

00346



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

17

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**DETECCIÓN DE MOSAICISMO EN
PAREJAS CON HIJO CON TRISOMIA
21 POR NO-DISYUNCIÓN.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA CELULAR)**

**PRESENTA:
SANDRA ELENA RAMOS ANGELES**

Director de Tesis: Med. Cir. Victoria del Castillo R.
Cotutor: M. en C. Dora Gilda Mayén M.

299208



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

AGRADECIMIENTOS

- A todas las personas que hicieron posible la realización de este trabajo: mis maestras, compañeras (os) y amigas (os) por su ayuda a lo largo de mi formación académica.
- A toda mi familia, en especial a mis padres, mi hermano y a mi abuelo Rafael.
- A todos mis amigos y amigas por compartir los buenos y no tan buenos momentos.

I N D I C E

RESUMEN	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	
A) ANTECEDENTES	3
B) POSIBILIDADES DE RIESGO	4
C) ORIGEN DEL CROMOSOMA EXTRA	6
RECURRENCIA DEL SINDROME DE DOWN	
D) MOSAICOS	8
HIBRIDACION <i>IN SITU</i> CON FLUORESCENCIA	10
JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
OBJETIVOS	12
HIPOTESIS	13

MATERIAL Y METODOS	13
METODOLOGIA	14
TECNICAS	16
ANALISIS CELULAR	18
CONSIDERACIONES ETICAS Y CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO	19
RESULTADOS	20
DETECCION DE MOSAICISMO POR CITOGENETICA CLASICA	21
CITOGENETICA MOLECULAR. FISH	31
DISCUSION	35
HIPERMODALES	39
OTRAS TRISOMIAS	41
DISCUSION P12 Ro	42
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	45

DETECCIÓN DE MOSAICISMO EN PAREJAS CON HIJO CON

TRISOMIA 21 POR NO-DISYUNCION

RESUMEN

El Síndrome de Down (SD) es la patología genética más frecuente en la especie humana (Jones, 1990) existen cinco variedades citogenéticas: trisomía 21 regular, translocación, isocromosoma 21q21q, mosaico y trisomía parcial del cromosoma 21. Las características clínicas del síndrome son bien conocidas, entre ellas: Hipotonía muscular, perfil facial aplanado, aberturas palpebrales oblicuas, pabellones auriculares displásicos, hiperflexibilidad, pélvis displásica y clinodactilia (Salamanca, 1990). Dado que es una entidad no letal al nacimiento, es de gran importancia detectar a las parejas con riesgo de recurrencia mayor al 1.5% de la población general. El objetivo de la investigación fue detectar mosaicismo del Síndrome de Down en parejas menores a 35 años con uno o más hijos con trisomía 21 por no-disyunción. Para determinar la presencia de células con trisomía 21 en ambos miembros de la pareja se realizó citogenética clásica así como hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) en linfocitos de sangre periférica. La población de estudio se integró por tres grupos: I) 5 parejas con hijos sanos; II) 22 parejas con un hijo con SD por trisomía 21 regular; III) 3 parejas con más de un hijo con SD con trisomía 21 regular (recurrentes). Las parejas fueron referidas de la consulta de Genética de los Institutos Nacionales de Pediatría y de Perinatología. El tamaño de muestra fue determinado por el número de parejas que cumplieron con los criterios de inclusión y que aceptaron entrar al protocolo, en un periodo de dos años. A todas las parejas se les realizó historia clínica con árbol genealógico y estudio de citogenética clásica y molecular: Se realizó cariotipo a todos los individuos que entraron al estudio. El análisis de citogenética clásica para búsqueda de mosaicismo, se realizó por medio de bandas G, en 200-400 metafases por individuo, se realizó conteo de número cromosómico e identificación de trisomía 21. El estudio de citogenética molecular se realizó con FISH en 1000 metafases para cada individuo con la sonda centromérica para los cromosomas 13/21, D13Z1/D21Z1 (Oncor/USA), marcada con digoxigenina/FITC. Se consideraron como

células positivas, o bien trisómicas, aquellas que presentaron tres señales sobre los cromosomas pertenecientes al grupo G (cromosoma 21). La eficiencia de hibridación obtenida en este trabajo fue de 97%. El criterio para determinar el valor umbral para considerar mosaicismo, fue el propuesto por Anastasi y cols. (1990), quienes utilizaron la frecuencia normal media de las células trisómicas más dos veces su desviación estándar. Este valor se obtuvo de los resultados del grupo control, tanto para citogenética clásica como para FISH y los individuos que mostraron valores más altos que el valor umbral para ambos análisis fueron considerados mosaico. Para nuestro trabajo el valor umbral por citogenética clásica fue de 0.52 y de 0.30 para citogenética molecular. Sólo cuatro individuos se consideraron mosaico, de estos sólo uno fue del sexo femenino (del grupo II) y tres del sexo masculino (uno del grupo II y dos del grupo III).

En relación con los altos valores que obtuvo la madre (grupo II), pueden relacionarse con: a) Factores externos, por inducción por medicamento, debido a que esta madre se encuentra en tratamiento continuo para asma; o con b) Un evento asociado a la inversión pericéntrica del cromosoma 9 que presenta, éste polimorfismo se ha reportado como riesgo para tener descendencia con SD en individuos con esta inversión (Murthy y Prabhakara, 1990).

En cuanto a padres que obtuvieron valores altos de células con trisomía 21, se pueden considerar dentro del 5% de los casos de SD por trisomía 21 regular que se originan por errores de no-disyunción paterna (Petersen y cols., 1993). Los mecanismos asociados a la no-disyunción paterna propuestos son: alteraciones en secuencias importantes de apareamiento o en estructuras importantes en la disyunción cromosómica.

Es importante mencionar que la segunda trisomía más frecuente fue la del cromosoma X, que se presentó en 4 mujeres (grupo II) debido a que se ha propuesto como factor de riesgo para tener descendencia con trisomía 21 (Juberg y cols., 1985; Krishna-Murthy y Farag, 1995).

Es relevante realizar trabajos de este tipo donde se utilicen metodologías que permitan analizar un gran número de células, para determinar el porcentaje real de individuos mosaico para trisomía 21 y conocer el riesgo de recurrencia específico para parejas jóvenes con un hijo con SD con historias clínicas que indiquen un riesgo mayor que la población general.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

A) Antecedentes.

El Síndrome de Down (SD) es una de las alteraciones cromosómicas más frecuentes en el mundo, en México aproximadamente se presenta en 1 de 700 recién nacidos vivos. Las características fenotípicas del síndrome son bien conocidas las cuales varían entre los pacientes pero nunca producen un fenotipo diferente y en general los pacientes presentan: hipotonía muscular, talla baja, retraso psicomotor, cuello corto y ancho, puente nasal deprimido, pabellones auriculares displásicos, fisuras palpebrales mongoloides, boca abierta y lengua protuyente. Las manos son cortas y anchas, frecuentemente con un solo pliegue palmar transversal y clinodactilia. Un 30-40% de los pacientes presentan malformaciones cardíacas congénitas, y pueden presentar además atresia duodenal (Epstein, 1995; Jones, 1990; Salamanca, 1990; Thompson y cols., 1991) y otras malformaciones. La pubertad es normal en ambos sexos, pero la fertilidad sólo es conocida en la mujer. La esperanza de vida durante la primera década está determinada por presencia de enfermedades cardiopulmonares y el 12% de los pacientes sobreviven hasta los 50 años (Epstein, 1995).

Desde el punto de vista citogenético, el SD se produce por una trisomía de la región q22 del cromosoma 21 que puede originarse por las siguientes variedades: a) trisomía 21 regular en 94%, b) translocación cromosómica que involucra al cromosoma 21 con otros

autosomas, particularmente del grupo D y G en 3.3%, c) isocromosoma 21q21q en 0.1% (Dagna y cols., 1990) y d) mosaico celular en 2.4%, que se refiere a la presencia simultánea en un mismo individuo de una línea cromosómica normal y una trisómica, en proporciones variables (Dagna y cols., 1990 y Jones, 1988). Cabe señalar que existen otras alteraciones del cromosoma 21 como la duplicación de la banda 21q22.3 que puede generar el SD y que se presentan en menor frecuencia (Nadal y cols., 1997).

B) Posibilidades de riesgo

Con relación a la incidencia, se ha reportado que el riesgo de tener hijos con SD puede incrementarse por la presencia de alteraciones citogenéticas o antecedentes familiares en los padres que se comportan como factores predisponentes. Estos factores son que:

- Alguno de los padres sea portador de una translocación cromosómica que involucre el cromosoma 21.
- Alguno de los padres sea portador de un rearrreglo cromosómico que pueda tener efectos intercromosómicos y generar no-disyunción.
- Exista edad materna avanzada (35 años o más).
- La pareja haya tenido un hijo con SD o una inversión pericéntrica en un cromosoma 9.

En lo que respecta a los padres portadores de translocación, se puede determinar el riesgo de presentar un hijo con SD porque se

conoce el apareamiento y la segregación de los cromosomas translocados y normales en la producción de los diferentes gametos.

En cuanto a los efectos intercromosómicos, se ha propuesto que contribuye a la generación de no-disyunción, a este respecto Murthy y Pabhakara (1990) reportaron el caso de una mujer de 25 años con una inversión pericéntrica en 9qh, con un hijo con SD y abortos previos, al analizar sus metafases observaron frecuencias elevadas de endorreduplicación, división prematura del centrómero, poliploidías y aneuploidías, por lo que los autores sugirieron que este tipo de inversión puede tener efectos intercromosómicos en errores mitóticos y meióticos que predispongan a abortos y a descendencia con SD.

La asociación del SD con la edad materna avanzada se encuentra bien estudiada y reconocida desde hace 60 años, se sabe que a mayor edad (más de 35 años) la posibilidad de tener un hijo con SD se incrementa de manera significativa (Hassold y cols., 1996). Se sugiere que la tasa de riesgo para tener hijos con SD es ligeramente alta para mujeres menores de 20 años y la tasa aumenta gradualmente de manera lineal hasta los 30-31 años, después de este rango aparentemente hay un aumento abrupto hacia un patrón exponencial, sin embargo, no está claro si esto representa un verdadero cambio en él o los mecanismos responsables para la no-disyunción o si se deriva de dos procesos, uno constante y uno exponencial, que coexisten en la edad de maternidad (Epstein, 1995).

Sin embargo, aunque las mujeres mayores de 35 años tienen un riesgo mayor de tener hijos cromosómicamente anormales, menos del 50% de los nacimientos con trisomía 21 provienen de esta población (Juberg y cols., 1985), por lo tanto la mayoría de los SD nacen de madres jóvenes, por lo que es sumamente importante determinar factores de riesgo en poblaciones sanas y jóvenes.

En el caso de parejas que ya tienen un hijo con SD con trisomía 21 regular, por estudios poblacionales se ha encontrado que tienen un riesgo teórico de 1.5% de tener un segundo hijo afectado por esta u otra cromosomopatía, sin tomar en cuenta la edad materna, lo cual es mucho más alto que el encontrado en la población general. Datos basados en amniocentesis de mujeres menores de 30-35 años con hijo previo con trisomía 21 demuestran que el riesgo es menor que el de la madre añosa (Epstein, 1995). Hasta la fecha, las causas de la recurrencia no se han establecido con certeza, pero existen evidencias que sugieren que la consanguinidad, la predisposición genética a la no disyunción y la presencia de mosaico están relacionadas con este fenómeno (Alfi, y cols., 1980; Harris y cols., 1982; Krishna-Murthy y Farag, 1995).

C) Origen del cromosoma extra

La no disyunción parental puede ocurrir en cualquiera de las divisiones meióticas, la tasa reportada para la primera y segunda división meiótica en madres es de 80/20% mientras que en los padres es de 60/40%, respectivamente (Gorlin y cols., 1990). Por medio de

estudios citogenéticos y moleculares se ha determinado el origen parental del cromosoma 21 extra en los casos de trisomía 21 de origen mitótico, este tipo de origen no tiene aumento de edad materna. La edad materna se restringe a los casos de no-disyunción meiótica, ya sea I o II (Petersen y cols., 1991; Petersen y cols., 1992 y Hassold y cols., 1996). Por otro lado, Lamb y cols. (1996) en estudios recientes, proponen que las causas más importantes en la formación de las trisomías humanas son la división prematura del centrómero en meiosis I y los errores en la recombinación genética, ya que observaron que un aumento en la recombinación genética cercana al centrómero incrementa la no-disyunción en meiosis II, mientras que la ausencia de recombinación en esta región parece predisponer a una no-disyunción en meiosis I.

Alfi y cols. (1980) sugirieron que este tipo de alteraciones numéricas podrían ser producidas por acción de un gen relacionado con la no-disyunción en la especie humana, cinco años más tarde Antonarakis y cols. (1985) identificaron un haplotipo ligado a sitios de ADN polimórficos en el brazo largo del cromosoma 21 que sugiere una tendencia a la no-disyunción y una predisposición a la trisomía 21 en una población griega de 20 familias afectadas cuyas frecuencias fueron comparadas con 27 familias con descendencia normal pero se desconoce que tan eficiente es este haplotipo como marcador para centrómeros potencialmente involucrados con la no-disyunción.

RECURRENCIA DE SINDROME DE DOWN

D) Mosaicos

Citado en 1961, Clark y cols., se describió el primer caso de mosaicismo de trisomía 21/normal en un paciente que presentaba algunas características fenotípicas del síndrome e inteligencia normal. Citado en 1969, Richards indicó que el mosaico celular frecuentemente involucraba una línea normal, sin embargo, existen evidencias donde se presentan mosaicos más complejos, que incluyen trisomías y tetrasomías para los cromosomas del grupo G, y mosaicos estructurales (generalmente translocaciones G/G) con líneas normales (Wilson, Towner y Forsman, 1980).

Anteriormente se asumía que el cromosoma 21 extra en los individuos con SD con mosaico provenía de una no-disyunción mitótica en un cigoto cromosómicamente normal. Sin embargo, actualmente los estudios sobre el análisis de las edades maternas de los individuos con SD en mosaico, sugieren que una buena proporción de estos casos se debe a una no-disyunción meiótica. Al respecto, Richards (1974) y Niikawa y Kajii (1984) propusieron que el 80% de estos mosaicos provienen de una no disyunción meiótica seguida de un error mitótico "normalizador" (Armendares y cols., 1990), es decir, dos errores de no-disyunción: El primero en la gametogénesis parental y el segundo en mitosis embriogénica (Harris y cols. , 1982).

Actualmente, la presencia de mosaico no es privativa de los pacientes con SD, se ha propuesto que alguno de los padres sea portador de 2 líneas celulares, una normal en alto porcentaje y otra trisómica en muy bajo porcentaje, con un fenotipo completamente normal debido a la baja frecuencia de células con trisomía 21; es muy probable que esta anormalidad cromosómica pase inadvertida al diagnóstico, ya que el número de células que habitualmente se analiza no es suficiente para excluir la presencia de mosaico con una proporción de células aneuploides menor al 10% (Armendares y cols., 1990). Además, la línea trisómica puede estar confinada a ciertos tejidos dentro de los cuales se puede encontrar el gonadal, de tal manera que una célula germinal trisómica puede originar el SD en la descendencia (Harper, 1988). Otro factor importante en la detección de mosaicismo es la proliferación preferencial de la línea normal con respecto a la trisómica, ya que se puede originar un mosaico críptico con muy pocas manifestaciones clínicas del SD o ausencia total.

Para estimar el mosaicismo parental como causa de trisomía 21 regular, se han realizado varios estudios, sin establecer claramente cual es el porcentaje, ya que mientras unos investigadores determinaron que sólo el 1.6% se debe a mosaicismo parental, otros proponen que es de 2.7% y otros proponen, que el 19% de los casos de trisomía 21 puede ser provocado por mosaico (11% de origen materno y 8% de origen paterno). No obstante, es muy probable que para conocer el riesgo de recurrencia de los casos de mosaico parental, se debe considerar el grado de mosaicismo somático y el gonadal, sin embargo determinarlo no es sencillo por la dificultad de obtener biopsia o bien no es práctico

en todos los casos (Vogel y Motulsky, 1974; Uchida y Freeman, 1986 y Krishna-Murthy y Farag, 1995). Por esta razón es importante que se analice un gran número de células que permita establecer con más confianza si uno de los padres puede ser portador de un mosaicimo que aumente el riesgo de tener descendencia con trisomía 21. Es necesario aplicar una metodología adecuada con la cual sea rápido y eficiente detectar este tipo de mosaicismos, de tal manera que pueda calcularse el riesgo de tener otro hijo con SD.

HIBRIDACION *IN SITU* CON FLUORESCENCIA (FISH)

Las técnicas de hibridación *in situ* permiten detectar secuencias específicas de ácidos nucleicos en cromosomas, en células o tejidos preservados morfológicamente. La técnica fue desarrollada originalmente en 1969 utilizando radioisótopos y autorradiografía para detectar las secuencias hibridadas. Posteriormente, se utilizaron sondas de ácidos nucleicos con marcaje no radioactivo, las múltiples posibilidades de conjugar anticuerpos sensibles a los sistemas de detección aumentó la flexibilidad del método (Boehringer Mannheim, 1992). En la actualidad se cuenta con una gran variedad de sondas: α satélite, de tinción completa, teloméricas y específicas.

La técnica de FISH representa un gran avance en la citogenética clínica debido a que permite caracterizar de manera rápida y confiable, aneuploidías, rearreglos estructurales complejos o poco frecuentes y

en todos los casos (Vogel y Motulsky, 1974; Uchida y Freeman, 1986 y Krishna-Murthy y Farag, 1995). Por esta razón es importante que se analice un gran número de células que permita establecer con más confianza si uno de los padres puede ser portador de un mosaicimo que aumente el riesgo de tener descendencia con trisomía 21. Es necesario aplicar una metodología adecuada con la cual sea rápido y eficiente detectar este tipo de mosaicismos, de tal manera que pueda calcularse el riesgo de tener otro hijo con SD.

HIBRIDACION *IN SITU* CON FLUORESCENCIA (FISH)

Las técnicas de hibridación *in situ* permiten detectar secuencias específicas de ácidos nucleicos en cromosomas, en células o tejidos preservados morfológicamente. La técnica fue desarrollada originalmente en 1969 utilizando radioisótopos y autorradiografía para detectar las secuencias hibridadas. Posteriormente, se utilizaron sondas de ácidos nucleicos con marcaje no radioactivo, las múltiples posibilidades de conjugar anticuerpos sensibles a los sistemas de detección aumentó la flexibilidad del método (Boehringer Mannheim, 1992). En la actualidad se cuenta con una gran variedad de sondas: α satélite, de tinción completa, teloméricas y específicas.

La técnica de FISH representa un gran avance en la citogenética clínica debido a que permite caracterizar de manera rápida y confiable, aneuploidías, rearrreglos estructurales complejos o poco frecuentes y

cromosomas marcadores en niños con anomalías congénitas y a sus familias (Bossuyt y cols., 1995 y Swiger y Tucker, 1996). Las sondas de secuencia de ADN repetitivo o α satélite, localizada cerca del centrómero permite detectar aberraciones cromosómicas de tipo numérico (Bossuyt y cols., 1995).

De acuerdo con las ventajas antes mencionadas esta técnica permite analizar un número adecuado de células para detectar un mosaico críptico con mayor precisión y eficiencia, lo que ayudaría a conocer los criterios e información para establecer la frecuencia de mosaicismo en padres jóvenes menores de 35 años de hijos con trisomía 21 por no-disyunción, así como determinar el riesgo de recurrencia para estas parejas.

JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El riesgo de recurrencia para el SD depende del tipo de alteración citogenética. Generalmente cuando una pareja tiene un hijo con SD y la trisomía es originada por translocación se realiza estudio citogenético a los padres y se puede conocer el riesgo de tener otro hijo con SD; pero cuando la trisomía 21 es regular, no se elabora estudio citogenético a los padres y se da un riesgo empírico de 1.5% de tener otro hijo con SD, sin embargo la presencia de mosaicismo parental incrementa el riesgo de tener un segundo hijo con SD y el riesgo dependerá del porcentaje de células con trisomía 21 en cada

cromosomas marcadores en niños con anomalías congénitas y a sus familias (Bossuyt y cols., 1995 y Swiger y Tucker, 1996). Las sondas de secuencia de ADN repetitivo o α satélite, localizada cerca del centrómero permite detectar aberraciones cromosómicas de tipo numérico (Bossuyt y cols., 1995).

De acuerdo con las ventajas antes mencionadas esta técnica permite analizar un número adecuado de células para detectar un mosaico críptico con mayor precisión y eficiencia, lo que ayudaría a conocer los criterios e información para establecer la frecuencia de mosaicismo en padres jóvenes menores de 35 años de hijos con trisomía 21 por no-disyunción, así como determinar el riesgo de recurrencia para estas parejas.

JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El riesgo de recurrencia para el SD depende del tipo de alteración citogenética. Generalmente cuando una pareja tiene un hijo con SD y la trisomía es originada por translocación se realiza estudio citogenético a los padres y se puede conocer el riesgo de tener otro hijo con SD; pero cuando la trisomía 21 es regular, no se elabora estudio citogenético a los padres y se da un riesgo empírico de 1.5% de tener otro hijo con SD, sin embargo la presencia de mosaicismo parental incrementa el riesgo de tener un segundo hijo con SD y el riesgo dependerá del porcentaje de células con trisomía 21 en cada

caso. Es importante establecer la presencia de un mosaico somático analizando un número alto de células y así tener una estimación más certera acerca del papel del mosaicismo parental en el origen del SD.

Por otra parte, este tipo de estudios proporcionan los criterios e información suficientes para poder otorgar un asesoramiento genético preciso, así como para que los padres puedan tomar una decisión reproductiva antes de iniciar un nuevo embarazo.

OBJETIVOS

OBJETIVO PRIMARIO

Detectar mosaicismo parental en linfocitos de sangre periférica en parejas menores de 35 años con uno o más hijos con Síndrome de Down por trisomía 21 por no-disyunción, por medio del análisis de Bandas G (Citogenética Clásica) y FISH (Citogenética molecular).

OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Detectar la frecuencia de mosaicismo en padres menores de 35 años con hijos con trisomía 21 por no-disyunción.
2. Detectar si la frecuencia de mosaicismo se presenta por igual en padres y madres.

caso. Es importante establecer la presencia de un mosaico somático analizando un número alto de células y así tener una estimación más certera acerca del papel del mosaicismo parental en el origen del SD.

Por otra parte, este tipo de estudios proporcionan los criterios e información suficientes para poder otorgar un asesoramiento genético preciso, así como para que los padres puedan tomar una decisión reproductiva antes de iniciar un nuevo embarazo.

OBJETIVOS

OBJETIVO PRIMARIO

Detectar mosaicismo parental en linfocitos de sangre periférica en parejas menores de 35 años con uno o más hijos con Síndrome de Down por trisomía 21 por no-disyunción, por medio del análisis de Bandas G (Citogenética Clásica) y FISH (Citogenética molecular).

OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Detectar la frecuencia de mosaicismo en padres menores de 35 años con hijos con trisomía 21 por no-disyunción.
2. Detectar si la frecuencia de mosaicismo se presenta por igual en padres y madres.

HIPOTESIS

Una proporción (a determinar) de padres de SD son mosaicos crípticos de trisomía 21 regular y la proporción es mayor en el grupo de padres con SD recurrente que en el grupo con un solo hijo con SD.

MATERIAL Y METODOS

I. POBLACION DE ESTUDIO

La población de estudio se contempló en tres grupos:

- I. Grupo control: integrado por parejas, padres de hijos sanos.
- II. Integrado por parejas con un hijo con SD por trisomía 21 regular.
- III. Integrado por las parejas recurrentes (con más de un hijo con SD por trisomía 21 regular).

Las parejas fueron referidas de los Institutos Nacionales de Pediatría y de Perinatología.

POBLACION CONTROL.

- Parejas, hombres y mujeres de 35 años o menores, padres de hijos sanos.

CRITERIOS DE INCLUSION

- Parejas con uno o más hijos con SD por trisomía 21 regular.

HIPOTESIS

Una proporción (a determinar) de padres de SD son mosaicos crípticos de trisomía 21 regular y la proporción es mayor en el grupo de padres con SD recurrente que en el grupo con un solo hijo con SD.

MATERIAL Y METODOS

I. POBLACION DE ESTUDIO

La población de estudio se contempló en tres grupos:

- I. Grupo control: integrado por parejas, padres de hijos sanos.
- II. Integrado por parejas con un hijo con SD por trisomía 21 regular.
- III. Integrado por las parejas recurrentes (con más de un hijo con SD por trisomía 21 regular).

Las parejas fueron referidas de los Institutos Nacionales de Pediatría y de Perinatología.

POBLACION CONTROL.

- Parejas, hombres y mujeres de 35 años o menores, padres de hijos sanos.

CRITERIOS DE INCLUSION

- Parejas con uno o más hijos con SD por trisomía 21 regular.

- Parejas menores de 35 años al momento del nacimiento del hijo (o los hijos) con SD o sano en el caso de las parejas control.
- Parejas que aceptaron participar en el estudio.

CRITERIOS DE EXCLUSION

- Otra variedad citogenética de SD.
- Se excluyeron aquellas familias en las que alguno de los padres fue transfundido dentro de los últimos meses, o bien, que recibió tratamientos que puedan dar lugar a alteraciones cromosómicas.

CRITERIOS DE ELIMINACION

- Que no se obtuviera material para el estudio de los dos miembros de la pareja.

METODOLOGIA

Se tomaron pacientes con SD de la clínica de Genética del INP y del INPer. Se determinó el tipo citogenético de SD al que correspondía el paciente.

Se incluyeron 25 parejas con uno o más hijos con SD y a las 5 parejas con descendencia clínicamente normal incluidas en el estudio, se les realizó:

1. Historia clínica con árbol genealógico.

- Parejas menores de 35 años al momento del nacimiento del hijo (o los hijos) con SD o sano en el caso de las parejas control.
- Parejas que aceptaron participar en el estudio.

CRITERIOS DE EXCLUSION

- Otra variedad citogenética de SD.
- Se excluyeron aquellas familias en las que alguno de los padres fue transfundido dentro de los últimos meses, o bien, que recibió tratamientos que puedan dar lugar a alteraciones cromosómicas.

CRITERIOS DE ELIMINACION

- Que no se obtuviera material para el estudio de los dos miembros de la pareja.

METODOLOGIA

Se tomaron pacientes con SD de la clínica de Genética del INP y del INPer. Se determinó el tipo citogenético de SD al que correspondía el paciente.

Se incluyeron 25 parejas con uno o más hijos con SD y a las 5 parejas con descendencia clínicamente normal incluidas en el estudio, se les realizó:

1. Historia clínica con árbol genealógico.

2. Estudio de cariotipo en linfocitos de sangre periférica, a ambos miembros de la pareja. De cada muestra, se analizaron al menos 200 metafases, se revisaron alteraciones cromosómicas con Bandas GTG con un nivel de resolución de 400 a 600 bandas, conteo de número cromosómico e identificación de células con trisomía 21. Los hallazgos anormales fueron fotografiados.
3. Estudio de citogenética molecular por FISH en linfocitos de sangre periférica en ambos miembros de la pareja. El estudio de FISH se realizó con sonda alfa satélite para los cromosomas 13/21 (ONCOR), se analizaron 1000 metafases y se contó el número de señales fluorescentes en un microscopio de epifluorescencia. Se procesaron simultáneamente cinco casos problema (padres de hijos con SD) por un caso control (padres de hijos clínicamente sanos).
4. Todas las laminillas para el análisis de citogenética clásica o molecular fueron codificadas por una persona ajena al estudio. En todos los casos de duda, se tomaron segundas opiniones de una persona experta.
5. En un caso, se detectó que uno de los padres era mosaico para SD y se determinó el origen parental del cromosoma 21 extra en el caso índice. Esta parte se realizó por medio de polimorfismos de bandas Q y bandas C.
6. Los resultados se consignaron en tablas descriptivas para determinar los mosaicos parentales según los criterios descritos posteriormente, se aplicó la prueba estadística adecuada con un coeficiente de validez de $p = 0.05$.

TECNICAS.

CULTIVOS CELULARES DE SANGRE PERIFERICA.

Cada muestra fue tomada previa preparación de una jeringa de 3ml con aguja de 22x32 estéril con 0.3ml de heparina de 5,000 U y se sembraron 4 cultivos primarios de la siguiente manera: en un tubo de centrifuga se sembraron 0.5ml de sangre periférica con 5ml de medio de cultivo McCoy's 5^A, 0.005ml de antibiótico y 0.1ml de fitohemaglutinina.

Todos los cultivos se incubaron a 37°C y a las 72 horas se les agregó 0.02ml de colcemida (0.1mg/ml) para detener las células en metafase durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, los tubos se centrifugaron a 1500rpm durante 10min, se decantó el sobrenadante y se agregó 10ml de solución hipotónica (KCl 0.075M) a 37°C durante 15-20 min. Posteriormente, se prefijaron con 1ml de fijador Carnoy (Metanol / Acido acético, 3:1), se centrifugaron a 1500rpm durante 10min, se decantó el sobrenadante y se agregaron 5ml de fijador Carnoy; nuevamente se centrifugaron en las condiciones ya mencionadas y se cambió el fijador al menos 3 veces.

Para la elaboración de las laminillas se realizó de la manera convencional, se resuspendió el paquete celular en 0.5-1.0ml de fijador nuevo y se colocó por goteo en los portaobjetos limpios, desengrasados y fríos para permitir que las metafases quedaran abiertas. Las laminillas se procesaron para obtener bandas G con tripsina.

FISH EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA

Una vez cosechada la muestra se procedió a la realización de laminillas, de manera habitual sin flamear y procurando un secado rápido. De la preparación, se procesaron para eliminar el exceso de citoplasma y evitar que este interfiriera con la hibridación. Para la eliminación de citoplasma las laminillas se trataron con ácido acético/metanol al 70%, 2XSSPE (solución salina fosfatos con EDTA) y alcoholes graduales 70, 80 y 95% durante 2min en cada solución.

Posteriormente las laminillas se maduraron en solución 2XSSPE a 37°C durante 30min, se deshidrataron en alcoholes graduales 70, 80 y 95% por 2min en cada uno, se dejaron secar al aire y se procesaron para iniciar la técnica de FISH. La desnaturalización se realizó por 2min a 72°C en formamida al 70% (28ml de formamida, 6ml agua destilada y 4ml 20XSSPE), se deshidrataron en alcoholes 70, 80 y 95% a -20°C por 2min en cada uno, se dejaron secar al aire.

La sonda se colocó previamente desnaturalizada a 70-72°C durante 5min (30µl solución de hibridación y 1.5µl sonda marcada con digoxigenina para los cromosomas 13/21, DZ13S1/DZ21S1, ONCOR), con un cubreobjetos limpio, se sellaron y se incubaron a 37°C durante 18-24 horas en una cámara húmeda.

Al día siguiente se removió con cuidado el sellador para lavar con 0.25XSSC a 72°C durante 2-5min, se colocaron en solución 1XPBD durante 2min, para continuar con la detección, para lo cual se eliminó el exceso de esta solución y se aplicaron 60µl de anti-digoxigenina marcada con fluoresceína, se colocó un cubreobjetos de plástico y se dejaron incubar durante 30min a 37°C. Posteriormente se lavaron tres veces con Tween 20 al 0.5% con 4XSSC, durante 2min en cada lavado. Para la contratinción se adicionaron 10µl de DAPI y se colocó un cubreobjetos de vidrio, se sellaron para continuar con su análisis en un microscopio de epifluorescencia.

ANÁLISIS CELULAR

En el caso del análisis por bandas G se realizó una lectura de al menos 200 metafases con un nivel de resolución de 450-600 bandas a un aumento de 1000X, para realizar conteo de número cromosómico e identificación de células con trisomía; mientras que para el análisis de citogenética molecular se revisaron 1000 metafases para la identificación del número de señales en cada caso.

Para el análisis de FISH, se consideraron como células positivas o bien, trisómicas, las células (metafases) que presentaron cinco señales y como células normales las que presentaron cuatro; sólo se tomaron en cuenta las señales que se encontraban sobre los centrómeros de los cromosómicos. Todas las señales debían tener un tamaño e intensidad similar. Se consideraron como metafases normales aquellas que presentaban cuatro señales, dos sobre los

cromosomas G y dos sobre cromosomas D. Las trisomías fueron aquellas células que presentaban cinco señales

El criterio para evaluar la presencia de mosaicismo fue el propuesto por Anastasi y cols. en 1990, quienes utilizaron la frecuencia media de las señales más dos veces su desviación estándar. Se consideraron mosaico para trisomía 21 aquellos individuos que obtuvieron valores mayores a los críticos para citogenética clásica y molecular.

CONSIDERACIONES ETICAS Y CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

1. De cada pareja se obtuvo una carta de consentimiento para participar en el estudio y para la toma de muestras, en la carta se consideraron todos los factores de riesgo.
2. La toma de muestras se realizó por una persona adiestrada en el procedimiento y se proporcionaron las medidas higiénicas necesarias a seguir.
3. Los resultados obtenidos fueron proporcionados a los padres en la consulta de Genética.



Instituto Nacional de Pediatría

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION EN GENETICA HUMANA LABORATORIO DE CITOGENETICA

México, D.F. a de de 199

A quien corresponda:

Yo _____ padre
y _____ madre
de _____ con No. de expediente _____

Estoy enterado(a) de que mi hijo(a) padece de Síndrome de Down y hago constar que estoy de acuerdo en participar en el protocolo de "Detección de mosaicismo en parejas con hijo con trisomía 21 por no disyunción", que se llevará a cabo en el Instituto Nacional de Pediatría, para lo cual se me ha solicitado la donación de:

Muestra de sangre ()

Muestra de raspado de mucosa bucal ()

Se me ha explicado que este estudio no implicará ningún costo para mí, que es una decisión totalmente voluntaria, que tengo derecho a retirarme del estudio cuando lo considere conveniente, lo que no tendrá repercusión en la atención de mi familia por parte de la institución. Se me ha informado que este estudio puede ser de utilidad para conocer si existen alteraciones cromosómicas en cualquiera de las muestras estudiadas y que al final del mismo se me informarán los resultados obtenidos.

Atentamente.

Firma del padre

Firma de la madre

RESULTADOS

Cariotipos.- Los cariotipos de las parejas estudiadas en este trabajo fueron normales, sin embargo ocho individuos tuvieron polimorfismos cromosómicos como se especifica en la tabla 1: una inversión pericéntrica en uno de los cromosomas 9, en la madre de la pareja P4 He, y en el padre de la pareja P17 DS; un polimorfismo cromosómico Yqh+ en los padres P15 Di, y P20 Se, y un cromosoma 16qh+ en el padre de la pareja P18 Va. La madre P10 Qu, el padre C3 Di y la madre de la pareja P15 Di presentaron polimorfismos en los tallos de los cromosomas del grupo G.

TABLA 1. PAREJAS QUE PRESENTARON POLIMORFISMOS CROMOSOMICOS ^a

Grupo	Pareja	Padre / Madre	Cariotipo
I	C3 Di	Padre	46,XY,22stk-
	P4 He	Madre	46,XX,inv(9)
	P10 Qu	Madre	46,XX,22stk+
	P15 Di	Padre	46,XYqh+
II	P15 Di	Madre	46,XX,21stk+
	P17 DS	Padre	46,XY,inv(9)
	P18 Va	Madre	46,XX,16qh+
	P20 Se	Padre	46,XYqh+

^a En el grupo III no se encontraron polimorfismos cromosómicos

DETECCION DE MOSAICISMO POR CITOGENETICA CLASICA

GRUPO I. PAREJAS CON HIJOS CLINICAMENTE SANOS. Tabla 2.

El análisis citogenético se realizó en 200 a 400 metafases con bandas G en las 5 parejas con hijos clínicamente sanos y se obtuvieron los siguientes resultados:

- a) **MARCADORES.** Dentro de este grupo de parejas, en el padre de la familia C4 SL, se observó un cromosoma extra en el 0.5% de las células revisadas, este cromosoma no pudo ser identificado por lo que se le asignó como marcador. Debido a la morfología y a las bandas analizadas en este marcador es probable que provenga de alguno de los cromosomas del grupo E, específicamente del cromosoma 17 (Tabla 3).

- b) **TRISOMIAS DEL CROMOSOMA 21.** De las parejas estudiadas sólo el padre de la pareja C2 He, y la madre de la pareja C3 Di presentaron 0.5% de metafases con trisomía 21 (Tabla 2).

TABLA 2. PAREJAS CON HIJOS CLINICAMENTE SANOS

Pareja	P/M	Edad	# Met	CITOGENETICA CLASICA										CITOGENETICA MOLECULAR *			
				Trisomias %										FISH % metafases con:			
				9	10	13	17	18	20	21	22	X	Monosomia	Normal	Trisomia 21	Tetraploidia	
C1 Re	P	27	300										4.46	94.34	0.09	0.49	
	M	23	300										2.1	96.9	0	0.4	
C2 He	P	35	200							0.5			1.8	97.6	0.2	0.2	
	M	35	200										5.3	94.31	0	0	
C3 Di	P	33	200										0.6	99.4	0	0	
	M	34	200							0.5			0.3	99.7	0	0	
C4 SL	P	30	200										1.8	97.9	0.2	0	
	M	29	200										1.59	98.11	0.29	0	
C5 Rz	P	34	200										3.4	96.4	0	0.1	
	M	32	200										1.3	98.69	0	0	

* El número de metafases analizadas con FISH fue de 1000

VALORES CRITICOS PARA CONSIDERAR MOSAICO

CITOGENETICA CLASICA

X = 0.1

SD = 0.2108

X + 2SD = 0.5216

CITOGENETICA MOLECULAR

X = 0.078

SD = 0.1112

X + 2SD = 0.3004

TABLA 3. PAREJAS QUE PRESENTARON MARCADORES CROMOSOMICOS

Grupo	Pareja	Padre/Madre	El marcador es similar al cromosoma:			
			17	18	21	22
I	C4 SL	Padre	0.5			
II	P1 SC	Madre		1		
	P3 Es	Padre	0.25			0.25
	P3 Es	Madre			0.75	
	P12 Ro	Padre				0.5
	P13 Bo	Padre			0.3	
	P22 JR	Madre			1.5	
III	P25 Ma	Madre	0.5			

GRUPO II. PAREJAS CON HIJO ÚNICO CON SD. Tabla 4

- a) PAREJA P4 He. Debido a que los resultados de citogenética de la pareja P4 He, llaman la atención, se comentan de manera particular: por un lado el padre presentó un porcentaje de 0.5% de células trisómicas para el cromosoma 21 que aunque no es mayor que el umbral para considerarse mosaico, si es muy alto. Por otro lado la madre cuyo cariotipo presenta una inversión pericéntrica en uno de los cromosomas 9, tuvo un porcentaje de trisomía para el cromosoma 21 de 1.25%, un 0.5% de trisomía para el cromosoma 9, 0.25% de trisomía para el cromosoma 17 y en dos células (0.5%) se encontró una translocación t(13;14). En los antecedentes clínicos de esta pareja, se encontró que la madre es asmática y utiliza como medicamento de control salbutamol, ventolín, pero no se puede asegurar que sea el único medicamento que esta persona utilice para controlar la enfermedad y ésta podría ser una de las causas del alto porcentaje de aberraciones cromosómicas en la madre.
- b) MARCADORES. En la pareja P1 SC, la madre presentó en el 1% de sus células un fragmento cromosómico similar al brazo corto del cromosoma 18. En el padre de la pareja P3 Es, se encontraron marcadores de dos tipos pero en diferentes células, el primero era semejante a uno de los cromosomas del grupo E (parecido a un cromosoma 17) en un porcentaje de 0.25%, el segundo marcador similar a los cromosomas del

Pareja	P/M	Edad	CITOGENETICA CLASICA										CITOGENETICA MOLECULAR*					
			# Met	9	10	13	17	18	20	21	22	X	Monosomia	Normal	Trisomia 21	Tetraploidia		
			Trisomias %										FISH % metafases con:					
P1 SC	P	19	200												1	99	0	0
	M	16	200												1.5	98.5	0	0
P2 Ga	P	26	100												0.87	99.12	0	0
	M	27	100			0.5									2.82	96.23	0	0.31
P3 Es	P		400							0.25					1.8	96.9	0.5	0.3
	M		400												5.1	93.7	0	0.2
P4 He	P	35	400												4.7	93.3	0.7	0.1
	M	34	400	0.5						0.25					5.8	91.4	0.5	0.4
P5 Te	P	23	400												2.2	97.2	0.4	0.1
	M	21	400												19.5	77.4	0.1	0.2
P6 Na	P	25	200												12.2	85.9	0.3	0
	M	24	400												0.8	98	0.2	0
P7 Bu	P	27	200												1.1	98.8	0.1	0
	M	26	200												0.39	99.3	0.19	0.09
P8 Al	P	34	200												2.9	95.7	0.1	0.3
	M	32	200										1.5		1.29	96.6	1.19	0.39
P9 Pe	P	35	200												2	97.27	0	0.58
	M	34	200												1.1	97.7	0.3	0.1
P10 Qu	P	21	200												1.2	97.31	0	0.49
	M	21	200												8.3	90.8	0	0
P11 Ec	P	27	200												1.3	97.4	0.1	0.1
	M	27	200												0.9	96.4	0.2	0.1
P12 Ro	P	35	200												0	2.7	97.3	0
	M	33	200												4.8	93.5	0.3	0.1

* El número de metafases analizadas con FISH fue de 1000

CONTINUA

TABLA 4. PAREJAS CON UN HIJO CON SINDROME DE DOWN

Pareja	P/M	Edad	CITOGENETICA CLASICA										CITOGENETICA MOLECULAR *						
			# Met	9	10	13	17	18	20	21	22	X	FISH % metafases con:						
			Trisomias %										Monosomia	Normal	Trisomia 21	Tetraploidia			
P13 Bo	P	28	300									0.3				1.27	98.14	0.58	0
	M	25	300													0.79	98.71	0.39	0
P14 Hu	P		200													9.63	89.84	0	0
	M		200													0.9	99	0.1	0
P15 Di	P		200													2.3	96.3	0.2	0.8
	M		200													2.5	96.5	0.1	0.5
P16 Hi	P	27	200										0.5			0.7	98.7	0.5	0
	M	26	200													1.1	98.4	0.2	0.1
P17 DS	P	20	200		0.5											1.2	98.7	0.1	0
	M	21	200								0.5					0.8	99	0.1	0
P18 Va	P	32	200													0.9	98.2	0.1	0
	M	30	200													1.6	98.1	0.1	0
P19 Av	P	33	200									1				2.5	96.7	0.5	0
	M	24	200													1.2	98.5	0	0
P20 Se	P	27	200													2.3	96.9	0.7	0.1
	M	23	200													2	97.5	0.34	0
P21 Ar	P	18	200													0.8	98.8	0.1	0.1
	M	17	200									0.5				0.9	99	0	0
P22 JR	P	29	200													0.9	98.8	0.1	0
	M	27	200													1.4	98.3	0.1	0

* El número de metafases analizadas con FISH fue de 1000

NOTA: SE DISTINGUEN LOS VALORES MAYORES A LOS OBTENIDOS DEL GRUPO CONTROL

grupo G (específicamente a un cromosoma 22) en un porcentaje de 0.25%. Mientras que en el análisis de la madre también se encontró un marcador cuya morfología coincidía con uno de los del grupo G, similar a un cromosoma 21, en el 0.75% de metafases analizadas (Tabla 3).

El padre de la pareja P12 Ro, presentó un marcador satelitado similar a un cromosoma del grupo G, particularmente a un cromosoma 22 en un porcentaje de 0.5.

El padre de la pareja P13 Bo, y la madre de la pareja P22 JR, tuvieron en el 0.5 y 1.5% de las metafases revisadas, respectivamente, un cromosoma semejante a los del grupo G que recordaría a un cromosoma 21q- (Tabla 3).

- c) ANEUPLOIDIAS. Siete individuos presentaron trisomías que no involucraron el cromosoma 21. El padre de la pareja P17 DS, presentó 0.5% de células con un cromosoma 13 extra y la madre de esta misma pareja un cromosoma 20 extra en el 0.5%. Por otro lado en los dos integrantes de la pareja P10 Qu, se encontró un cromosoma 22 extra en el 0.5% de las metafases analizadas. En cuatro madres, la de la pareja P2 Ga, la de la pareja P8 Al, la de la pareja P18 Va, y la de la pareja P19 Se, presentaron trisomía del cromosoma X con un porcentaje de 0.52, 1.5, 0.5 y 0.5% respectivamente (Tabla 4).
- d) TRISOMIAS DEL CROMOSOMA 21. En la tabla 4 se observa la frecuencia de las células que presentaron trisomía

21, en 9 individuos se encontró un valor menor al crítico obtenido para considerarse mosaico: los padres P3 Es y P5 Te, presentaron un porcentaje de 0.25 de células con trisomía 21; en siete individuos se encontró 0.5% de células con trisomía 21: el padre de la pareja P4 He, el padre y la madre de la pareja P7 Bu, los padres P8 Al, P16 Hi, P18 Va y las madres P12 Ro y P21 Ar. Mientras que el padre de la pareja P19 Av el porcentaje de metafases con trisomía 21 es de 1, valor mayor al crítico por lo tanto puede ser considerado como mosaico.

GRUPO III. PAREJAS CON SINDROME DE DOWN RECURRENTE.

Tabla 5.

- a) MARCADORES. Sólo en un caso se encontró un marcador cuyas características coinciden con los cromosomas del grupo E, de acuerdo a su tamaño era parecido al brazo p del cromosoma 18 y el porcentaje en el que se observó fue de 0.5, es importante mencionar que sólo se observó en una célula (Tabla 3).

- b) ANEUPLOIDIAS. En este grupo dos casos presentaron células trisómicas que no involucran el cromosoma 21, un caso fue el padre de la pareja P25 Ma, con un cromosoma 10 extra en un porcentaje de 0.5 y la madre de la pareja P24 Vi, un cromosoma 22q- con un porcentaje de 1.3% (Tabla 5).

TABLA 5. PAREJAS CON MAS DE UN HIJO CON SINDROME DE DOWN

Pareja	P/M	Edad	# Met	CITOGENETICA CLASICA										CITOGENETICA MOLECULAR *					
				Trisomias %										FISH % metafases con:					
				9	10	13	17	18	20	21	22	X	Monosomia	Normal	Trisomia 21	Tetraploidia			
P23 Ji	P	25	200								0.5					0.8	97.9	1.2	0
	M	28	200													1.5	97.9	0.3	0.3
P24 Vi	P	26	230								1.3					4.3	93.2	1	0.2
	M	25	224													1.4	97.4	0.6	0
P25 Ma	P	29	200							0.5						1.9	95.89	1.17	0.29
	M	29	200													3.75	98.53	0.23	0.11

* El número de metafases analizadas con FISH fue de 1000

NOTA: SE DISTINGUEN LOS VALORES MAYORES A LOS OBTENIDOS DEL GRUPO CONTROL

TRISOMIA DEL CROMOSOMA 21. De acuerdo con el valor crítico para mosaico de trisomía 21, que se obtuvo para el estudio de citogenética clásica, podemos mencionar que como se aprecia en la tabla 5 los individuos que se consideran mosaico son los padres P24 Vi y P25 Ma.

De tal manera que según los datos obtenidos por citogenética clásica podemos considerar a cuatro individuos de las 25 parejas estudiadas con uno o más hijos con SD como mosaicos para trisomía 21: la madre P4 He, el padre P19 Av (grupo II), los padres de las parejas P24 Vi y P25 Ma (grupo III).

CITOGENETICA MOLECULAR. FISH.

La técnica de FISH se realizó con una eficiencia de hibridación del 97%, en todas las parejas la sonda utilizada hibridó en las regiones centroméricas de los cromosomas 13 y 21 excepto en un caso, en el padre de la pareja P12 Ro en el que se observaron 5 señales en cada metafase analizada, la señal extra se localizaba en uno de los cromosomas 22 (tabla 6), identificado con bandas Q sobre la muestra a la que se le realizó FISH. Al realizar el FISH sobre los cromosomas del hijo con SD, se confirmó que se presentaba el mismo tipo de hibridación. Se continuó con el estudio citogenético de este cromosoma, con el objeto de conocer si el centrómero presentaba además de la secuencia 13/21 la secuencia del 22, razón por la cual, se realizó FISH con esta sonda. El cromosoma también hibridó con secuencia centromérica del cromosoma 22, por lo que se realizó FISH dual en ambas muestras, para conocer si las dos sondas hibridaban en el centrómero de este caso. El color de la señal (amarillo) del cromosoma 22 fue la combinación de las dos señales 21 (rojo) y 22 (verde); el siguiente paso fue la realización de FISH dual sobre fibras de cromatina en la muestra del hijo con SD, en los que se observó mayor grado de relajamiento de la cromatina para determinar si las dos secuencias se encontraban en el mismo sitio, o bien, en dos diferentes que pudiera indicar una translocación en esta región que por citogenética convencional pase desapercibida. A este nivel de condensación se observó que la hibridación de las dos secuencias se produce en dos sitios diferentes y contiguos, apoyando la idea de una translocación a nivel centromérico a brazos cortos (Foto 1 y 2).

TABLA 6. RESULTADOS DE FISH CON Sonda ALFA SATELITE 13/21 DE LA PAREJA P12 Ro

	% de metafases observadas con:			
	3 señales	4 señales	5 señales	8 señales
Padre	0	2.7	97.3	0
Madre	4.8	93.5	0.3	1

En lo que se refiere a frecuencia de las células con trisomía 21 para los tres grupos que componen la población de estudio, se siguieron los criterios de Anastasi y cols. (1996) para descartar mosaico como se describió en metodología y se obtuvo como valor crítico un porcentaje de 0.3%, por lo que los individuos que tuvieron un porcentaje mayor a éste, fueron considerados como posibles mosaicos de trisomía 21.

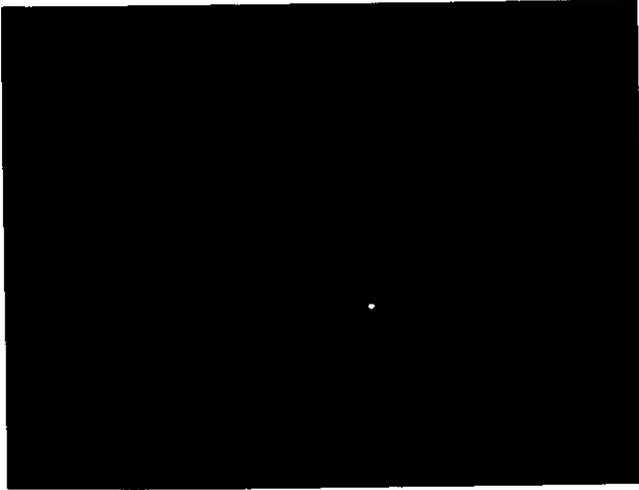


Foto 1. FISH con sondas centrómicas 13/21 y 14/22 en cromosomas en metafase. Se observa un cromosoma 13 marcado con biotina (rojo), un cromosoma 22 marcado con digoxigenina (verde) y el cromosoma 22 con hibridación para las dos sondas (amarillo).

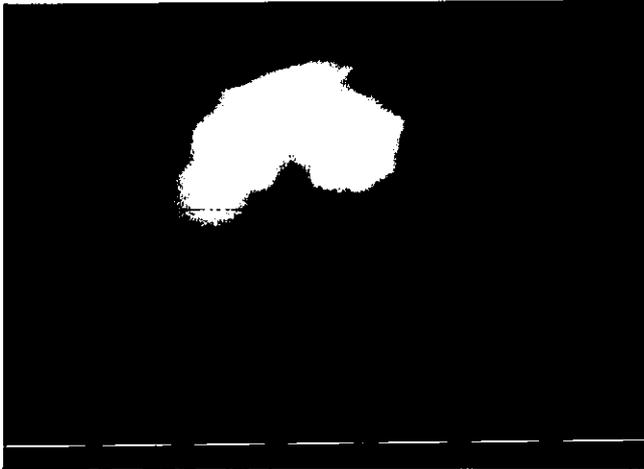


Foto 2. FISH con sondas centroméricas para los cromosomas 13/21 y 14/22 en fibras de cromatina. Se observan las secuencias del centrómero 22 que presentó hibridación con ambas sondas centroméricas y se demuestra que las dos secuencias se encuentran en sitios diferentes y contiguos.

GRUPO II. (Tabla 4)

De acuerdo al valor de Anastasi y cols. (1996) obtenido, existen 11 individuos pertenecientes a este grupo que según nuestros resultados de FISH en células en metafases pueden ser mosaicos. El padre de la pareja P3 Es, ambos miembros de la pareja P4 He*, el padre de la pareja P5 Te, la madre de la pareja P8 Al, la pareja P13 Bo, el padre de la pareja P16 Hi, el padre de la pareja P19 Av y la pareja P20 Se.

GRUPO III. (Tabla 5)

En este grupo los tres padres y una de las madres, tuvieron un valor mayor al obtenido de las parejas controles como crítico, estos fueron, el padre de la pareja P23 Ji, padre y madre de la pareja P24 Vi y el padre de la pareja P25 Ma, de tal manera que las tres parejas recurrentes posiblemente son mosaicos para trisomía 21.

Es importante señalar que el número de parejas control es pequeño, pero los resultados obtenidos en estos individuos difiere de las parejas con uno o más hijos afectados y puede ser representativa de una población sana.

La frecuencia de mosaicismo en parejas con SD recurrente fue significativamente mayor ($p < 0.02$, X^2 de proporciones) que la observada en las parejas con hijos sanos.

DISCUSION

El SD es la cromosomopatía más frecuente y la variedad citogenética que se presenta en la mayoría de los casos es la trisomía 21 regular, cuyo origen se ha relacionado con factores como: edad materna avanzada, consanguinidad, predisposición a la no-disyunción y mosaicismo parental (Alfi y cols. 1980; Krishna-Murthy y Farag, 1995). El mosaicismo parental juega un papel importante en el origen de trisomías (Uchida y Freeman, 1986; Krishna-Murthy y Farag, 1995, Hassold y cols., 1996). Debido a que el porcentaje de la línea celular trisómica suele ser bajo, no genera alteraciones fenotípicas que indiquen su presencia, pero si la trisomía se encuentra en tejido gonadal, puede aumentar el riesgo de recurrencia de 1.5% establecido empíricamente para trisomía 21 regular.

Hasta el momento no se ha establecido con claridad la contribución del mosaicismo parental, pero se han propuesto diferentes valores, algunos autores proponen un porcentaje de 1.6%, otros sugieren el 19% (Vogel y Motulsky, 1974), mientras que, Harris y cols. (1982) reportaron que el 3% de las parejas jóvenes (edad materna promedio de 25.8 y la paterna de 26.7) con uno o más hijos con SD son mosaico para esta trisomía.

La variación de los porcentajes de individuos mosaicos reportados hasta ahora puede deberse al número de células analizadas en estos reportes, ya que el mosaico puede presentarse en bajas proporciones y la distribución de células con 47 cromosomas en

una muestra (de cualquier tamaño) podría seguir una distribución de Poisson y por esto, algunas muestras fijadas no tendrían células anormales (Harris y cols., 1982). Por estas razones, en este trabajo se revisaron 200-400 metafases con bandas G y 1000 metafases con citogenética molecular (FISH), de tal manera que se lograra la detección de mosaicismos bajos (aún menores a 1%) con 0.99 de confianza que permitiera detectar el mayor número posible de personas con mosaicos crípticos.

En el presente trabajo, se decidió tomar solamente como mosaico, los individuos que presentaron valores más altos a los obtenidos en los individuos con hijos clínicamente sanos (de acuerdo a los criterios propuestos por Anastasi y cols., 1996), mediante las dos metodologías, es decir, por citogenética clásica y por citogenética molecular. De acuerdo a estos criterios sólo cuatro individuos de las 30 parejas estudiadas fueron mosaicos para trisomía 21. De estos cuatro, uno es del sexo femenino y tres son masculinos: la madre de la pareja P4He; existen dos posibles causas que explican los resultados obtenidos en esta persona: a) pueden ser eventos no constitucionales sino por inducción por medicamento, ya que está en tratamiento continuo para asma, aunque el medicamento que ella utiliza no se ha reportado como aneuploidógeno; o b) El mosaicismo puede estar relacionado con la presencia de una inversión pericéntrica de un cromosoma 9, 46,XX,inv(9)(p12q21), Murthy y Prabhakara (1990) encontraron en células de una portadora de este tipo de inversión, que este polimorfismo cromosómico está asociado con un elevado porcentaje de división prematura del centrómero, endorreduplicación,

poliploidías y aneuploidías además de que el riesgo de tener descendencia con síndrome de Down, se incrementa 3 veces (Murthy y Prabhakara, 1990; Serra y cols., 1990). Por lo que nuestros resultados se podrían explicar por la asociación reportada, es decir el polimorfismo y las alteraciones que pueden presentarse en división celular.

En relación con los individuos masculinos que resultaron mosaicos, uno pertenece al grupo II y los dos restantes pertenecen al grupo III. Estos resultados pueden coincidir con lo reportado en trabajos anteriores: Hsu y cols. en 1971 reportaron tres padres con mosaicismo para trisomía 21 y afirmaron que esto puede contribuir a los SD con trisomía 21 productos de parejas jóvenes. Petersen y cols., (1993) publicaron que sólo el 5% de los casos de SD por trisomía 21 regular se originan por errores de no-disyunción paterna. Los individuos que en nuestro trabajo se consideran mosaico pueden estar incluidos en aquellos que contribuyen al 5% de SD de origen paterno, y que aún siendo mosaicos, no se diagnostica mediante un estudio cromosómico convencional.

En cuanto a los mecanismos asociados a la no-disyunción paterna se sabe que son diferentes a los de origen materno. Los mecanismos propuestos son: alteraciones en secuencias importantes del apareamiento (p.ej., en la región autosómica) o en estructuras importantes en la disyunción cromosómica (p. ej. el centrómero).

En los casos de no disyunción materna, el error puede ocurrir en meiosis I (MI) o meiosis II (MII). Se han propuesto dos hipótesis para explicar los casos de no-disyunción en madres añosas:

a) "Producción de línea", esta hipótesis propone que, los ovocitos maduros en etapa adulta se encuentran en el mismo orden al que correspondió a la ovogonia cuando entró a meiosis en etapa fetal. La ovogonia que entró en meiosis tardía puede tener más errores en la formación de chiasmas y entonces, está más expuesta a sufrir no-disyunción. Un factor que predispone a la no-disyunción es una recombinación alterada, Lamb y cols. (1996) demostraron que en la no-disyunción materna del cromosomas 21 en MI, el porcentaje de recombinación disminuye, principalmente en la región proximal del brazo largo, mientras en la no-disyunción en MII se observó un aumento en el número de recombinaciones, particularmente en la región proximal del brazo largo del cromosoma. Estos patrones de recombinación alterada (MII) no son dependientes de edad materna avanzada.

b) El otro modelo propuesto por Lamb y cols. (1996), es el de "doble hit", el cual propone que algunas configuraciones de recombinación no se procesan apropiadamente en mujeres añosas, lo cual podría resultar, por ejemplo, en una disminución para formar el huso mitótico-dependiente de la edad.

Existen trabajos que apoyan que la predisposición genética a la no-disyunción es uno de los factores de riesgo para tener

descendencia con síndrome de Down, de tal manera que existe un subgrupo de pacientes con trisomía 21 cuya no-disyunción puede ser genéticamente determinada, sin importar la edad materna, incluso se ha propuesto un haplotipo común en el cromosoma 21 extra en una población griega (Alfi y cols. 1980; Wang 1999; Antonarakis y cols., 1985).

Estas teorías están enfocadas a explicar los errores de no-disyunción en madres añosas y en poblaciones consanguíneas; sin embargo, deben existir otros mecanismos alternos o adicionales en parejas menores a 35 años con hijos con síndrome de Down por no-disyunción.

HIPERMODALES

En la siguiente tabla se muestran los porcentajes de metafases hipermodales encontrados con citogenética clásica en los tres grupos estudiados en este trabajo y se comparan con el realizado por Juberg y cols. (1985) quienes analizaron la frecuencia de no-disyunción en mitosis de linfocitos de sangre periférica en padres de aneuploides y con abortos.

El número de metafases que estos autores revisaron fue de 20-30, pero el tamaño de muestra fue mayor. En nuestro trabajo, el número de metafases analizadas supera el tamaño poblacional que ellos analizaron y probablemente esto eleve el porcentaje de células hipermodales encontradas.

**COMPARACIÓN DE LA FRECUENCIA DE METAFASES
HIPERMODALES CON EL TRABAJO DE JUBERG Y COLS. (1985)**

	Subgrupo	N	Edad X	Metafases analizadas	Metafases hipermodales	Individuos con hipermodales	Hipermodales %
JUBERG	Normales *	72	29.6	1,897	1	1	0.053
	Padres de aneuploides	42	29.4	1,391	11	9	0.79
	Padres con abortos	31	30.1	925	8	7	0.86
PRESENTE	Parejas con hijos sanos	10	31.2	2,200	3	3	0.13
	Parejas con un hijo SD	44	25.22	10,200	44	25	0.43
	Parejas con SD recurrente	6	27	1,254	12	5	0.95

* Individuos con cariotipos normales 46,XX o 46,XY. Estudiados citogenéticamente en el seguimiento de asesoramiento genético o infertilidad, o por tener hijos malformados sin anomalía cromosómica o diagnóstico.

El mayor porcentaje de células hiperdiploides que encontraron Juberg y cols. (1985) fue en el grupo de padres con abortos (0.86%), que es similar al del grupo de padres con SD recurrente (0.95%) de nuestro trabajo y el porcentaje del grupo de padres con un hijo con SD (0.43%) es comparable al del grupo de padres con hijos aneuploides (0.79%). En cuanto a los individuos que se consideraron como grupo control en los dos trabajos, fueron los que obtuvieron los menores porcentajes.

Es interesante que el grupo II tiene un valor intermedio, lo cual podría representar a una población compuesta con individuos: Posibles mosaicos y con individuos con tendencia a la no-disyunción, tanto del cromosoma 21 como de otras autosomas e incluso del cromosoma X.

OTRAS TRISOMÍAS

La trisomía que se presentó con más frecuencia, después de la trisomía 21, fue la del cromosoma X (observada en el análisis de citogenética clásica), encontrándose en cuatro madres en 0.52%, 1.5%, 0.5% y 0.5% de las células analizadas, respectivamente. Esta aneuploidía se ha reportado con frecuencia en mujeres con hijos con síndrome de Down, en porcentajes de 1.2 a 2% de las células analizadas, y se ha propuesto como un factor de riesgo para tener hijos afectados con esta entidad (Juberg y cols., 1985; Uchida y Freeman., 1986; Krishna-Murthy, y Farag, 1995).

Estas madres pertenecen al grupo II y podrían confirmar nuestra hipótesis a cerca de que este grupo está compuesto por individuos con mosaico para trisomía 21 y por individuos con predisposición a la no-disyunción.

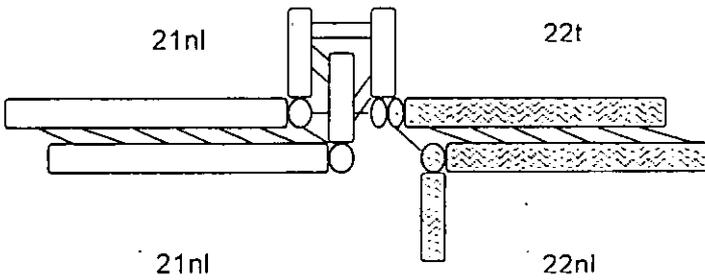
DISCUSION P12Ro

El caso del padre P12Ro se discute por separado por las implicaciones que puede tener: Se encontraron 5 señales en un alto porcentaje, pero la hibridación se realizaba en uno de los cromosomas 22, por lo que se realizó el FISH en el hijo con SD para observar si había heredado este cromosoma lo cual confirmó. Este resultado coincide con el reporte de Verlinsky y cols. en 1995 quienes en un caso de diagnóstico prenatal, utilizaron la sonda alfa satélite para los cromosomas 13/21 y encontraron 5 señales en un cariotipo aparentemente normal y una señal positiva en el cromosoma 22. El hallazgo se confirmó en la madre, por lo que se consideró como hibridación cruzada condicionada por un polimorfismo heredado en la región centromérica que puede dar como resultado una hibridación inespecífica. Sin embargo, existe la posibilidad de una translocación a nivel centromérico, por lo que en nuestro caso, se realizó FISH dual con las sondas centromérica 13/21 marcada con biotina y 14/22 marcada con digoxigenina. El resultado demostró que ambas sondas hibridan en la región centromérica del cromosoma 22, debido a que el color de la señal fue el producto de la combinación de los dos fluorocromos utilizados.

Con el fin de determinar la localización de las dos señales, el siguiente paso fue la realización de FISH en fibras de cromatina, obtenidas con un frotis de la cosecha habitual de metafases de linfocitos de sangre periférica con solución de desnaturalización 70% formamida según la metodología de Fidlerová y cols. (1994). Esta

técnica permitió observar que las dos sondas hibridaban en regiones diferentes y contiguas, lo cual apoya la hipótesis de una translocación a nivel centromérico, que pudiera influir en la formación de gametos disómicos para el cromosoma 21 productos de una segregación 3:1 (Fig. 1).

Figura 1. APAREAMIENTO EN PAQUITENO



La presencia de una translocación centromérica en este individuo, padre de un paciente con Síndrome de Down, no produce alteración fenotípica debido a la naturaleza de esta región, pero la secuencia perteneciente al cromosoma 21 podría interferir en el proceso de formación de gametos, específicamente en la segregación y disyunción normal de los cromosomas 21. Se puede especular que el padre de la pareja P12Ro sea, producto de un ancestro portador de

una translocación balanceada, o bien de un evento *de novo* lo cual no pudo ser corroborado (no fue posible tomar muestras de los abuelos paternos). Para apoyar la hipótesis de que la translocación centromérica predispone a la no-disyunción 21, es necesario realizar FISH en gametos del padre para determinar la frecuencia de células con disomía 21. Al obtener una frecuencia alta de células con estas características podríamos comprobar que esta alteración favorece la no-disyunción de cromosoma 21.

Es importante realizar trabajos de este tipo, donde se utilicen metodologías que puedan abarcar el análisis de un gran número de células, para determinar el porcentaje real de individuos portadores de mosaicismo críptico entre los padres de niños con SD. Estos datos permiten conocer el peso de este factor que predispone a la presencia de individuos con Síndrome de Down, además de conocer en algunos casos el riesgo de recurrencia específico para parejas con historias clínicas que sugieran de un riesgo mayor que la población general, o bien, que tengan un hijo con SD y la edad materna sea menor a 35 años.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alfi O., Chang R., Azen S. 1980. Evidence for genetic control of nondisjunction in man. *Am J Hum Genet* 32: 477-483.
- Anastasi J., Le Beau M., Vardiman J., Westbrook C., 1990. Detection of numerical chromosomal abnormalities in neoplastic hematopoietic cells by *in situ* hibridization with a chromosome-specific probe. *Am J Pathol* 136: 131-139.
- Antonarakis S., Kittur S., Metaxotou C., Watkins P., Patel A. 1985. Analysis of DNA haplotypes suggests a genetic predisposition to trisomy 21 associated with DNA sequences on chromosome 21. *Proc Natl Acad Sci* 82: 3360-3364.
- Armendares S., Buentellos L., Salamanca F. 1990. Frecuencia de mixoploidías en 85 casos índice con síndrome de Down. *Rev Inv Clin* 42: 103-107.
- Boehringer Mannheim Biochemicals. 1992. Nonradioactive In Situ Hybridization Application Manual. Boehringer Mannheim GmbH, Biochemicals. Germany. 79 p.
- Bossuyt P., Van Tienen M-N., De Gruyter L., Smets V., Dumon J., Wauters. 1995. Incidence of low-fluorescence α satellite region on chromosome 21 escaping detection of aneuploidy at interphase by FISH. *Cytogenet Cell Genet* 68: 203-206.
- Dagna B., Pierluigi M., Grasso M., Strigini P., Perroni L. 1990. Origin of extra chromosome 21 in 343 families: Cytogenetic and molecular approaches. *Am J Med Suppl* 7: 129-132.
- Epstein., Ch.: Down Syndrome (Trisomy 21). 1995. Chap. 18. En: Scriver Ch., Beaudet A., William S., Valle D. The metabolic and molecular bases of inherited disease. Vol 1. 7 th edition. International edition. New York.
- Fidlerová H., Senger G., Kost M., Sanseau P., Sheer D. 1994. Two simple procedures for releasing chromatin from routinely fixed cells

for fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 65: 203-205.

- Gorlin R., Cohen M., Levin S.: Chromosomal Syndromes: Common and/or Well-Known Syndromes. En: Gorlin R., Cohen M., Levin S.: Syndromes of the head and neck. Oxford Monographs on Medical Genetics 1990, No. 19, Third Edition, pp. 33-40.
- Harper P.S.: Chromosomal abnormalities. In: Harper P.S. Practical genetic counseling. Cap 4. Butterworth & Co. 1988, Third ed., p. 49-62
- Harris D., Begleiter M., Chamberlin J., Hankis L., Magenis R. 1982. Parental trisomy 21 mosaicism. *Am J Hum Genet* 34: 125-133.
- Hassold T., Abruzzo M., Kenneth A., Griffin D., Merrill M., Millie E., Saker D., Shen J., Zaragoza M. 1996. Human Aneuploidy: incidence, origin and etiology. *Environ Mol Mutagen* 28: 167-175.
- Hsu L., Gertner M., Leiter E., Hirschhorn K. 1971. Paternal trisomy 21 mosaicism and Down's Syndrome. *Am J Hum Genet* 23: 592-601.
- Jones K.L.: Down Syndrome. In: Jones K.L. Smith's recognizable patterns of human malformation. W.B. Saunders company, Philadelphia: 1988, Fourth edition, p.10-15.
- Jones, K.L. 1990. Atlas de malformaciones congénitas. Interamericana McGraw Hill. New York. 866 p.
- Juberg R., Knops J., Mowrey P. 1985. Increased frequency of lymphocytic mitotic non-disjunction in recurrent spontaneous aborters. *J Med Genet* 22: 32-35.
- Krishna-Murthy, D.S., Farag, T.I. 1995. Recurrent regular Trisomy-21 in two bedouin families. Parental mosaicism versus genetic predisposition: *Ann Genet* 38: 217-224.

- Lamb N., Freeman S., Savage-Austin A., Pettay D., Taft L., Hersey J., Gu Y., Shen J., Saker D., May K., Avramopoulos D., Petersen M., Hallberg A., Mikkelsen M., Hassold T., Sherman S. 1996. Susceptible chiasmata configurations of chromosome-21 predispose to non-disjunction in both maternal meiosis I and meiosis II. *Nature Genet* 14: 400-405.
- Murthy SK, Prabhakara K. 1990. Mitotic disturbance associated with inversion 9qh. A case report. *Ann Genet* 33: 169-172.
- Nadal M., Moreno S., Pritchard M., Preciado M. A., Estivill X., Ramos-Arroyo M. A. 1997. Down syndrome: characterisation of a case with partial trisomy of chromosome 21 owing to a paternal balanced translocation (15;21)(q26;q22.1) by FISH. *J Med Genet* 34: 50-54.
- Niikawa N., Kajii T. 1984. The origin of mosaic Down syndrome: four cases with chromosome markers. *Am J Hum Genet* 36: 123-130.
- O'Brien S.J.: Genetic maps. Human maps. Book S., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993; p. 23-24.
- Petersen M.B., Antanarakis S.E., Hassold T., Freeman S., Sherman S., Avramopoulos, Mikkelsen M. 1993. Paternal nondisjunction in trisomy 21: process of male patients. *Hum Mol Genet* 2: 1691-1695.
- Petersen M.B., Frantzan M., Antonarakis S.E., Warren A.C., Van Broecheven C., Chacravarti A., Cox T.K., Lund C., Olsen B., Poulsen H., Sand A., Tommerup N., Mikkelsen M. 1992. Comparative study of microsatellite and cytogenetic markers for detecting the origin of the non-disjoined chromosome 21 in Down syndrome. *Am J Hum Genet* 51: 516-525.
- Petersen M.B., Schinzel A.A., Binkert F., Tranebjaerg L., Mikkelsen M., Collins F.A., Economou E.P., Antonarakis S.E. 1991. Use of short sequence repeat DNA polymorphisms after PCR amplification to detect the parental origin of the additional chromosome 21 in Down Syndrome. *Am J Hum Genet*, 48: 65-71.

- Richards B. W. 1974. Investigation of 142 mosaic mongols and mosaic parents of mongols: cytogenetic analysis and maternal age at birth. *J Ment Defic Res* 18: 199-208.
- Salamanca F.: Cuadros clínicos de los autosomas. Síndrome de Down. Cap. 12. En: Salamanca F.: *Citogenética humana*. Editorial Médica Panamericana, 1990: p. 117-128.
- Serra A., Brahe C., Millington-Ward A., Neri G., Tedeschi B., Tassone F., Boua R. 1990. Pericentric inversion of chromosome 9: prevalence in 300 Down syndrome families and molecular studies of nondisjunction. *Am J Med Genet Suppl* 7: 162-168.
- Swiger R. y Tucker J. 1996. Fluorescence in situ hybridization: A review. *Enviromen Mol Mutagen* 27: 245-254
- Thompson M., Mcinnes R., Willard H.: Clinical cytogenetics: general principles and autosomal abnormalities. Chap. 9. En: Thompson & Thompson: *Genetics in Medicine*. W.B. Saunders Company. Fifth Edition, 1991.p. 201-229.
- Uchida I., Freeman V. 1986. Trisomy 21 Down syndrome II. Structural chromosome rearrangements in the parents. *Hum Genet* 72: 118-122.
- Verlinsky Y., Ginsberg M., Chmura M., Freidine M., White M., Strom C., Kuliev A. 1995. Cross-hybriditation of the chromosome 13/21 alpha satellite DNA probe to chromosome 22 in prenatal screening of common chromosomal aneuploidies by FISH. *Prenat Diagn* 15: 831-834.
- Vogel F., Motulsky A.G.: Human Genetics. Problems and approaches. Chap 5. In: *Mutation*. Springer-Verlag-Berlin-Herdelberg, 1974: p.291.292.
- Wang J-C.: Autosomal Aneuploidy. Cap. 8. En: Gersen S., Keagle M.: *The Principles of Clinical Cytogenetics*. 1999. Humana Press. Totowa, Totowa N.J. p.157-165.

- Wilson M., Towner J., Forsman I. 1980. Decreasing mosaicism in Down's syndrome. Clin Genet 17: 335-340.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA₄₉