alessandra Carnevale por su muy valiosa asesoría en la elaboración de ésta tesis.

A la Dra. Victoria del Castillo por su enseñanza y ejemplo durante los 3 años de residencia.

A todo el personal del Laboratorio de Citogenética del Departamento de Investigación en Genética Humana.

Bertha
Bety
Paty
Luz
Conchita
Magda

RESUMEN: En ocasiones, el análisis citogenético de las alteraciones estructurales de los cromosomas no permite la reconstrucción de los eventos que la ocasionaron. La introducción de técnicas moleculares como la de FISH (HIBRIDACION IN SITU CON FLUORESCENCIA) que consiste en la detección de secuencias específicas de DNA por medio de fluorescencia, ha logrado complementar el análisis citogenético. El objetivo del trabajo fue hacer diagnóstico citogenético preciso en 13 casos con alteraciones estructurales del cromosoma 18 mediante FISH y establecer una correlación con el fenotipo. Se estudiaron 13 casos con una alteración estructural del cromosoma 18: Se incluyeron 8 pacientes con cromosomas marcadores; en dos de ellos se demostró que el marcador era un isocromosoma 18p. En otro de los pacientes, portador de una translocación (8;18) aparentemente recíproca, utilizando sonda de painting se demostró que existía monosomía 18q. Dos pacientes con deleciones y dos con anillo del cromosoma 18 se estudiaron con sondas teloméricas demostrando su integridad en ambas deleciones y su ausencia en los anillos. Otro de los pacientes era portador de un rearrreglo del cromosoma 18 en el que se confirmó que se trataba de una inversión pericéntrica del cromosoma 18. Con ésto se concluyó que la técnica de FISH es altamente confiable para la adecuada caracterización de rearrreglos estructurales y de gran utilidad para establecer la correlación de los hallazgos citognéticos con las manifestaciones clínicas de los pacientes.

SUMMARY: At present none of the conventional cytogenetic methods has proved to be reliable to provide a detailed analysis of all rearranged chromosomes. Recently fluorescence in situ hybridization (FISH) has become a powerful method for resolving cytogenetic problems. The reaction "stains" the target DNA sequences so that their localization and size can be determined. The purpose of the present paper was to define by FISH the origin of chromosome aberration currently unidentifiable by routine staining procedure in 13 cases with structurally rearranged 18 chromosomes and to outline the Karyotype-phenotype relationship. We included 8 patients with small marker chromosomes; in two, it was possible to identify them as isochromosomes 18p and to recognize their clinical picture as consistent with tetrasomy 18p. In a girl with a $t(8;18)$, FISH analysis with a chromosome-specific painting probe showed that there was a deletion 18q. Two patients with deletions and one case with a 18 ring chromosome were studied using telomeric probe showing that both deletions had telomeric integrity and they that no telomeric material was present in the 18 ring. In another patient with an abnormal chromosome 18, FISH with chromosome specific painting probe confirmed a pericentric inversion. We concluded that these results clearly demonstrate that FISH can provide a rapid and unequivocal cytogenetic diagnosis, and such definitive identification allows for a better understanding of the long term prognosis for these patients and enables caregivers to provide appropriate counseling.

Palabras claves: Cromosoma 18, alteraciones estructurales, cromosomas marcadores, tetrasomía 18p, anillo del 18, deleción 18p, deleción 18q, FISH.

Key words: Chromosome 18, structural rearrangements, marker chromosomes, tetrasomy 18p, 18 ring, 18p deletion, 18q deletion, FISH.

INTRODUCCION.

El estudio detallado de la morfología de los cromosomas humanos comenzó en 1956 cuando se reportó por primera vez el número modal de cromosomas; posteriormente, en 1970, se desarrollaron técnicas de bandeo, bandas Q y bandas G en cromosomas metafásicos que permitieron identificar los cromosomas por su patrón de bandas así como detallar los rearrreglos que sufren los cromosomas. A partir de 1976 se crearon otras técnicas de bandeo como las de alta resolución (prometafase), bandas NOR, Bandas R, etc., que mejoraron la capacidad de identificación de las aberraciones cromosómicas (1). En general, los cromosomas pueden sufrir dos tipos de anormalidades:

1) Numéricas en las que se gana o se pierde uno o más cromosomas, pueden involucrar autosomas (trisomía 13,18,21, etc) o cromosomas sexuales (monosomía X, trisomía XXX, Sd. Klinefelter 47, XXY, etc).

2) Estructurales en las que la estructura cromosómica se altera, generalmente como resultado de una o más rupturas. Estas anormalidades pueden ser:

1) Translocaciones. Son rearrreglos en los cuales dos o más cromosomas se rompen en un extremo e intercambian segmentos de DNA.

2) Anillos. La formación de un cromosoma en anillo involucra una pérdida de regiones teloméricas en ambos brazos del mismo cromosoma; los extremos libres se unen y forman una estructura circular. Se ha reportado que en algunas ocasiones

pueden conservarse íntegros los telómeros de uno de los brazos (2).

3) Marcadores. Presencia de pequeños cromosomas extra en los que se desconoce su procedencia, y en los que conocer el origen exacto del material extra ayuda a establecer una correlación fenotipo-cariotipo. La frecuencia de estos cromosomas marcadores es de 0.3-1.2/1000 recién nacidos; se han hecho varios intentos para tratar de identificar su origen citogenético como clasificarlos en grupos de acuerdo a su forma, tamaño y patrones de tinción, sin embargo ninguno de ellos ha probado ser lo suficientemente útil para ser usado en asesoramiento genético. Es frecuente que estos marcadores se originen del cromosoma 18 según lo reportado en la literatura (3,4,5,6,7,8,9,10,11,12).

4) Deleciones. Son desórdenes cromosómicos causados por la pérdida de las porciones terminales o intersticiales de uno de los brazos de un cromosoma. El análisis con FISH de la presencia de telómeros provee información adicional para determinar las características del material que se ha perdido (13,14).

5) Inversiones. Son cambios de sentido de segmentos cromosómicos en 180° ; no cambia ni el número de cromosomas ni el número de los genes en los cromosomas. Las inversiones pericéntricas incluyen el centrómero en el segmento invertido y las paracéntricas no lo incluyen (13). A pesar de contar con técnicas de bandeado especializadas como las prometafases, en la que se observan cromosomas largos (de

400-500 bandas), bandas C que dan información sobre la estructura del centrómero y heterocromatina constitutiva, etc; con frecuencia no es posible determinar los mecanismos que dan lugar a las alteraciones cromosómicas estructurales.

Los avances recientes en el conocimiento de la biología molecular permitieron emplear técnicas de hibridación in situ como complemento a la citogenética clásica con lo que se logró un análisis rápido, preciso y altamente sensible de las alteraciones cromosómicas. La técnica consiste básicamente en la identificación de secuencias específicas de DNA con sondas de DNA radioactivo, que posteriormente se sustituyó por DNA químicamente modificado, para lo cual se requiere (1):

- 1) Desnaturalización del DNA blanco y del DNA de la sonda.
- 2) Hibridación del DNA de la sonda con el DNA de los cromosomas en interfase o metafase. Esto se logra incubando a temperatura por debajo del punto de desnaturalización lo que permite que la sonda de DNA se una a secuencias complementarias.
- 4) Identificación de los sitios de hibridación empleando diferentes estrategias de marcado:
 - Timidina tritiada detectada con autorradiografía o sistemas contadores de protones.
 - Reacciones enzimáticas identificadas con métodos colorimétricos.
 - Recientemente se han utilizado fluorocromos como sistema de detección lo que da lugar a la técnica conocida como hibridación in situ con fluorescencia o FISH, que utiliza una

sonda de DNA a la cual se le han sustituido los residuos de timina por uridina marcada con biotina. Una vez realizada la hibridación, se lleva a cabo la detección por medio de una reacción mediada por una molécula reportera, avidina, marcada con fluoresceína que muestra gran afinidad por la biotina lo que permite detectar zonas fluorescentes de hibridación en un microscopio de fluorescencia.

Se utilizan cuatro diferentes tipos de sondas:

a) Sondas específicas para el DNA repetitivo de cada cromosoma. Todos los cromosomas tienen DNA repetitivo en tandem pero con la variabilidad suficiente entre uno y otro como para diferenciarlos. La mayoría de estas secuencias corresponde a las familias de DNA alfa satélite o Satélite III, localizadas en su mayoría en los centrómeros de los cromosomas. Las secuencias alfa satélite consisten en monómeros de 171 pb repetidos en tandem mientras que las secuencias satélite III son monómeros repetidos de 5 pb. Estas sondas son ideales para la detección de aneuploidias. Actualmente existen sondas específicas de regiones subtelo méricas de algunos cromosomas.

b) Sondas específicas para el DNA de todo un cromosoma completo (PAINTING), que contienen secuencias únicas y secuencias repetitivas. Ofrecen su mayor utilidad en el análisis de aberraciones estructurales o cuando es difícil asignar el origen de pequeñas segmentos cromosómicos involucrados en translocaciones, por las técnicas de bandeo convencionales. También se pueden usar para la detección de

anormalidades numéricas.

c) Sondas de DNA repetitivo inespecíficas, que marcan regiones comunes a todos los cromosomas: centrómeros o telómeros.

d) Sondas de secuencia única específicas de un locus que detectan secuencias de DNA de 15 a 500 kb y se usan en el diagnóstico de ciertas enfermedades genéticas. Permiten la identificación de pequeñas deleciones submicroscópicas, no solo en cuanto a su localización cromosómica sino también su localización en núcleos en interfase. El uso de estas sondas ha sido útil en el diagnóstico de enfermedades como retinoblastoma, Síndrome de DiGeorge, Síndrome de deleción del brazo corto del cromosoma 4, detección de portadoras de Distrofia Muscular de Duchenne y Esferocitosis.

La técnica de FISH ha complementado la citogenética convencional y ampliado la capacidad de análisis del número, tamaño y localización de secuencias específicas de DNA y por lo tanto del diagnóstico preciso de alteraciones cromosómicas estructurales y numéricas. (15,16). El poder confirmar la presencia o ausencia de estas secuencias teloméricas en el cromosoma involucrado permite determinar con precisión los puntos de ruptura y la naturaleza del material perdido.

JUSTIFICACION.

La habilidad para detectar y caracterizar las aberraciones cromosómicas tiene un valor clínico sustancial, ya que en ocasiones el análisis morfológico de los cromosomas no permite la reconstrucción de los cambios cromosómicos que

dieron lugar al rearreglo y por lo tanto la condición citogenética. En el servicio de genética del INP se han atendido varios pacientes con alteraciones cromosómicas que involucran al cromosoma 18, siendo la trisomía 18 la más frecuente (17). Las restantes las comprenden los anillos, las translocaciones, deleciones, duplicaciones y por último la presencia de pequeños cromosomas supernumerarios de los cuales desconocemos su origen pero que su tamaño, morfología y patrón de bandas G nos hacen suponer que provienen del cromosoma 18. Cuando se trata de hacer diagnóstico citogenético de trisomía 18, las técnicas habituales de bandeo son suficientes para lograrlo, sin embargo en las aberraciones estructurales son insuficientes para determinar el origen del material involucrado y el tipo de rearreglo que ocurrió.

En el presente estudio se utilizó FISH con sondas específicas para el DNA de todo el cromosoma 18 y sondas teloméricas inespecíficas, para el estudio de alteraciones estructurales, como translocaciones, anillos, inversiones, deleciones y cromosomas marcadores con un origen desconocido pero que se sospechaba provenían del cromosoma 18.

El introducir al estudio de las alteraciones cromosómicas la técnica de FISH permite optimizar la atención a nuestros pacientes, puesto que el tener un diagnóstico de certeza ayuda a establecer el pronóstico, a entender la evolución clínica del paciente y a brindar un adecuado asesoramiento genético a los padres.

OBJETIVOS.

- 1.- Hacer diagnóstico citogenético preciso en casos con alteraciones estructurales del cromosoma 18, mediante la técnica de FISH.
- 2.- Determinar los posibles mecanismos de producción de los rearrreglos cromosómicos.
- 3.- Establecer la correlación cariotipo-fenotipo.

HIPOTESIS.

Por tratarse de un trabajo descriptivo no se plantea una hipótesis central, sino algunas que parecieron relevantes.

Si la citogenética molecular es capaz de identificar regiones cromosómicas con alta precisión, entonces:

- 1.- Se podrán establecer los puntos de ruptura de los segmentos involucrados en los rearrreglos cromosómicos del cromosoma 18.
- 2.- Se podrá corroborar el origen de los cromosomas marcadores cuando se sospeche que provengan del cromosoma 18.
- 3.- Se podrá realizar una correlación clínica-citogenética.

ABREVIATURAS.

- a - Años.
- cms - Centímetros
- d - Delección.
- DNA - Acido desoxirribonucléico.
- EF - Exploración física.
- FISH - Hibridación in situ con fluorescencia.
- g - Gramos.

inv - Inversión.
kb - Kilobases
m - Meses.
mar - Marcador.
ml - mililitros.
p - Brazos cortos.
q - Brazos largos.
r - Anillo.
SDG - Semanas de gestación.
t - Translocación.
ul - Microlitros.

POBLACION EN ESTUDIO.

A) CRITERIOS DE INCLUSION.

- Pacientes del servicio de genética cuyos cariotipos mostraban una alteración estructural del cromosoma 18: Translocaciones, deleciones, anillos e inversiones.
- Pacientes con cromosomas de origen desconocido que por sus características clínicas o citogenéticas eran sospechosos de provenir de un cromosoma 18 anormal.

B) CRITERIOS DE ELIMINACION:

- Aquellos pacientes en los que no fue posible obtener cromosomas analizables para el estudio.

Se incluyeron 13 casos los cuales clinica o citogenéticamente portaban o eran sospechosos de portar una alteración estructural del cromosoma 18.

- DESCRIPCION DE LOS CASOS.

Caso 1. N.P.A. Femenino. 1 a 1/12. Segundo producto de padres jóvenes, no consanguíneos. Parto a término, sin eventos perinatales de importancia, peso al nacer 2000 gramos (g). Acudió por retraso en el desarrollo psicomotor y dismorfismo facial. A la exploración física se encontró con peso y talla por debajo de la percentila 3, microcefalia, fisuras antimongoloides, epicanto interno bilateral, puente nasal deprimido, labio hendido izquierdo, pabellones auriculares displásicos, clinodactilia del 5o. dedo, pliegue equivalente simiano bilateral, pie equinovaro derecho, primeros orfejos en gatillo. Cariotipo: 46,XX,r(18)(p11q22).

Caso 2. E.B.H. Masculino. 1 a 3/12. Segundo producto de padres jóvenes, no consanguíneos. Antecedentes de hipoxia perinatal, parto a las 35 SDG, peso al nacer 2500 g. Acudió por dismorfias faciales y retraso psicomotor. A la EF peso y talla por debajo de percentila 3, microcefalia, cráneo con exostosis, tendencia a la dolicocefalia, suturas prominentes, fontanela cerrada, cabello escaso, cara enjuta, hipotelorismo y proptosis ocular, nariz afilada, puente nasal pequeño, narinas estrechas, paladar alto, frenillo corto, pliegues palmares poco marcados, escroto hipoplásico, hipotonía con hiperreflexia, dermatitis atópica (Fig 1a). Cariotipo: 46,XY/46,XY,r(18)(p11q21)

Caso 3. T.S.A. Femenino. 2/12 m. Primer producto de padres jóvenes, no consanguíneos. Parto a término con antecedente de hipoxia perinatal leve, peso al nacer 3065 g. Acudió por

retraso en el desarrollo, hipotonía, opacidad corneal y dismorfias faciales. A la Exploración Física se encontró con peso, talla y perímetro cefálico dentro de percentilas normales, fontanela anterior amplia, hemangioma frontal, orbitas profundas, nistagmus, opacidad corneal difusa, nariz afilada, puente nasal deprimido, boca en carpa, paladar alto, pabellones auriculares asimétricos y displásicos, pliegues palmares y plantares aberrantes (Fig. 1b). Cariotipo: 46,XX,t(8;18)(q21;q22).

Caso 4.M.B.S. Femenino. 3a 9/12. Primer producto de padres jóvenes no consanguíneos. Parto a término, sin antecedentes perinatales de importancia, peso al nacer 3100 g. Acudió por retraso en el desarrollo psicomotor. A la Exploración física, peso y talla en percentilas normales, microplagiocefalia, epicanto interno bilateral, paladar alto y ojival, cuadriparesia espástica, tendencia al opistotonos. Cariotipo: 46,XX/ 47,XX,+ acrocentrico/ 48,XX,+ 2 acrocéntricos (88%/ 8% 4%).

Caso 5.M.T.O. Femenino. 16 a. Segundo producto de padres jóvenes no consanguíneos. Sin antecedentes perinatales de importancia, peso al nacer 3000g. Acude por retraso en el desarrollo psicomotor. A la Exploración física, peso y talla en percentilas normales, facies alargada, pabellones auriculares prominentes, clinodactilia del quinto dedo bilateral, cifoescoliosis dorsal. Cariotipo: 47,XX,+ Marcador, posiblemente 18p.

Caso 6.L.A.S.S. Masculino. 6a 5/12. cuarto producto de padres

jóvenes no consanguíneos. Sin antecedentes perinatales de importancia, peso al nacer 3300 g. Acudió por retraso en el desarrollo en el desarrollo psicomotor. A la Exploración física con braquicefalia, implantación baja del cabello, telecanto, puente nasal prominente, filtrum corto, pabellones auriculares de implantación baja, teletelia, clinodactilia del quinto dedo bilateral, pliegue simiano y talo valgo bilaterales, braquidactilia del quinto orjejo, hipoplasia ungueal de 2o. a 5o. dedos, pulgares anchos, hipertriosis lumbar. Cariotipo: 47,XY,+ marcador submetacéntrico pequeño, posiblemente 18q-.

Caso 7.Z.H.N. Femenino. 3m. Tercer producto de padres jóvenes no consanguíneos, antecedente de un hermano sano y un aborto. Gestación normoevolutiva resuelta a las 33 SDG en cesárea por presentación pélvica; permaneció en incubadora por 10 días, peso al nacer 1750 g, talla: 42 cm. Acudió por retraso en el desarrollo psicomotor y dismorfismo facial. A la EF peso y talla por debajo de percentila 3, cráneo con plagiocefalia, frente estrecha, pelo escaso y seco, facies triangular, nariz pequeña y afilada, puente nasal alto, narinas estrechas, filtrum largo, labios delgados, comisuras labiales hacia abajo, ausencia de reflejo velopalatino, pabellones auriculares displásicos con rotación posterior. Presentaba también hipoplasia de pezones, soplo sistólico, dedos de las manos sobrepuestos 5o. sobre 4o. y 2o. sobre 3o. bilateral, pie en mecedora con talo valgo, orjejos de los pies sobrepuestos 1o. sobre 2o. y 5o. sobre 4o, pliegue simiano

izquierdo, genitales con hipoplasia de labios mayores, clitoromegalia y orificio vaginal pequeño. Rx de cráneo: sinostosis de la sutura coronal derecha. Cariotipo: 47,XX,+ marcador acrocéntrico, probablemente 18p.

Caso 8. L.H.A.C. Femenino. 1 7/12. Primer producto de padres jóvenes no consanguíneos. Parto a término, sin antecedentes perinatales de importancia, peso al nacer 2200. Acudió a consulta por discreto retraso en el desarrollo psicomotor. A la exploración física peso y talla por debajo de percentila 3, desproporción cráneo-cara, línea de implantación del cabello baja en región frontal, puente nasal ancho y plano, narinas antevertidas, boca en carpa, filtrum corto, labios gruesos paladar alto, pabellones auriculares prominentes y acopados con rotación posterior, helix y antihelix poco marcadas. Cuello corto, tórax ancho. Cariotipo: 46,XX,/47,XX,+ marcador/ 48, XX + 2 marcadores.

Caso 9. B.S.A. Femenino. 7a 9/12. Tercer producto de padres jóvenes no consanguíneos. Parto a término sin antecedentes perinatales de importancia, peso al nacer 2000. Acude a los 9 meses de edad por dismorfias faciales y retraso en el desarrollo psicomotor. A la exploración física peso y talla en percentila 3, microbraquicefalia, frontal prominente, epicanto, estrabismo, fisuras palpebrales mongoloides, nariz pequeña, paladar alto y ojival, filtrum largo, prognatismo, soplo sistólico por CIV, hipertelorismo mamario, clinodactilia del quinto dedo bilateral, pliegues palmares transversos, pie equinovaro derecho y espasticidad.

Dificultad en la alimentación y retraso psicomotor moderado (Fig. 1c). Cariotipo: 47,XX,+ marcador metacéntrico.

Caso 10.H.G.I. Femenino. 6m. Primer producto de padres jóvenes, no consanguíneos. Parto a término, sin antecedentes perinatales de importancia, peso al nacer 2900 g. Acudió por discreto retraso en el desarrollo psicomotor y discreta hipotonía. A la exploración física peso y talla dentro de percentila 3, occipucio plano, puente nasal ancho y plano, ojos pequeños, fisuras palpebrales cortas y oblicuas, nariz pequeña, paladar alto y arqueado, orejas de implantación baja y cuello corto, manos y pies pequeños, pliegues unicos palmares y ausencia de pliegues de las falanges distales de los dedos I,II,III. Test audiométrico: Hipoacusia leve bilateral (Fig. 1d). Cariotipo: 47,XX,+ marcador metacéntrico.

Caso 11.M.L.N. 2 2/12. Producto del tercer embarazo, antecedentes de 2 abortos previos, padres jóvenes no consanguíneos. Parto a término, sin antecedentes perinatales de importancia, peso al nacer 3100 g. Acude por retraso en el desarrollo psicomotor, hipotonía y dismorfismo facial. A la exploración física se encuentra con peso y talla en percentilas normales, facies plana, pelo escaso y reseco, frente amplia, puente nasal deprimido, orbitas profundas, estrabismo, telecanto, con tendencia al epicanto inverso, filtrum corto, boca en carpa, micrognatia, paladar alto con hendidura central, teletelia, pliegues aberrantes (Fig. 1e). Cariotipo: 46, XX, del(18q).

Caso 12.D.M.L.M. Femenino. 11 meses. Cuarto producto de padres no consanguíneos. Parto gemelar, a término, eutócico, peso al nacer 1900, talla 40 cm. Acudió por retraso en el desarrollo psicomotor muy importante. A la EF peso y talla por debajo de percentila 3, microcefalia, suturas imbrincadas, cráneo asimétrico, hipotelorismo, tendencia a la proptosis ocular, puente nasal ancho y plano, columnela corta, narinas anchas y antevertidas, paladar alto, ortijos imbrincados, pliegues aberrantes. Epilepsia desde los 2 meses de edad, cuadriparesia espástica, hipotonía generalizada. Cariotipo: 46,XY,del(18)(p11).

Caso 13.C.O.F. Masculino. 1 año. Cuarto producto de padres jóvenes no consanguíneos, 2 hermanos vivos, sanos y antecedente de 1 aborto. Durante la gestación cursa con amenaza de aborto, resuelta a las 36 SDG, peso al nacer 2750, talla 50 cms. Acudió por retraso en el desarrollo psicomotor (41% de coeficiente global de desarrollo). A la exploración física peso y talla por debajo de percentila 3, plagiocefalia, microcefalia, pelo escaso, frente prominente, estrabismo convergente, puente nasal deprimido, nariz en pico de loro, filtrum corto con surco naso-labial poco marcado, labios gruesos y evertidos, pabellones auriculares asimétricos, pezones hipoplásicos e hipopigmentados, giba lumbar, dedos largos, tendencia al sinfalangismo, asimetría de miembros inferiores, pliegues aberrantes en palmas y plantas, pene pequeño, escroto hipoplásico, hipopigmentado, poco rugoso, testículo izquierdo en canal inguinal,

dermatitis atópica diseminada con placas eritematoescamosas, hiperqueratosis plantar, hipotonía generalizada. Enfermedad por reflujo gastroesofágico, estudios radiológicos con escoliosis dorsolumbar, asimetría de caderas, acortamiento de MPD. Probable Comunicación interventricular (Fig. 1e). Cariotipo: 46,XY, probable inv(18)(p11.32q21.31).

MATERIAL Y METODOS.

1.- Se realizó la captación de pacientes que clínica o citogenéticamente eran sospechosos de tener una alteración del cromosoma 18, los datos se obtuvieron de los registros de la consulta del servicio de Genética y del laboratorio de citogenética del INP.

2.- Se realizó la extracción de 4 cc de sangre periférica a los 13 pacientes que se incluyeron en el protocolo.

3.- La siembra y cosecha de linfocitos se realizaron de la manera convencional realizada en el laboratorio.

4.- Se realizó la técnica de FISH.

Se utilizaron dos tipos de sondas específicas:

- Sondas de DNA repetitivo inespecífico para secuencias teloméricas, que se usaron en las deleciones y anillos para establecer la integridad telomérica y su localización.
- Sondas específicas para el DNA total del cromosoma 18 (painting) que se utilizaron en los casos con cromosomas marcadores de origen incierto y en los casos de translocaciones e inversiones para establecer algunas de las características del material involucrado como tamaño,

localización y procedencia.

Paciente	Cariotipo	Sonda Utilizada	Proposito del FISH
1	r(18)	Telomérica	Integridad telomérica.
2	r(18)	Telomérica	Integridad telomérica.
3	t(8;18)	Painting	Origen cromosómico.
4	Marcador	Painting	Origen cromosómico.
5	Marcador	Painting	Origen cromosómico.
6	Marcador	Painting	Origen cromosómico.
7	Marcador	Painting	Origen cromosómico.
8	Marcador	Painting	Origen cromosómico.
9	Marcador	Painting	Origen cromosómico.
10	Marcador	Painting	Origen cromosómico.
11	Delección	Telomérica	Integridad telomérica.
12	Delección	Telomérica	Integridad telomérica.
13	Inversión	Painting	Confirmar rearreglo.

En las Figuras 2a, 3a, 4a, 5a y 6a se muestran los cromosomas con Bandas G de algunos de los pacientes.

Se realizó la técnica de FISH, con un estuche comercial provisto por la casa ONCOR, de acuerdo al manual de técnicas de ONCORLIGHT (18). El procedimiento duró dos días en total.

PRIMER DIA.

ELABORACION DE LAMINILLAS PARA LA TECNICA DE FISH.

MATERIAL.

Fijador Carnoy. Solución de Metanol/Acido acético 3:1.

Pipetas pasteur.

Hielo.

Microscopio con contraste de fase.

Etanol 95%.

Después de cultivar la sangre total y de hacer la cosecha de manera habitual (19).

1.- Se removió todo el fijador del tubo con una pipeta

pasteur y se dejó un volumen equivalente al tamaño del botón de linfocitos.

2.- Se resuspendió el botón en el fijador con la pipeta pasteur.

3.- Se añadió fijador en pequeñas cantidades, resuspendiendo con cada adición hasta que la solución estuvo lo suficientemente diluida.

4.- Las laminillas se lavaron y enfriaron en etanol al 95% antes de usarlas.

5.- Se eliminó el exceso de líquido de la laminilla y enjuagó con agua fría.

6.- A una distancia de 20 cms se dejaron caer tres gotas de las células resuspendidas con una pipeta pasteur.

7.- Se fijaron los cromosomas añadiendo fijador con una pipeta pasteur, una sola vez en la misma dirección.

8.- Se eliminó el exceso de líquido y se dejó secar a temperatura ambiente.

9.- Se observó la laminilla en el microscopio de contraste de fases, y se evaluó el índice mitótico, calidad de las metafases y morfología de los cromosomas.

NOTA: Casi siempre se utilizaron laminillas elaboradas el mismo día que se inició la técnica, también se utilizaron laminillas viejas siempre que hubieran estado protegidas del polvo y sin flamear.

TRATAMIENTO CON RNASA Y DESHIDRATAACION.

MATERIAL.

Vasos Coplin de vidrio y plásticos (50 ml).

Baño maría a 37 y 70°C.

Etanol 70%, 80%, 90%, 95%, 100%.

Cámara Húmeda.

Toallas de papel.

Micropipetas.

Puntas de micropipetas, esterilizadas en autoclave.

5, 10, 25 ml pipetas serológicas.

Tubos de microcentrifuga (0.5 ml).

Cubreobjetos.

Incubadora a 37°C.

Reloj de intervalo.

Pinzas.

Recipiente para desecho con capacidad de dos litros.

Termometro con capacidad para medir en un rango de 0 a 100.

Tubos cónicos de centrifuga de 50 ml.

Materiales suplementados por el estuche comercial.

Formamida.

20X SSC.

1000x RNasa.

Sellador para cubreobjetos de vidrio.

PREPARACION DE LOS REACTIVOS DE TRABAJO.

a.- La cámara húmeda se construyó con un recipiente de plástico con tapa, se colocaron gasas húmedas en el fondo y pipetas pasteur atravezadas sobre las gasas. Se tapó y se metió en incubadora a 37°C.

b.- Solución 2X SSC:

50 ml 20X SCC (ajustada a pH 7.0 usando HCl).

450 ml Agua destilada.

Volumen final: 500 ml.

Se verificó el pH y se ajustó a pH 7.0 utilizando HCl. La solución puede prepararse y guardarse a temperatura ambiente durante 1 año.

c.- Solución 1X RNasa:

40 ul 1000X RNasa.

40 ml 2X SSC

Volumen final: 40.04 ml.

Se preparó nueva cada vez.

d.- Solución desnaturizante (70% formamida/2XSSC)

4 ml 20X SSC

8 ml Agua destilada

28 ml Formamida

- Volumen final: 40 ml

- Se preparó fresca cada vez. Se calentó en baño maría a 70°C en un tubo cónico de centrifuga y se añadió a un vaso coplin precalentado para evitar rupturas.

- Todos los reactivos se guardaron a 4°C y antes de usarlos se precalentaron a temperatura ambiente.

TRATAMIENTO CON RNASA.

1.- Se colocaron las laminillas en un vaso coplin y se añadió la RNasa1X.

2.- Se incubó por 1 hora en baño maría a 37°C.

3.- Se enjuagaron 4 veces por dos minutos en 40 ml 2X SSC a temperatura ambiente.

4.- Se deshidrataron las laminillas en una serie de 3 lavados

con etanol a -20°C : 70%, 80% y 95%. Todos los enjuagues se realizaron en vasos coplin durante 2 minutos cada lavado, se inició en 70%.

5.- Se dejaron secar las laminillas.

DESNATURALIZACION.

1.- Se prepararon 40 ml de la solución desnaturalizante, se precalentó a 70°C + 1 grado por cada laminilla extra. Se tuvo mucho cuidado de alcanzar la temperatura adecuada no solo en el baño maría sino también dentro de la solución desnaturalizante.

+ El tiempo y la temperatura fueron muy importantes para mantener la estructura del cromosoma.

2.- Se colocaron 2 minutos exactamente y se agitó continuamente.

3.- Inmediatamente, se transfirieron las laminillas a un vaso coplin que contenía 40 ml de etanol helado al 70% y se dejaron 2 minutos, repetir los enjuagues con etanol frío a 80%, 90% y 100% sucesivamente.

4.- Se dejaron secar las laminillas.

HIBRIDACION.

Se preparó la sonda dependiendo del tipo que se utilizó en cada caso.

- Telomeros.

1.- Se dejó la sonda unos minutos a temperatura ambiente.

2.- Se centrifugó 2-3 seg, y se concentró la sonda en el fondo del tubo.

3.- Se colocó 31 ul de la sonda en un tubo de microcentrifuga

y se desnaturalizó a 70°C por 5 minutos.

4.- Se colocó en hielo.

5.- Se centrifugó 2-3 segundos, y se colocó 30 ul de la sonda en cada laminilla y se cubrió con un cubreobjetos de cristal de 22 x 50 mm.

6.- Se selló el perímetro del cubreobjetos con el pegamento de goma.

7.- Se colocó en la cámara húmeda dentro de la incubadora a 37°C por 4-16 horas.

- Hibridación de cromosoma completo (painting):

1.- Se dejó la sonda unos minutos a temperatura ambiente.

2.- Se centrifugó 2-3 segundos.

3.- Se colocó 10 ul de la sonda en un tubo de microcentrifuga y se desnaturalizó a 70°C por 10 minutos.

4.- Se centrifugó 2-3 segundos e incubó en un baño maría a 37°C durante 2.5 hrs con lo que se alineó el DNA.

5.- Se colocó en hielo.

6.- Se centrifugó 2-3 segundos, y se colocó 10 ul de la sonda en cada laminilla y se cubrió con un cubreobjetos de cristal de 25 x 25 mm.

7.- Se selló el perímetro del cubreobjetos con el pegamento de goma.

8.- Se colocó en la cámara húmeda dentro de la incubadora a 37°C por 4-16 horas.

SEGUNDO DIA.

MATERIAL y METODOS.

- Vasos Coplin. Plástico y cristal.

- Baño maría 43 y 37°C.
- Microscopio de fluorescencia.
- Micropipetas.
- Puntas de micropipetas.
- Pinzas.
- Gasas.
- Hielo.
- Reloj de intervalo.
- Recipiente para desechos líquidos.
- Pipetas serológicas de 5, 10 y 25 ml.
- Agua destilada.
- Termómetro con rango de 0 a 100°C.
- Tubos cónicos de propileno de 50 ml.

Material suplementado por el Kitt.

- Antifade.
- Ioduro de propidio/Antifade.
- 10X PBD.
- Solución bloqueadora I.
- Solución bloqueadora II.
- Avidina marcada con fluoresceína.
- Anticuerpo antiavidina.
- Cubreobjetos de plástico.

PREPARACION DE REACTIVOS.

a).- 1X PBD.

10X PBD (se precipita en 2 fases cuando se tiene almacenado).

390 ml 10X PBD.

3510 ml agua destilada.

Volumen final 3900 ml.

Dura en refrigeración hasta 1 año.

b).- 2X SSC.

50 ml 20X SSC pH 7.0 ajustado con HCl.

450 ml Agua destilada.

Volumen final 500 ml.

Se verificó el pH. (La solución puede almacenarse a temperatura ambiente por 1 año).

3.- Solución Post-lavado.

SOLUCION POSTLAVADO 2. Sondas teloméricas y de painting.

4 ml 20X SSC

16 ml Agua destilada.

20 ml Formamida.

Volumen final: 40 ml.

Preparar nuevas soluciones cada vez.

4.- SOLUCION 0.1X SCC (Sondas de painting)

2 ml 2X SCC

38 ml Agua destilada.

Volumen final 40 ml.

LAVADO POST-HIBRIDACION.

1.- Se precalentaron las soluciones post-lavado como se indica más adelante, se verificaron las temperaturas dentro de los coplin.

* Las laminillas con sonda telomérica se lavaron de la siguiente manera:

- En un vaso coplin se colocaron 40 ml de la solución post-lavado 2 a 37°C se colocaron las laminillas y se agitaron en

forma intermitente durante 15 minutos.

- Se enjuagaron en 40 ml de 2X SCC a 37°C por 8 minutos con agitación intermitente.

* Las laminillas de painting se lavaron de la siguiente manera:

- En un vaso coplin con 40 ml de la solución post-lavado 2 a 43°C se colocaron las laminillas y se agitaron durante 15 minutos.

- Se enjuagaron en 40 ml de 0.1X SCC a 60°C por 15 minutos con agitación intermitente.

2.- Se colocaron las laminillas en 40 ml de 1X PBD a temperatura ambiente en un vaso coplin. (Pueden almacenarse durante 2 semanas a -4°C o proceder inmediatamente con la detección).

DETECCION.

No se permitió que la laminilla se secará para evitar señal fluorescente inespecífica.

1.- Se sacaron las laminillas del PBD una a la vez y se quitó el exceso de líquido.

2.- Se aplicaron 60 ul de la solución bloqueadora 1 a cada laminilla y se colocó un cubreobjetos plástico sobre la laminilla y se dejaron 5 minutos a temperatura ambiente.

3.- Con unas pinzas se removió el cubreobjetos cuidadosamente, y se escurrió la laminilla de la base. Se guardó el cubreobjetos.

4.- Se aplicaron 60 ul de avidina marcada con fluoresceína y se recolocó el cubreobjetos, se incubaron 20 minutos en una

cámara húmeda a 37°C.

5.- Se quitó y desechó el cubreobjetos, se lavó en tres ocasiones en 1X PBD a temperatura ambiente durante 2 minutos.

AMPLIFICACION.

1.- Se aplicaron 60 ul de la solución bloqueadora 2 a cada laminilla. Se colocó un cubreobjetos plástico nuevo sobre la laminilla, y se dejó 5 minutos a temperatura ambiente.

2.- Con unas pinzas se removió el cubreobjetos cuidadosamente, y se escurrió la laminilla de la base. Se guardó el cubreobjetos.

3.- Se aplicaron 60 ul de Anticuerpo anti-avidina y se recolocó el cubreobjetos, se incubó 20 minutos en una cámara húmeda a 37°C.

4.- Se quitó el cubreobjetos y se desechó, se lavó 3 veces en 1X PBD a temperatura ambiente durante 2 minutos con agitación intermitente.

5.- Se aplicaron 60 ul de la solución bloqueadora 1 a cada laminilla. Se colocó un cubreobjetos plástico nuevo sobre la laminilla y se dejó 5 minutos a temperatura ambiente.

6.- Con unas pinzas se removió el cubreobjetos cuidadosamente y se escurrió la laminilla de la base. Se guardó el cubreobjetos.

7.- Se aplicaron 60 ul de avidina marcada con fluoresceína y se recolocó el cubreobjetos, y se incubó 20 minutos en una cámara húmeda a 37°C.

8.- Se quitó y desechó el cubreobjetos se lavaron las laminillas 3 veces en 1X PBD a temperatura ambiente durante 2

minutos.

TINCIÓN DE LOS CROMOSOMAS.

- 1.- Se tiñeron las laminillas añadiendo 18 μ l de yoduro de propidio con solución anti-decadencia a cada laminilla.
- 2.- Se cubrió con cubreobjetos de cristal.
- 3.- Se selló con pegamento.
- 4.- Se observó al microscopio de fluorescencia.

INTERPRETACION.

- 1.- La señal se observó concentrada en el área blanco específica (telómeros, centromeros, etc). En cada paciente se analizaron 15 metafases.

Cuando la señal observada no fue satisfactoria se amplificaron otra vez siempre y cuando no existiera demasiada hibridación inespecífica, con las sondas de painting es suficiente 1 sola amplificación, con las de telómeros por lo general, se requiere más de 1 amplificación.

FOTOGRAFIA.

- Se tomaron fotografías de todos los casos analizados, en algunas se tomaron más de una y se realizó interpretación de las mismas.

RESULTADOS.

CASOS 1 y 2:

Pacientes con anillos del cromosoma 18.

El método de FISH con sondas teloméricas en ambos pacientes no reveló señal telomérica dentro del cromosoma en anillo, en 30 metafases analizadas (fig 2b).

CASO 3:

Paciente con la translocación (8;18).

Se realizó FISH con sonda para el DNA de todo el cromosoma 18. Se analizaron 20 metafases en las que se encontraron sólo 2 señales una sobre el cromosoma 18 normal y otra sobre el derivativo con el centrómero del cromosoma 18. No se encontró señal sobre el derivativo del cromosoma 8, lo cual hace sospechar que la translocación no es balanceada. Esta pendiente la realización de FISH con sonda para el DNA de todo el cromosoma 8 (fig 3b).

CASOS 4,5,6,7,8,9 y 10:

Pacientes con cromosomas marcadores de origen desconocido.

Se realizó FISH con sonda para todo el cromosoma 18. Se analizaron 20 metafases en cada caso.

- Marcadores acrocéntricos: (Casos 4, 5, 7, 8)

Se encontró señal sobre los cromosomas 18 normales, sin identificar señal en el marcador acrocéntrico, lo cual indica que se originó de un cromosoma diferente al 18 (fig 4b).

- Marcador submetacéntrico pequeño (Caso 6)

Al igual que en los anteriores, se estableció un origen diferente del cromosoma 18.

- Marcadores Metacéntricos: Se encontraron 3 señales en todas las metafases analizadas, dos correspondían a los cromosomas 18 normales y la tercera al cromosoma marcador, identificándolo como un isocromosoma de brazos cortos del cromosoma 18 (fig 5b).

CASOS 11 y 12:

Pacientes con deleciones terminales del cromosoma 18.

Se realizó FISH con sonda telomérica, y se analizaron 30 metafases. En un 75% de ellas se encontró señal sobre los dos brazos del cromosoma 18, en los dos casos (fig. 6b)

CASO 13:

Paciente con un rearrreglo en el cromosoma 18. Probable inversión. Se realizó FISH con sonda de todo el cromosoma 18 se observaron sólo dos señales, una sobre el cromosoma 18 normal y otra sobre un cromosoma metacéntrico sin encontrar señales extras con lo que se confirmó la inversión pericéntrica del cromosoma 18 (Fig 7b).

Caso	CITOGENETICA	FISH
1	46,XX,r(18)(p11q22)	Monosomía 18p y 18q.
2	46,XY/46,XY,r(18)(p11q21)	Monosomía 18p y 18q.
3	46,XX,t(8;18)(q21;q22)	Monosomía 18q ¿Translocación compleja?
4	46,XX/47,XX,+mar/48,XX,+2 mar.	No proviene del 18.
5	47,XX,+ mar.	No proviene del 18.
6	47,XY,+ mar.	No proviene del 18.
7	47,XY,+ mar.	No proviene del 18.
8	47,XY,+ mar.	No proviene del 18.
9	47,XY,+ mar.	18. Tetrasomía 18p.
10	47,XY,+ mar.	Tetrasomía 18p.
11	46,XX,del(18q).	Monosomía 18q.
12	46,XY,del(18)(p11).	Monosomía 18p.
13	46,XY,inv(18).	Inversión pericéntrica.

DISCUSION.

De las enfermedades genéticas, las alteraciones cromosómicas forman una categoría principal de anormalidades. Hasta la fecha se han descrito más de 60 síndromes de etiología cromosómica que en forma colectiva son más comunes que todas las enfermedades mendelianas juntas. Se presentan en el 0.7% de los nacidos vivos y en cerca del 2% de todos los embarazos. El cromosoma 18 es uno de los más frecuentemente involucrados en alteraciones cromosómicas, la trisomía 18, la monosomía 18p y 18q y los anillos del cromosoma 18 han sido ya caracterizadas desde el punto de vista clínico y existen infinidad de casos reportados en la literatura, sin embargo la caracterización citogenética completa no ha podido ser descrita con tanta precisión. Actualmente con la incorporación de la citogenética molecular al estudio de las aberraciones cromosómicas se ha facilitado el conocimiento de los mecanismos que dan lugar a los rearrreglos y se ha obtenido la delineación de nuevos síndromes que se han incorporado a los ya descritos.

En el presente trabajo se reunieron 13 pacientes con probables alteraciones estructurales del cromosoma 18 y se estudiaron mediante la técnica de FISH. Ver cuadro 1.

En 8 de los 13 pacientes fue posible establecer un diagnóstico citogenético con la técnica de FISH. En los 4 restantes se puede afirmar que el origen del marcador no era del cromosoma 18.

En los pacientes 1 y 2 con cromosomas en anillo

descartó la presencia de telómeros en ellos, confirmando así que el fenotipo clínico del paciente es ocasionado por monosomía parcial de brazos cortos y largos del cromosoma 18. En el cuadro 2 se hace una comparación del fenotipo de nuestros pacientes y el descrito en la literatura en pacientes con anillo del cromosoma 18.

Cuadro 2.

Características clínicas de los pacientes con anillo del cromosoma 18.

	Caso 1	Caso 2	Gorlin et al. (ref. 17)
Sexo	F	M	F>M
Peso al nacer	2000	2500	2700 (Promedio)
Microcefalia	+	+	+
Epicanto	+	-	+
Nistagmus	-	+	+
Pabellones displásicos	+	+	+
Clinodactilia	+	+	+
Ortejos en gatillo	+	-	-
Labio hendido	+	-	+
Retraso Mental	+	+	+

Los hallazgos citogenéticos con FISH en el paciente 3 confirmaron monosomía 18q (q22->qter), y hacen sospechar que:

- 1) Pueda tratarse de una translocación compleja en la que participan más de dos cromosomas.
- 2) Que el extremo cromosómico libre hubiera logrado sellarse por acción de la telomerasa.

En el cuadro 3 se describen las alteraciones fenotípicas de nuestra paciente (caso 3), las del paciente 11 con monosomía 18q y las de la monosomía 18q, reportadas en la literatura.

CUADRO 3.

Comparación de los cuadros clínicos de los casos 3 y 11 y la monosomía 18q.

	Caso 3	Caso 11	Gorlin et al. (ref. 17)
Sexo	F	F	F>M
Peso	3065	3100	2940
Hipotonía	+	+	+
Retraso Ponderal	-	-	+
Prognatismo	-	-	+
Orbitas profundas	+	+	+
Nistagmus	+	-	+
Estrabismo	-	+	+
Opacidad Corneal	+	-	+
Boca en carpa	+	+	+
Teletelia	-	+	+
Retraso Mental	Moderado	Moderado	Moderado
Paladar Hendido	-	+	-
Pliegues aberrantes	+	+	+

En los pacientes con un cromosoma marcador extra, casos 4 a 10, solo en 2 fue posible establecer que se trataba de marcadores provenientes del cromosoma 18 y que el fenotipo clínico era compatible con tetrasomía de brazos cortos del cromosoma 18. En el cuadro 4 se comparan los datos clínicos de los casos 9 y 10 con las tetrasomías 18p reportadas en la literatura.

CUADRO 4.

Características clínicas de los pacientes 9 y 10 comparadas con los 12 casos con tetrasomía 18p reportados en la literatura.

	n = 12 *	Caso 9	Caso 10
Sexo (Fem/Masc)	6:1	F	F
Edad de ingreso	7s-36 a	6 m	4 m
Edad	Madre 31.4 a	34 a	19 a
	Padre 32.5 a	36 a	26 a
Peso al nacer (g)	2700	2000	2450
Talla baja (<percentila 3)	3	-	-
Microcefalia	3	-	-
Retraso psicomotor (moderado a severo)	12	Moderado	Leve
Espasticidad	10	+	+
Pabellones displásicos/ implantación baja	9	+	+
Estrabismo	8	+	+
Fisuras palpebrales oblicuas.	6	-	+
Puente nasal plano	6	-	+
Nariz pequeña afilada	7	+	+
Paladar alto arqueado	6	+	+
Filtrum largo	7	+	+
Boca pequeña	7	+	+
Prognatismo	5	+	-
Pliegue simliano	6	+	+
Escoliosis	5	+	+
Cardiopatía	1	+	-
Malformación renal	1	-	-

(+)= Presente, (-)= Ausente, a= años, s= semanas, m= meses.

* Ref. 8 y 9.

En los dos casos con deleciones de brazos cortos o largos del cromosoma 18, mediante FISH, se confirmó la presencia de telomeros por lo que, de acuerdo con la literatura, las deleciones distales más bien representan deleciones intersticiales que ocurren en regiones subteloméricas. En los cuadros 3 y 5 se comparan los cuadros clínicos de nuestros pacientes con los reportados para las monosomías 18p y 18q.

CUADRO 5.

Comparación de las características clínicas del caso 12 y la monosomía 18p.

	Caso 12	Gorlin et al. (ref. 17)
Sexo	F	F>M
Peso	1900	2800
Retraso Mental	++	Variable
Microcefalia	+	+
Cráneo asimétrico	+	-
Hipotelorismo	+	-
Puente nasal deprimido	+	+
Pabellones displásicos	-	+
Ortejos imbrincados	+	-
Cardiopatía	+	+
Crisis Convulsivas	+	+

En el paciente portador de una inversión pericéntrica del cromosoma 18 las alteraciones detectadas por medio de FISH demostraron que el cromosoma 18 sólo estaba invertido y no existía otro cromosoma involucrado en el rearrreglo, el fenotipo del paciente puede no estar relacionado con el rearrreglo cromosómico o bien es posible que la inversión haya ocasionado rupturas intragénicas o que afecte la expresión génica por efectos posicionales sobre los mismos.

Concluimos que la técnica de hibridación in situ con fluorescencia ayuda a las técnicas de citogenética convencional a esclarecer la naturaleza de los rearrreglos cromosómicos, pudiendo establecer relaciones fenotípicas con cuadros antes ya descritos y también ayuda en la delineación de nuevos síndromes genéticos. Esto es muy importante ya que cuando se establece un diagnóstico citogenético se asesora a los padres del riesgo de recurrencia, evolución y pronóstico basándose en lo ya descrito en la literatura.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA



FIGURA 1.- La Fotografía muestra las características faciales de los pacientes con: a) Cromosoma 18 en anillo. b) Translocación (8;18) Datos predominantes de deleción 18q. c y d) Marcador metacéntrico correspondiente a tetrasomía 18p. e) Deleción 18q. f) Inversión del cromosoma 18.

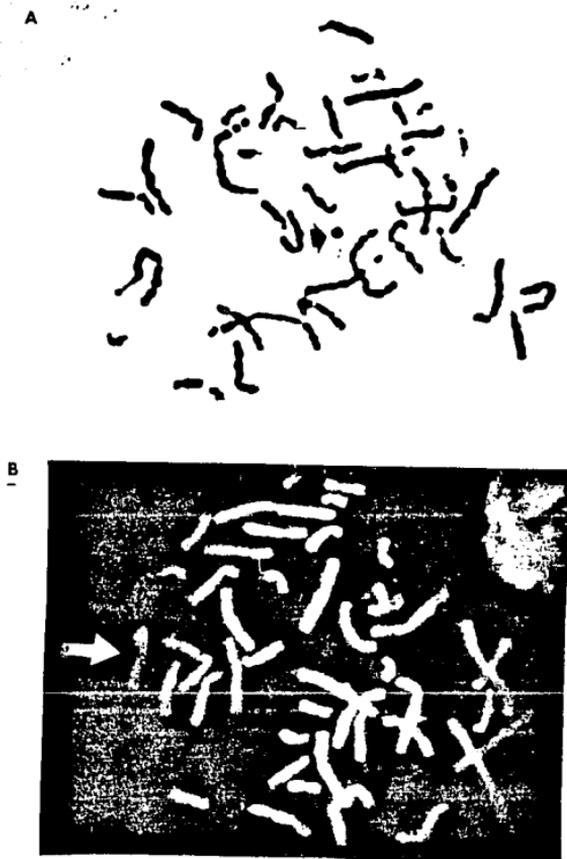


FIGURA 2.- a) Bandas G en el anillo del cromosoma 18, b) FISH con sonda telomérica, la flecha muestra el anillo sin señal telomérica.

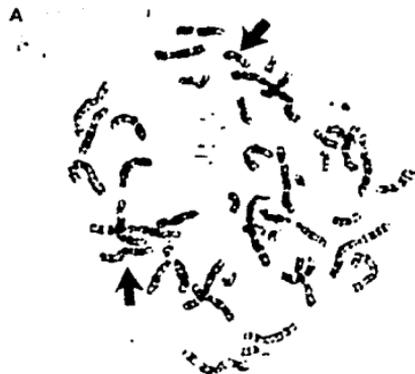


FIGURA 3. a) Bandas G en la translocación (8;18) b) FISH utilizando sonda de cromosoma 18 completo, se observan sólo dos señales, la cabeza de flecha indica el cromosoma 18 normal y la flecha el derivativo 18.

A



B

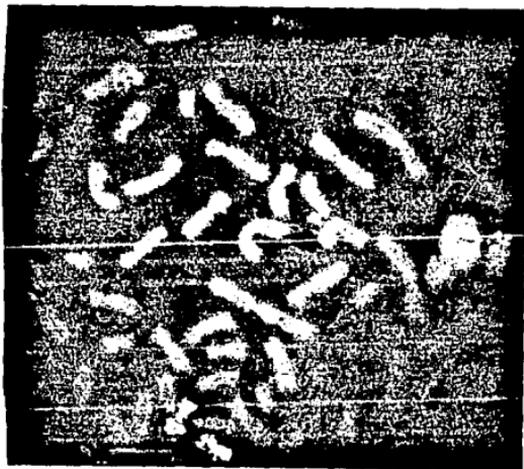


FIGURA 4.- a) Bandas G que muestran un cromosoma acrocéntrico extra. b) Imagen del FISH que muestra ausencia de señal sobre el marcador lo que indica que no proviene de una cromosoma 18.

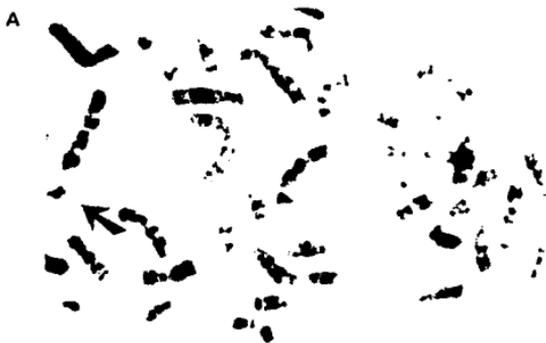


FIGURA 5.- a) Los cromosomas en metafase muestran un marcador metacéntrico extra señalado por la flecha. b) El estudio con FISH muestra tres señales, 2 sobre los cromosomas 18 normales y 1 sobre el marcador, lo que indica que se trata de un isocromosoma 18p.

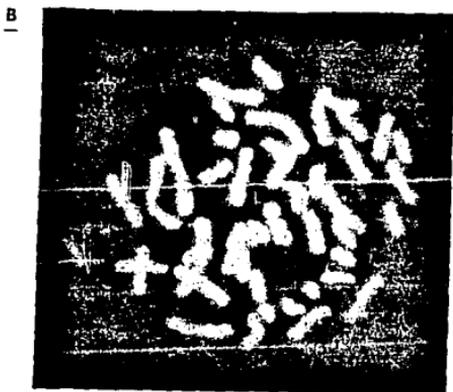
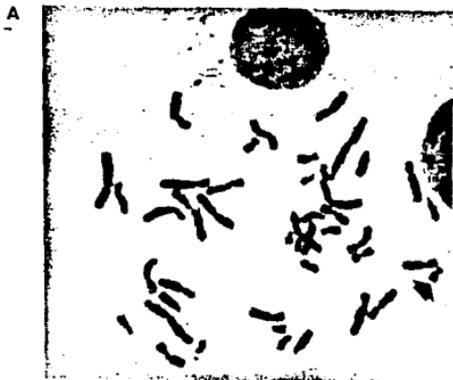


FIGURA 6.- a) Cariotipo que muestra una deleción 18q. b) FISH con sonda telomérica corroborando su integridad en el cromosoma 18 delecionado.



FIGURA 7.- FISH en el paciente con la inversión pericéntrica del cromosoma 18, se observan dos señales, una sobre el cromosoma 18 normal y otra sobre un cromosoma metacéntrico que corresponde al cromosoma 18 invertido.