



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

---

---

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

ESTUDIO CLÍNICO, CITOGENÉTICO Y BIOQUÍMICO EN UNA FAMILIA CON  
 $t(3;13)$  IDENTIFICADA A PARTIR DE UNA PACIENTE CON  
TRISOMÍA 3q26-qter Y MUCOPOLISACARIDURIA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA

P R E S E N T A:

DRA. MELANIA ABREU GONZÁLEZ

TUTORA: DRA. VERÓNICA FABIOLA MORÁN BARROSO

ASESORES DE TESIS:

DRA. CONSTANZA GARCÍA DELGADO

M. EN C. ROBERTO GUEVARA YÁÑEZ



HOSPITAL INFANTIL *de* MÉXICO

FEDERICO GÓMEZ

Instituto Nacional de Salud

MÉXICO, D.F. FEBRERO 2011



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.

Directora de tesis:

Dra. Verónica Fabiola Morán Barroso  
Profesor titular de la Especialidad de Genética Médica  
Hospital Infantil de México Federico Gómez

Asesores de tesis:

Dra. Constanza García Delgado  
Profesor adjunta de la Especialidad de Genética Médica  
Hospital Infantil de México Federico Gómez

M. en C. Roberto Guevara Yáñez  
Director de Laboratorio Biogen

Dr. Jaime Nieto Zermeño  
Director de Enseñanza  
Hospital Infantil de México Federico Gómez

**Dedicatoria**

*A mi papá, mis abuelitos, hermanos, amigas y Doris*

Sólo por su ejemplo, cariño y comprensión he logrado seguir en el camino.

*A mi mamá*

Por todo lo que me enseñaste y porque se que me cuidas, donde quiera que estés.

*A Carlos*

Por el amor y complicidad, en este y todos mis sueños.

*A la Dra Verónica Morán Barroso*

Gracias por sus enseñanzas, orientación y apoyo durante toda residencia.

*A mis maestros, Dra. Constanza García Delgado, Dra. Rosa Isela Ortíz de Luna y  
Dr. Francisco Flores Ramirez*

Gracias por compartirme su experiencia y conocimientos.

*Al M. en C. Roberto Guevara Yañez y la M. en C. Alicia Cervantes Peredo*

Por todas sus enseñanzas y apoyo brindado para la realización de este proyecto.

*A Luz, Ocelotl y Enrique, por su amistad.*

*Gracias al Hospital Infantil de México Federico Gómez y a sus pacientes,*

en especial a la a la familia descrita en esta tesis.

## ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN .....	7
1.1	Aspectos moleculares y citogenéticos de la herencia.....	7
1.2	Niveles de Organización del ADN.....	7
1.3	Clasificación de los cromosomas.....	10
1.4	Ciclo y División Celular .....	13
1.5	Alteraciones Cromosómicas.....	16
1.6.	Rearreglos cromosómicos .....	18
1.7.	Técnicas de Citogenética .....	20
1.8	Errores Innatos del Metabolismo.....	22
1.8.1	Abordaje de los pacientes con Errores Innatos del Metabolismo. ....	24
2.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	31
3.	JUSTIFICACIÓN.....	32
4.	OBJETIVOS .....	33
4.1	Principal:.....	33
4.2	Secundarios: .....	33
5.	MATERIAL Y MÉTODOS .....	34
5.1	Presentación del caso clínico (individuo IV.6 en la Fig.6.6.).....	36
5.1.1	Descripción clínica del caso 1 .....	36
6.	RESULTADOS .....	39
6.1.	Análisis Bioquímico. ....	39
6.2.	Análisis Cromosómico .....	42
6.2.1.	Análisis Cromosómico de la propósita .....	42
6.2.2.	Análisis cromosómico de la madre de la paciente (Individuo III.4, Fig. 6.6.) .....	42

6.3. Análisis Familiar.....	48
6.3.1. Análisis Citogenético Familiar .....	48
6.3.2 Descripción del Caso 2 (Individuo IV.3 en la Fig. 6.6.).....	50
6.3.3. Descripción del Caso 3 (Individuo IV.2 de la Fig. 6.6.).....	53
6.4. Análisis Bioquímico Familiar.....	56
7. DISCUSIÓN.....	57
8. CONCLUSIÓN .....	75
9. REFERENCIAS.....	76
10. Anexo I.....	83
11. Anexo II.....	85
1. Técnica de bandas GTG.....	85
2. Técnica de cariotipo con bandas NOR.....	86
3. Técnica para FISH (hibridación in situ con fluorescencia) con sonda de pintado cromosómico.....	87
4. Técnica para detección de glucosaminoglicanos en orina cualitativo .....	88

## RESUMEN

**Introducción:** Las anormalidades cromosómicas estructurales tienen una incidencia de 1:400 RNV. La aberración estructural más frecuente son las translocaciones, que se clasifican en balanceadas (no existe ganancia ni pérdida de material) y no balanceadas (se generan segmentos trisómicos y/o monosómicos). Se han reportado 40 pacientes con trisomía parcial del cromosoma 3, en el 60% de los casos causada por translocación balanceada de los padres. La trisomía 3q26 [MIM 122470] se caracteriza por dismorfias faciales, alteraciones cardíacas, genitourinarias, retraso mental y del desarrollo.

**Objetivo principal:** Describir por clínica, citogenética, citogenética molecular y bioquímica enzimática a una familia con translocación recíproca t(3;13) identificada en una paciente con Trisomía parcial 3q26-qter. **Objetivos secundarios:** 1. Establecer la correlación entre los fenotipos morfológico y bioquímico con el genotipo. Identificar los puntos de ruptura, a través de múltiples técnicas de análisis de cromosómico como bandas GTG, NOR y FISH. 2. Analizar y correlacionar los hallazgos citogenéticos de la propósita con las alteraciones metabólicas encontradas. 3. Establecer la correlación fenotipo-cariotipo en esta familia y compararla con los casos publicados en la literatura. 4. Analizar la segregación meiótica en un portador balanceado de la translocación. 5. Brindar asesoramiento genético a la familia, establecer el manejo y seguimiento multidisciplinario requerido.

**Justificación:** El estudio clínico, citogenético y bioquímico de esta paciente nos permitió determinar la relación fenotipo clínico y bioquímico con el genotipo de la trisomía 3q26, no reportado previamente con mucopolisacariduria. **Planteamiento del problema:** La mayor parte de los casos de trisomía 3q son debidos a una translocación balanceada de los padres. En el caso descrito se presenta además con mucopolisacariduria.

**Material y métodos:** Previo consentimiento informado y autorización Institucional, se realizó estudio clínico, bioquímico (tamiz metabólico en orina y actividad enzimática), citogenético con bandas GTG y microscopía electrónica de transmisión en sangre periférica a la paciente. Se realizaron estudios citogenéticos (bandas GTG, NOR y FISH con la sonda WCP 3 Cytocell®) en la madre de la propósita y se realizó estudio citogenético a los familiares de segundo grado. **Resultados:** La propósita presenta trisomía 3q26-qter con mucopolisacariduria sugestiva de síndrome de Sly con actividad enzimática de  $\beta$ -glucuronidasa debajo de los límites normales. La microscopía electrónica no demostró acumulación de material en lisosomas. El estudio citogenético familiar identificó 2 individuos con un rearrreglo desbalanceado y 6 portadores asintomáticos de la translocación balanceada.

**Discusión:** Este caso ilustra una trisomía parcial 3q derivada de una translocación balanceada t(3;13)(q26;p12)mat, con mucopolisacariduria tipo Sly por glicosaminoglicanos en orina, característica no descrita previamente. La segregación de la translocación implica un riesgo de recurrencia de 16.31%. Se otorgó manejo integral y asesoramiento genético a la familia.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Aspectos moleculares y citogenéticos de la herencia

El Genoma Humano está constituido por 3,200 millones de pares de bases de ácido desoxirribonucleico (ADN), de los cuales únicamente el 1.5-2% codifica para la síntesis de proteínas. Las secuencias de ADN del genoma eucariote se clasifican en copia única y de más de una copia, estas últimas pueden ser de secuencias repetidas o ADN intragénico<sup>1</sup>. Se ha calculado que existen cerca de 23 000 a 30 000 genes, únicamente se conoce la función de la mitad de estos<sup>2</sup>.

Los cromosomas son las unidades en las que se organizan las moléculas de ADN dentro del núcleo celular. El nombre cromosoma, proviene del griego *chromo* color y *soma* cuerpo, por lo tanto son los cuerpos coloreados<sup>3</sup>.

## 1.2 Niveles de Organización del ADN

El ADN se empaqueta en un complejo nucleoprotéico llamado cromatina<sup>4</sup>, esto se lleva a cabo por la unión de diversos complejos protéicos. Las uniones dependen de si las regiones son activas o inactivas transcripcionalmente, de acuerdo a la composición de la secuencia subyacente, el tiempo de replicación y la posición del cromosoma en el núcleo<sup>5</sup>.

El primer nivel de compactación de la cromatina es el nucleosoma, el cual contiene ≈200 pares de bases, organizadas en un octámero de proteínas básicas. Estas son llamadas histonas, forman un núcleo interior y el ADN se enrolla en su superficie. Cada nucleosoma tiene dos moléculas de histona H2A, H2B, H3 y H4. Las histonas H3 y H4 son las proteínas más conservadas y su función es similar en todos los organismos eucariotes. La histona H1 tiene una localización externa y aparentemente se encuentra en el sitio donde entra y sale el ADN<sup>2</sup>. Los nucleosomas adyacentes están conectados por un tramo de ADN espaciador<sup>6</sup>. (Fig. 1.1.)



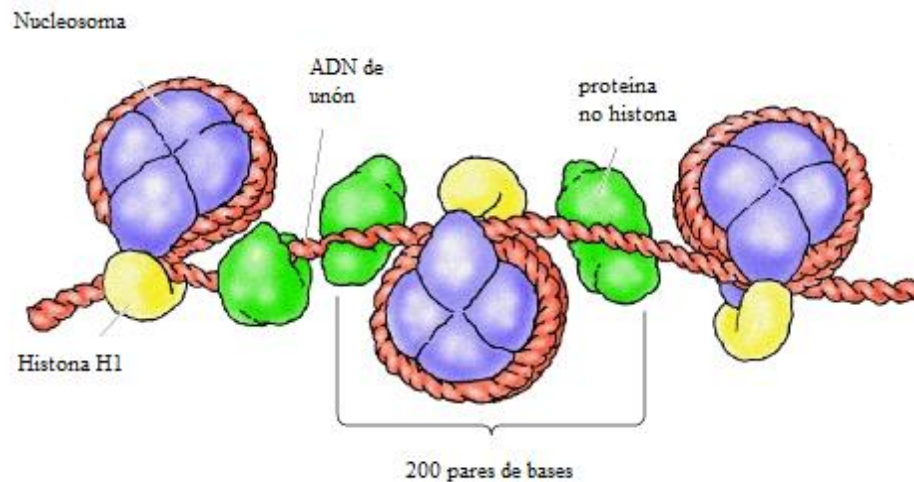


Fig.1.1. Organización de cromatina en nucleosomas. Modificada de Cooper GM, 2nda Edición, 2000<sup>23</sup>.

Existen diversas variantes de histona, las cuales son generadas por modificaciones postraduccionales, por complejos remodeladores de cromatina o por el intercambio de ciertas proteínas<sup>7</sup>. Como ejemplos de las variantes de la histona H2A se encuentran la H2A.Z que se encuentra involucrada en la formación de heterocromatina y la histona H2A.X la cual se incorpora al nucleosoma cuando existe daño al ADN y su pérdida se encuentra involucrada en rearrreglos cromosómicos y transformaciones oncogénicas<sup>8</sup>. Como se mencionó, la familia de la histona H2A es la que presenta mayor diversidad y se piensa que se encuentra involucrada en las modificaciones de la estructura del nucleosoma.

El segundo nivel de organización es el empaquetamiento de los nucleosomas en una fibra de cromatina de 30nm, la cual se encuentra en la cromatina en interfase y en la mitosis. Se han propuesto dos modelos que pretenden explicar la estructura de la fibra de cromatina<sup>9</sup>:

- a) *Modelo de solenoide*: en el cual los nucleosomas se encuentran alineados en la fibra de cromatina.
- b) *Modelo de Zigzag*: como su nombre lo dice, se forman dos líneas de nucleosomas, permitiendo la interacción entre los nucleosomas adyacentes.

El tercer nivel de organización es el enrollamiento de la fibra de 30nm, formando asas, esto se lleva a cabo a través de la unión de las proteínas de andamiaje, las cuales son proteínas ácidas no histonas, esenciales para los niveles de organización subsecuentes<sup>6</sup>.

Las principales proteínas de andamiaje son las proteínas para el mantenimiento de la estructura de los cromosomas (SMC) y la topoisomerasa II. Las primeras tienen una función estructural y son esenciales para la condensación, la cohesión y la adecuada segregación cromosómica. Las segundas liberan los ovillos generados por las SMC durante la condensación y en la replicación del ADN<sup>10</sup>.

Existen otras proteínas no histonas asociadas a la heterocromatina, como son la proteína heterocromática 1 o HP1, la cual media la formación de la heterocromatina o las proteínas con grupo de alta movilidad (HMG), las cuales actúan sobre la arquitectura de la cromatina plegando el ADN regulando la transcripción o otros procesos mediados por ADN<sup>11</sup>.

Las asas de cromatina sufren un enrollamiento ulterior para formar una espiral de 700 nm de diámetro, que se compacta alrededor de 10 000 veces para formar un cromosoma en metafase<sup>6</sup> (Fig. 1.2.). Los cromosomas condensados presentan un patrón de bandas específicas que pueden ser reconocidas, cada una de éstas contiene más de un millón de pares de bases. De acuerdo al contenido de GC, se determina la densidad génica de la región. Las regiones que tienen mayor densidad génica son ricas en GC y las que tienen poca densidad génica son pobres en GC<sup>1</sup>.

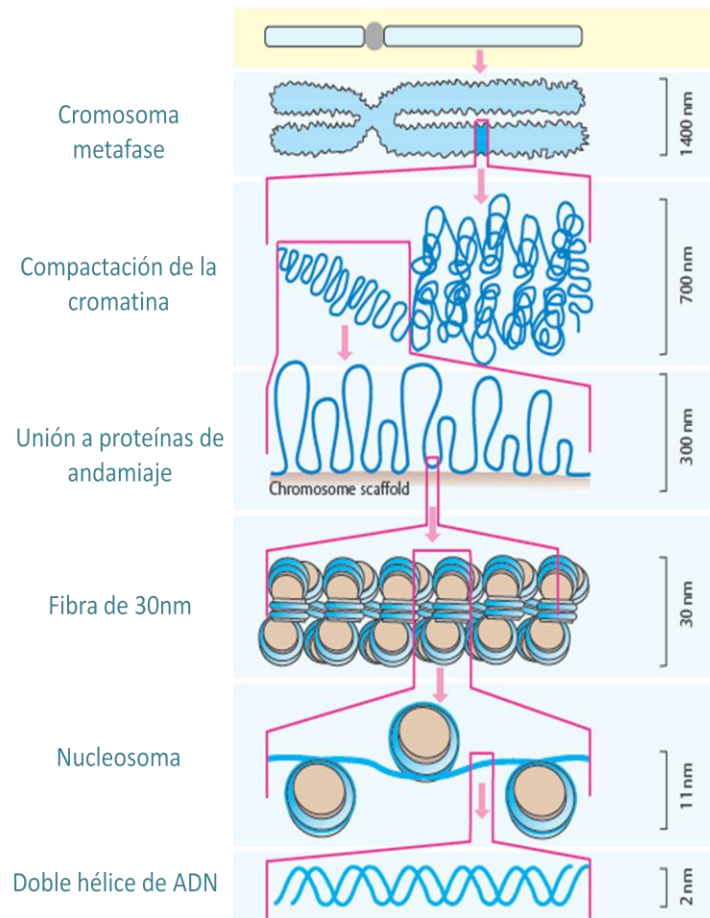


Fig. 1.2. Esquema de organización empacotamiento del DNA. Modificado de Passarge, E. 2001<sup>11</sup>

### 1.3 Clasificación de los cromosomas

Los cromosomas se clasifican de acuerdo a su tamaño y la posición de su centrómero. El centrómero es la constricción primaria del cromosoma, separando el brazo corto designado como p, del francés *petit* pequeño y el brazo largo como q. (Fig. 1.3.)

De acuerdo a la posición del centrómero los cromosomas se clasifican en<sup>13</sup>:

- 1) *Metacéntrico*: posicionado en la parte media.
- 2) *Submetacéntrico*: si se localiza más cerca de uno de sus extremos.
- 3) *Acrocéntrico*: si se localiza muy próximo a uno de sus extremos.

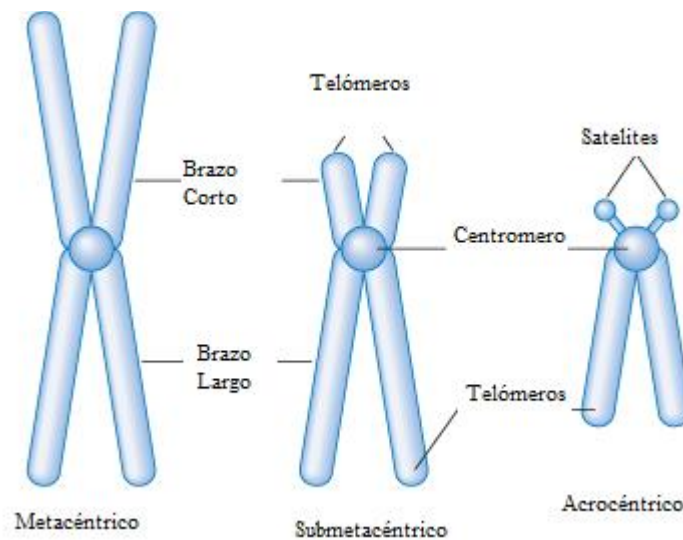


Fig. 1.3. Esquema de clasificación morfológica de los cromosomas. Modificado de Rimoin DL *et al*, 5ta Edición. 2006<sup>12</sup>.

Los centrómeros están compuestos por ADN repetido en tándem o ADN  $\alpha$  satélite y su principal función es permitir la adecuada segregación de los cromosomas durante la división celular a partir de la unión a los microtúbulos (Fig. 1.4.). Existen varias proteínas asociadas a los centrómeros (proteínas CEN-P), las cuales están involucradas en la formación del cinetocoro, el cual es un disco trilaminar que se ensambla antes y durante la mitosis al que se le unen los microtúbulos<sup>13</sup>.

Dentro de las principales proteínas asociadas a los centrómeros encontramos:

- La proteína CENP-A es una variante de histona H3, la se encuentra únicamente en centrómeros activos, siendo esencial para la formación del centrómero y para el mantenimiento del cinetocoro<sup>14, 15</sup>.
- La proteína CENP-B es de unión al DNA, pero no es un componente necesario ya que se ha descubierto que no se encuentra presente en los neocentrómeros y los ratones knock-out sobreviven sin ella, se cree que esté involucrada en evitar la formación de nuevos centrómeros y pueda intervenir en la prevenir la inserción de elementos móviles<sup>16</sup>.

- c. La proteína CENP-C es la que se encuentra mayormente involucrada en la segregación cromosómica, en los puntos de control de la mitosis y en el ensamblaje a la placa interna del cinetocoro<sup>17</sup>.
- d. También existen otras proteínas que se asociación de forma transitoria al centrómero INCEP, las cuales participan en la segregación cromosómica y la citocinesis<sup>14</sup>.

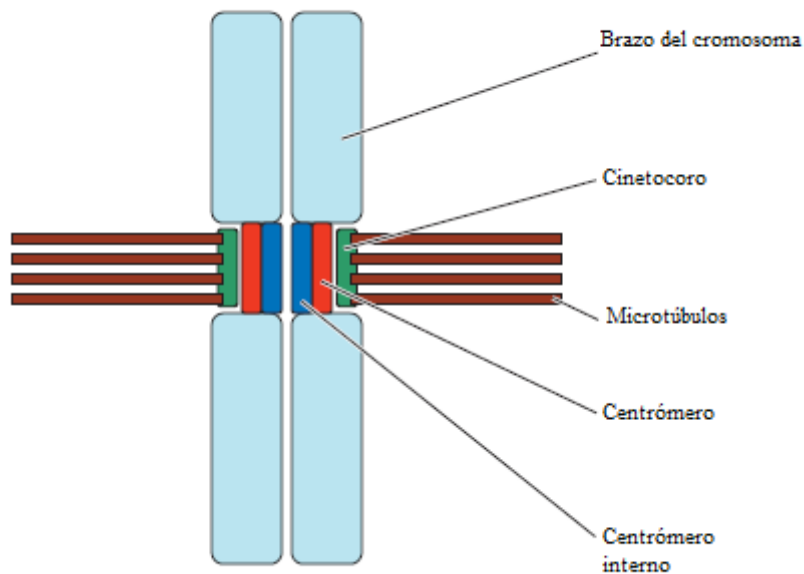


Fig. 1.4. Estructura del centrómero. Modificada de Przewloka *et al*, 2009<sup>13</sup>.

El telómero es un complejo de ADN y proteínas, que se encuentra en la región terminal de los cromosomas. Son necesarios para la replicación completa del cromosoma y este le da estabilidad estructural al protegerlo de la degradación de sus extremos. Las secuencias de ADN que conforman el telómero se encuentran conservadas evolutivamente. En los vertebrados consiste en una secuencia TTAGGG repetida en tándem en una región de doble cadena<sup>18</sup>. En su extremo 3' tiene una sección de DNA de cadena sencilla, la cual se extiende entre 125-275 pares de bases, llamada saliente o asa t, se piensa que esta interacciona con la región de doble cadena del telómero, formando una triple hélice, aislando la región terminal del cromosoma. También se sabe que la región telomérica de doble cadena se une con dos proteínas, TRF1 y TRF2, la primera aparentemente

involucrada en el tamaño del telómero y su replicación y la segunda participa como protectora del telómero y facilita la formación del asa T<sup>19</sup>.

Los satélites citológicos constituyen el extremo distal de los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos (13, 14, 15, 21 y 22), son polimórficos en cuanto a su tamaño, pueden aparecer duplicados, en tándem o separados, inclusive mostrar alguna deleción. En los tallos se localizan los genes que codifican para el RNA ribosomal y proteínas ribosomales que coalecen para formar el nucléolo, estas son conocidas como regiones organizadoras nucleolares (NOR)<sup>1</sup>. (Fig. 1.5.)

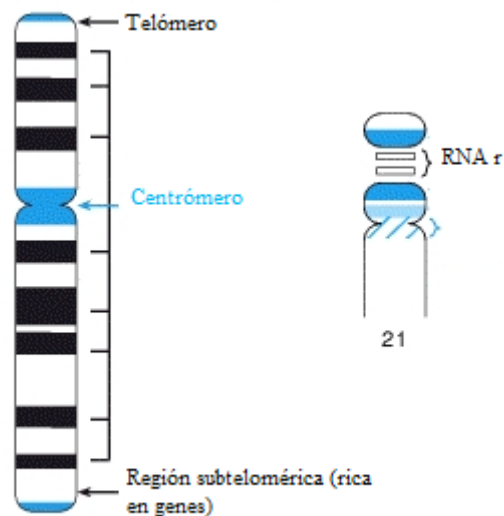


Fig. 1.5. Estructura de los cromosomas. Modificado de Strachan T, Read A. 2nd edition 1999<sup>6</sup>.

#### 1.4 Ciclo y División Celular

El ciclo celular es el proceso a través del cual se forman dos células hijas con el mismo material genético<sup>20</sup>. Cuando la división celular no es aparente se dice que la célula se encuentra en interfase. En el núcleo en interfase, la mayor parte de la cromatina se encuentra descondensada, dispersándose en él. Este material es llamado *eucromatina* y contiene a los genes transcripcionalmente activos que replican de forma temprana en la fase S del ciclo celular<sup>5</sup>.

Por el otro lado las regiones que permanecen condensadas o *heterocromatina*, son inactivas y replican tardíamente. Existen regiones que permanecen inactivas en todos los tipos celulares y estados de diferenciación por lo que se consideran heterocromatina *constitutiva*, los cuales incluyen a los centrómeros y telómeros. Así mismo existen otras regiones que pueden ser eucromáticas en ciertos tipos celulares o momentos del desarrollo por lo que se conoce como heterocromatina *facultativa*<sup>6</sup>. Las características de la eucromatina y heterocromatina se comparan en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1. Características de la eucromatina y heterocromatina. Modificada de Eissenberg *et al*, 2005<sup>5</sup>.

<b>Característica</b>	<b>Eucromatina</b>	<b>Heterocromatina</b>
<b>Apariencia en interfase</b>	Descondensada (poco teñida)	Condensada (fuertemente teñida)
<b>Localización cromosómica</b>	Brazos distales	Regiones cercanas al telómero y centrómero
<b>Replicación</b>	Durante toda la fase S	En la fase S tardía
<b>Tipo de secuencias</b>	Secuencia única	Secuencia repetitiva
<b>Densidad génica</b>	Variable	Pobre

El ciclo celular inicia posterior a la división celular, la cual genera dos células hijas. Se divide en interfase y de división celular. Cuando la célula sale de su estado de quiescencia (G0), entra a la interfase la cual tiene 3 fases: la primera fase es donde se lleva a cabo el crecimiento celular y realizan sus funciones especializadas (G1), después sigue la fase de síntesis (S) donde se duplica el material genético, posteriormente la célula se prepara para la división celular (G2)<sup>21</sup>.

Para llevar a cabo la división celular, el material genético tiene que duplicarse, lo cual ocurre durante la fase S o fase de síntesis. La fase M, consiste en las diversas etapas de división nuclear (profase, prometafase, metafase, anafase y telofase) y la citocinesis, que se sobrelapa con la última fase de la mitosis<sup>6</sup>.

Desde el punto de vista molecular, el ciclo celular es la actividad secuencial y ordenada de diversos complejos protéicos. Los cuales se encuentran formados por una ciclina y su subunidad catalítica, las cinasas dependientes de ciclinas. La actividad de los complejos ciclina/cinasa se encuentran regulados por la inducción y degradación de las ciclinas, la fosforilación o desfosforilación de las cinasas y la unión a los inhibidores de las ciclinas<sup>22</sup>.

La meiosis es el proceso de división en el cual se presentan dos divisiones celulares con una sola replicación del ADN, es realizada únicamente por los gametos. La primera división es donde ocurre el apareamiento y la recombinación entre los cromosomas homólogos, redistribuyendo así los alelos parentales generando variación en los gametos. La segregación de los homólogos ocurre durante la primera fase del ciclo o fase reduccional y en la segunda fase o ecuacional es similar a la mitosis con segregación de las cromátides hermanas a las células hijas con lo que se generan células haploides<sup>22,23</sup>. (Fig. 1.6.)

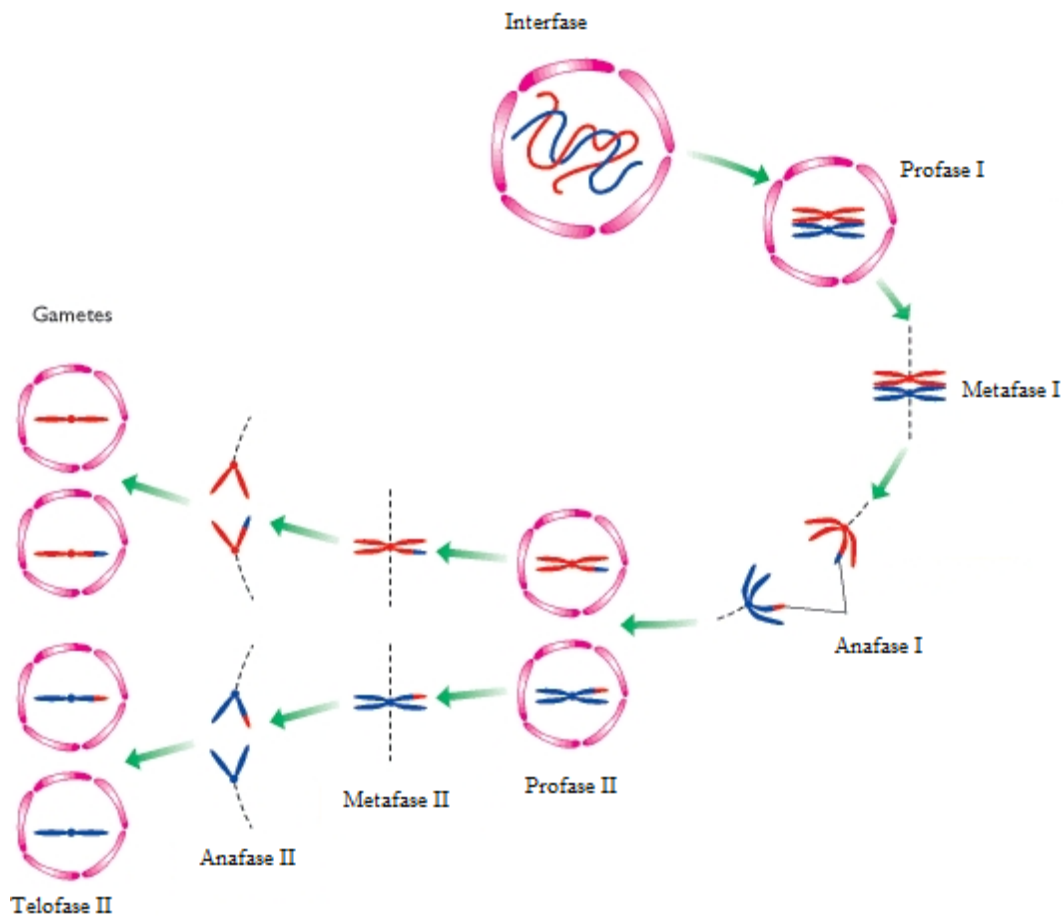


Fig. 1.6. Fases de la meiosis. Modificada de Cooper GM, 2000<sup>23</sup>.



### 1.5 Alteraciones Cromosómicas

Las anomalías cromosómicas se encuentran presentes en 50% de los abortos espontáneos, en el 6% de los óbitos y 0.5% de los recién nacidos vivos (RNV)<sup>24</sup>. Las cromosopatías se dividen en alteraciones numéricas y estructurales.

Las alteraciones numéricas se clasifican en euploidias, cuando son múltiplos exactos del número haploide (letales) y las aneuploidías que son la presencia o ausencia de un cromosoma específico, se asocian a la edad materna avanzada por una no disyunción meiótica<sup>25</sup>. (Fig. 1.7.)

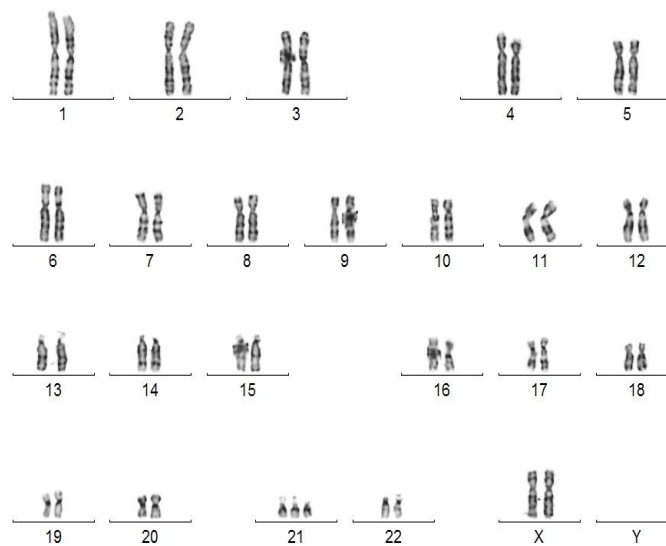


Fig. 1.7. Cariotipo con bandas GTG, de una aneuploidía cromosómica, trisomía 21. Imagen proporcionada por QFB. Ana Aparicio Onofre.

Las alteraciones estructurales, como su nombre lo dice alteran la estructura cromosómica. Entre las principales aberraciones cromosómicas intracromosómicas se encuentran: la deleción o pérdida de un segmento cromosómico (del), duplicación (dup), inversiones peri o paracéntricas (inv), cromosomas en anillo (r) y los isocromosomas (i). También pueden generarse aberraciones intercromosómicas como: las inserciones (ins), translocaciones

recíprocas balanceadas o no (t) o las translocaciones de tipo robertsoniano o fusiones céntricas (rob)<sup>6</sup>. (Fig. 1.8.)

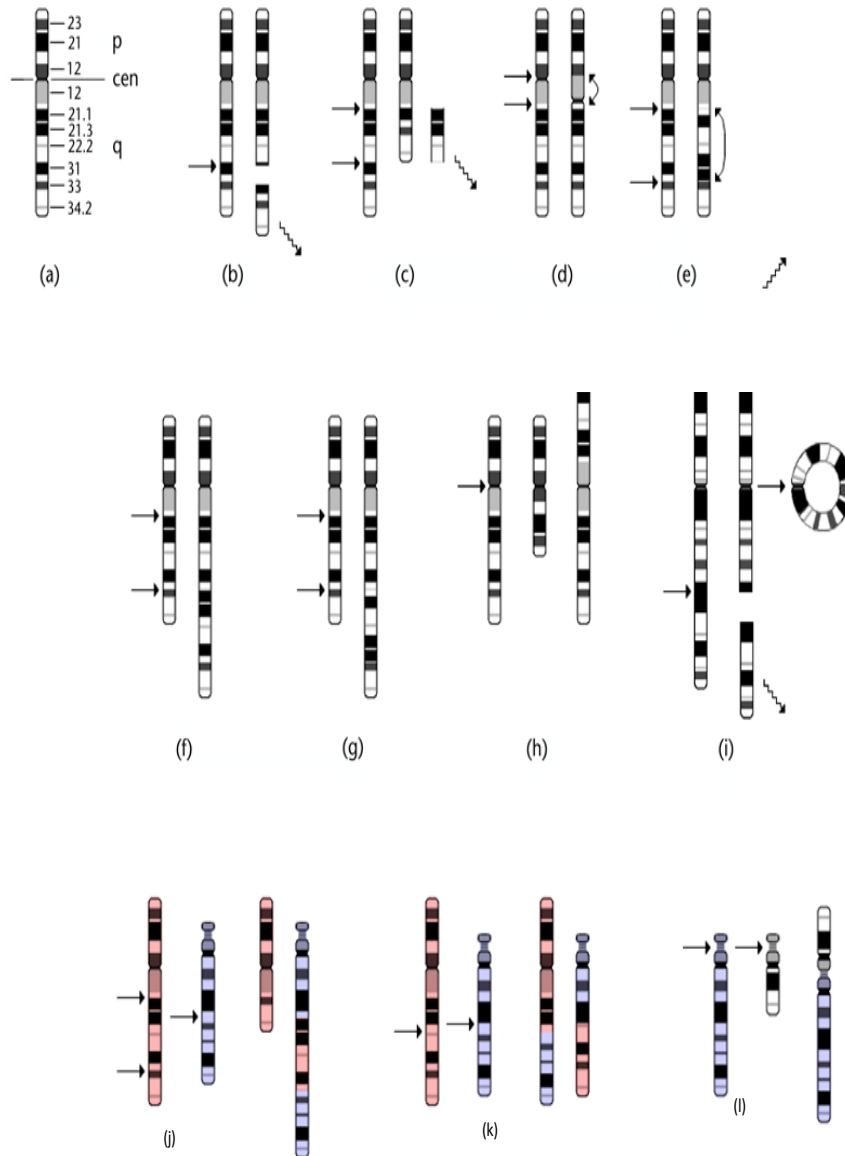


Fig. 1.8. Principales aberraciones cromosómicas estructurales. (a) cromosoma normal, (b) deleción terminal, (c) deleción intersticial, (d) inversión paracéntrica, (e) inversión pericéntrica, (f) duplicación de un segmento directa (g) duplicación de un segmento invertido, (h) isocromosoma, (i) cromosoma en anillo, (j) translocación de un fragmento cromosómico: (k) translocación balanceada, (l) translocación robertsoniana. Esquema modificado de Luthardt *et al*, 2002<sup>24</sup>.

## 1.6. Rearreglos cromosómicos

Los rearrreglos estructurales involucran una ruptura cromosómica y unión en uno o más puntos. Se clasifican como balanceados cuando no hay cambio en el material genético y no balanceado cuando hay ganancia o pérdida de material genético. La frecuencia de anomalías estructurales varía dependiendo de las diferentes poblaciones estudiadas, encontrándose más frecuentemente en los abortos (del 2 al 4%) y en los recién nacidos en el 0.2% para las alteraciones balanceadas y de 0.05% para las desbalanceadas<sup>24</sup>.

Las translocaciones se consideran balanceadas si la disomía se mantiene para todos los cromosomas implicados. Por otra parte cuando existe ganancia o pérdida de material, se dice que es desbalanceada. Un rearrreglo desbalanceado generalmente se asocia con retraso mental, en el desarrollo y malformaciones congénitas, mientras que un rearrreglo balanceado en general no tiene efecto sobre el fenotipo o el desarrollo intelectual, sin embargo ocasionan problemas reproductivos (infertilidad, abortos de repetición e hijos con malformaciones congénitas)<sup>26</sup>.

Las translocaciones recíprocas se caracterizan por intercambio de material entre dos cromosomas no homólogos, sin pérdida visual de cromatina. De forma constitutiva generalmente son asintomáticas, pero pueden alterar un gen esencial, afectar la expresión de un gen y si involucran al cromosoma X sesgar su inactivación<sup>6</sup>. Cuando se generan de forma somática pueden ocasionar la reposición de un protooncogen generando la desregulación del ciclo celular formando tumores o leucemia<sup>10</sup>.

El apareamiento de los homólogos en meiosis se ve alterado en las translocaciones, formando un cuadrivalente en paquiteno, pudiendo generarse tres tipos de segregaciones<sup>12</sup> (Fig. 1.9.):

1. Alternas: los dos cromosomas normales se van a un polo y los dos cromosomas translocados a otro, generando gametos normales y balanceados respectivamente.
2. Adyacente 1: centrómeros no homólogos hacia el mismo polo, generando un complemento cromosómico desbalanceado, resultado monosomía y/o trisomía parciales.
3. Adyacente 2: centrómeros homólogos se mueven hacia el mismo polo, resultado en trisomías o monosomías casi completas.

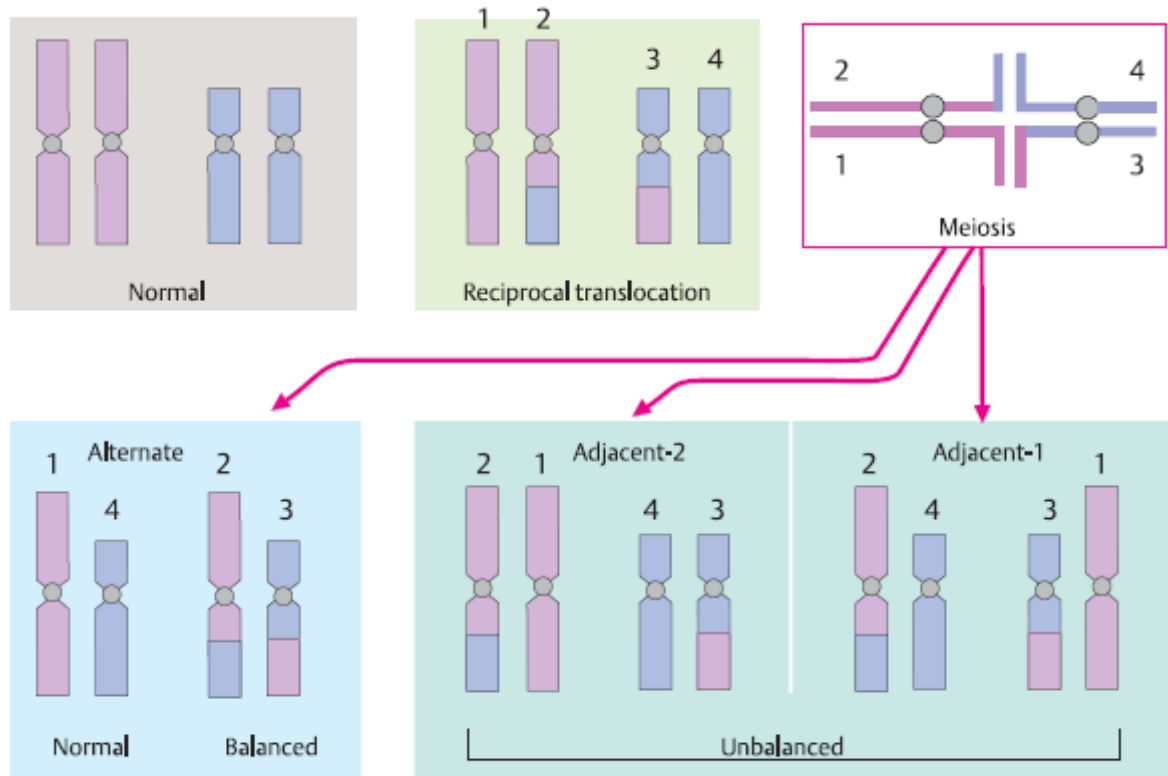


Fig. 1.9. Esquema donde se ejemplifican las segregaciones alterna, adjacente 1 y 2. Tomado de Passarge, E. 2001<sup>11</sup>.

Existen otros dos tipos de segregaciones, la 3:1 en la que segregan tres cromosomas hacia una célula y uno hacia otra, formando así gametos con 22 y 24 cromosomas, que dependiendo de los cromosomas involucrados y de la longitud de los segmentos pudieran ser compatibles con la vida. Y la segregación 4:0 en la que los cuatro cromosomas se irían hacia una célula y ninguno a la otra, produciendo una doble trisomía o una doble monosomía los cuales no son viables<sup>27</sup>.

Las principales indicaciones para la realización de un estudio citogenético incluyen:

- Malformación congénita mayor, definidas como aquellas que afectan la función.
- Transtorno de diferenciación sexual.
- Retraso en el desarrollo psicomotor.
- Retraso en el desarrollo puberal.
- Crisis convulsivas de difícil control, sin causa aparente.
- Pérdida gestacional recurrente, con más de tres abortos de repetición.
- Infertilidad.
- Edad materna avanzada.

Por lo anterior las técnicas citogenéticas son un recurso importante en el diagnóstico de un recién nacido o paciente en el que se sospeche una alteración cromosómica.

### 1.7. Técnicas de Citogenética

El análisis citogenético se lleva a cabo más comúnmente en los linfocitos T, que son estimulados con un agente mitógeno selectivo como es la fitohemaglutinina<sup>26</sup>. Posterior a un ciclo de replicación, las células entran en mitosis, momento en el que los cromosomas se encuentran en su máximo grado de compactación y son visibles en el microscopio. Después de 2-3 días de cultivo se adiciona un inhibidor de los microtúbulos para bloquear la división celular<sup>27</sup>.

Posteriormente se utilizan soluciones hipotónicas para que la célula se tumefacte y se torne frágil, de manera que al caer sobre una laminilla, la membrana celular se rompe distribuyendo a los cromosomas en la superficie a partir de donde se tiñen y se pueden analizar a través del patrón de bandeo<sup>2</sup>. Las bandas son regiones cromosómicas que pueden distinguirse de acuerdo a su intensidad en la tinción y éstas se subdividen en subbandas. Las bandas claras son ricas en GC y las bandas oscuras son ricas en AT<sup>5</sup>.

Las preparaciones cromosómicas pueden ser tratadas con diferentes agentes químicos para generar patrones de bandeo específicos, como son las bandas G, R, C, T o NOR. Las primeras o bandas G son las más frecuentemente utilizadas. Las bandas C, T y NOR son utilizadas para confirmación de la estructura de centrómeros, telómeros y satélites, respectivamente<sup>28</sup>.

Las bandas Q son generadas al utilizarse mostaza de Quinacrina (Q), sustancia fluorescente que al estimularse con una lámpara de luz ultravioleta, pone de manifiesto las regiones ricas en AT produciendo bandas intensas, y las regiones ricas en GC fluorescen de forma menos intensa<sup>28</sup>.

Las bandas G utilizan el colorante Giemsa (G), permitiendo su análisis en un microscopio de luz, es la técnica más frecuentemente utilizada. Las preparaciones cromosómicas reciben un pretratamiento con tripsina previo a su tinción con Giemsa. El patrón de tinción es muy similar al de las bandas Q, correlacionando con las bandas G oscuras (Q intensas) y las bandas G claras (Q menos intensas). Las bandas R generan un patrón de

tinción reverso al observado en las bandas G o Q, y permiten observar rearrreglos estructurales pequeños<sup>29</sup>.

Las bandas C ponen de manifiesto la heterocromatina constitutiva, presente en los centrómeros, tiñéndolos de forma oscura y el resto de la cromatina permanece clara, esto se logra tratando las preparaciones con soluciones ácidas y básicas y teñidas con Giemsa.

Las regiones organizadoras nucleolares las cuales se encuentran en los tallos o constricciones secundarias de los cromosomas acrocéntricos en el humano se analizan con las bandas NOR (por las siglas en inglés). Estas regiones se ponen en evidencia al impregnarlas con plata, su número normal es de 5 a 10. Tienen especial utilidad en las translocaciones ya que estas regiones pueden perderse, incrementando de tamaño las restantes por una actividad compensatoria, identificando con mayor precisión los puntos de ruptura de rearrreglos de cromosomas acrocéntricos<sup>29</sup>.

El FISH o hibridación in situ con fluorescencia es una técnica de citogenética molecular que utiliza una secuencia de nucleótidos marcada con fluorescencia, que sirve como sonda para localizar un DNA complementario, puede realizarse en cromosomas metafásicos (Fig. 1.10.) o de células en interfase<sup>30</sup>.

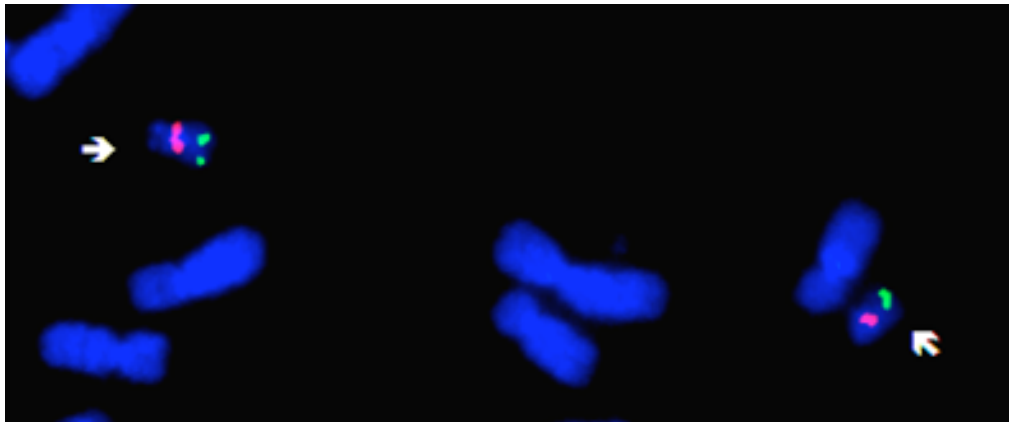


Fig. 1.10. Ejemplo de análisis de FISH con sonda TUPLE1 para descartar microdelección 22q11.2. Las señales en rojo corresponden a la región 22q11.2 y las señales en verde a la región 22q13 que se utiliza como control, por lo que en este ejemplo se descarta la delección 22q11.2. Imagen proporcionada por la Dra. Rocío Sánchez Urbina.

Existen varios tipos de sondas utilizadas según el segmento cromosómico que se investigue, entre ellas las que reconocen centrómeros específicos, cromosomas completos o secuencias específicas, estas últimas son utilizadas para identificar deleciones o duplicaciones. Las sondas de pintado cromosómico o (WCP, por sus siglas en inglés) son grupos de secuencias de ADN marcadas derivadas de un cromosoma específico, sirven para verificar una aberración cromosómica permitiendo esclarecer rearrreglos estructurales complejos, excepto inversiones<sup>31</sup>.

La hibridación genómica comparativa o CGH, es una técnica de citogenética molecular donde una muestra de ADN se extrae de un individuo con cariotipo normal, usado como control y se compara con el ADN obtenido del sujeto en estudio<sup>32</sup>. Estos ADN se marcan con diferentes fluorocromos y se hibridan en cromosomas en metafase de un individuo normal. Las diferencias en la intensidad de la fluorescencia representan ganancias o pérdidas de ADN del sujeto de estudio en comparación al control<sup>33</sup>. Una variante de esta tecnología son los microarreglos CGH, en donde se construyen superficies con ADN blanco, permitiendo detectar simultáneamente aneuploidías, deleciones, duplicaciones y amplificaciones<sup>34</sup>.

### 1.8 Errores Innatos del Metabolismo

El metabolismo es la red de procesos bioquímicos que presentan los organismos vivos para mantener sus funciones celulares. Se dividen de acuerdo a vías metabólicas específicas, las cuales dependen de substratos y enzimas para su adecuado funcionamiento<sup>35</sup>.

Los errores innatos del metabolismo (EIM) son enfermedades genéticas causadas por alteraciones en una vía bioquímica específica, cuya consecuencia incluye la deficiencia de un producto o acumulación de un sustrato que puede generar toxicidad. Ambos escenarios resultan en disfunción de una vía metabólica específica<sup>36</sup>.

En 1908 Sir Archibald Garrod acuñó el término EIM para describir estos defectos metabólicos hereditarios. Su incidencia es variable de acuerdo a la clase de alteración metabólica y al grupo étnico, pero se calcula que tienen una prevalencia aproximada como grupo de 15.7 por cada 100,000 nacimientos<sup>37</sup>.

Los EIM incluyen más de 500 enfermedades, en términos generales uno de cada 800 recién nacidos vivos nace con un EIM y el 50% de ellos desarrollará síntomas en el periodo

neonatal<sup>38</sup>. La gran mayoría se hereda de forma autosómica recesiva, siendo ambos padres heterocigotos para el gen mutado, sin expresar la enfermedad y sus descendientes pueden ser homocigotos presentando clínicamente la alteración<sup>39</sup>.

Existen varias formas para clasificar a los EIM: de acuerdo al órgano afectado, al organelo afectado, a la edad de presentación y si involucran moléculas grandes o pequeñas. Esta última clasificación engloba mejor la presentación clínica, fisiopatológica y el manejo de estas enfermedades<sup>40</sup>.

Las enfermedades de moléculas grandes se asocian a una aparición gradual con manifestaciones clínicas específicas y cambios histopatológicos, mientras que las de moléculas pequeñas su inicio es agudo, en un periodo de stress, pueden presentar remisiones y recaídas y las características clínicas poco específicas<sup>40</sup>. (Tabla. 1.2.)



Tabla. 1.2. Ejemplo de la clasificación de los EIM, el criterio considerado es si afectan o implican a moléculas grandes o pequeñas. Modificada de Lanpher *et al.* 2006<sup>37</sup>.

<b>Moléculas grandes</b>	<b>Moléculas pequeñas</b>
Degradación de ácidos grasos	Metabolismo de los aminoácidos
Mucopolisacaridosis	Defectos en el ciclo de la urea
Enfermedades por depósito de glucógeno	Metabolismo de los ácidos orgánicos
Biogénesis de los peroxisomas	Defectos en la oxidación de ácidos grasos
	Metabolismo de los monosacáridos y disacáridos.
	Biosíntesis del colesterol
	Síntesis de purinas y pirimidinas
	Transporte de los metales
	Metabolismo de ácidos pirúvico y láctico
	Metabolismo de las vitaminas

### 1.8.1 Abordaje de los pacientes con Errores Innatos del Metabolismo.

Los datos de sospecha de un EIM varían de acuerdo a si se trata de un paciente en etapa de recién nacido, infancia o en la adultez. Debido a que las manifestaciones son inespecíficas (Tabla. 1.3.) se debe mantener un índice de sospecha de estas enfermedades, haciendo diagnóstico diferencial de septicemia, enfermedad respiratoria, cardiaca, gastrointestinal o neurológica. Al haber sido descartadas las anteriores se debe realizar un abordaje que incluya la posibilidad de consanguinidad, endogamia, abortos previos, casos de muerte súbita o presentación familiar de cuadros similares<sup>41</sup>.

Tabla. 1.3. Principales manifestaciones clínicas de los EIM. Modificada de Gómez-Gómez *et al*, 2006<sup>42</sup>.

<b>Respiratorias</b>	<b>Neurológicas</b>	<b>Gastrointestinales</b>	<b>Organomegalia</b>
Apnea	Hipo/Hipertonía	Vómito	Hígado
Dificultad respiratoria	Irritabilidad	Problemas para la alimentación	Bazo
Taquipnea	Letargo hasta coma	Diarrea	Corazón
	Succión débil	Ictericia	
	Crisis convulsivas	Colestásis	

Dentro de los exámenes de laboratorio que se deben solicitar a estos pacientes se incluyen: biometría hemática, examen general de orina, gasometría, electrolitos séricos, glucemia, amonio, sustancias reductoras en orina, cetonas urinarias y lactato. También se debe solicitar un tamiz metabólico en orina cualitativo el cual se realiza en nuestra Institución e incluye las siguientes pruebas<sup>42</sup>:

1. Prueba de cloruro férrico: detecta en la orina sustancias aromáticas.
2. Dinitrofenilhidracina: detecta alfacetoácidos.
3. Nitrosoaftol: detecta la presencia de fenoles.
4. Cianuro de nitroprusiato: identifica moléculas con puentes disulfuro y aminoácidos azufrados.
5. Cloruro de cetilpiridino y azul de toluidina (Fig. 1.2.): detecta la presencia de mucopolisacáridos o glicosaminoglicanos en orina.

La positividad del rastreo significa *sospecha* de la enfermedad y requiere una confirmación diagnóstica. De salir positivas algunas de estas pruebas con un cuadro clínico sugestivo de EIM, se deben realizar estudios de cromatografía de aminoácidos, en capa fina, de líquidos de alta resolución o de gases acoplada a la espectrometría de masas, según sea el caso.

En el caso particular de las mucopolisacaridososis (MPS), el tamizaje urinario cualitativo para glicosaminoglicanos puede ser inespecífico con resultados falsos positivos, por lo que una prueba negativa no debe descartar el diagnóstico cuando la sospecha clínica apoya la presencia de este tipo de enfermedad por almacenamiento lisosomal. Por lo anterior es recomendado que se analice más de una muestra de orina antes de poder ofrecer un resultado definitivo<sup>43</sup>.

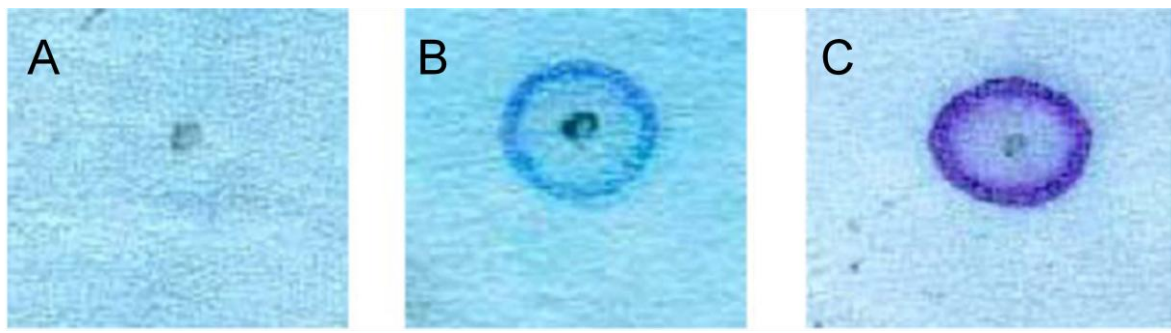


Fig. 1.12. Prueba de azul de Toluidina para detección de glicosaminoglicanos. A es negativa, B es ligeramente positiva y C es positiva. Fotografía proporcionada por la M. en C. Patricia Baeza Capetillo, Genética HIMFG.

### 1.9 Mucopolisacaridosis

Las MPS son un grupo de enfermedades de almacenamiento lisosomal causadas por la deficiencia de una enzima encargada de la degradación de glicosaminoglicanos. Estas deficiencias enzimáticas llevan a la acumulación de glicosaminoglicanos en los lisosomas<sup>44</sup>.

Los glicosaminoglicanos se encuentran distribuidos en varios tejidos, particularmente en el tejido conectivo. Estos compuestos incluyen la heparina, el ácido hialurónico, sulfatos de coindritín, queratán, y dermatán, los cuales contribuyen a funciones biológicas importantes como la modulación de la actividad enzimática, regulación del crecimiento celular, ensamblaje y funcionamiento de la matriz extracelular a través de la unión no covalente con proteínas<sup>45</sup>.

Dependiendo de la enzima deficiente hay afectación del metabolismo del sulfato de heparán, dermatán, queratán o coindritin, ocasionando disfunción celular, tisular y de los órganos, además excretando el exceso por la orina<sup>46</sup>.

Las enzimas asociadas al catabolismo de los glicosaminoglicanos son hidrolasas lisosomales, y aquellos pacientes que tienen una MPS tienen una actividad enzimática residual menor al 1%. Su incidencia como grupo está calculada en aproximadamente en 1: 22, 500 recién nacidos<sup>47</sup>.

Tienen un curso progresivo y crónico, su edad de inicio, gravedad e involucro del sistema nervioso central son variables. La mayor parte de estas enfermedades se presentan con involucro multisistémico, facies anormal, organomegalia y disostosis múltiple.

Existen siete grupos principales de MPS los cuales se distinguen dependiendo del tipo de deficiencia enzimática, de los glicosaminoglicanos almacenados y sus manifestaciones clínicas<sup>47</sup>, como se muestra en la Tabla. 1.4.

Tabla. 1.4. Clasificación Bioquímica de las MPS. Modificada de Muenzer 2004<sup>47</sup>

<b>Tipo</b>	<b>Epónimo</b>	<b>Deficiencia enzimática</b>	<b>Glicosaminoglicano almacenado</b>
<b>MPS I</b>	Hurler-Schie	$\alpha$ -L-iduronidasa	Sulfato de dermatán y heparán.
<b>MPS II</b>	Hunter	Iduronato sulfatasa	Sulfato de dermatán y heparán.
<b>MPS IIIA</b>	Sanfilippo A	Heparán N-sulfatasa	Sulfato de heparán.
<b>MPS IIIB</b>	Sanfilippo B	$\alpha$ -N-acetil-glucosaminidasa	Sulfato de heparán.
<b>MPS IIIC</b>	Sanfilippo C	Acetil-CoA- $\alpha$ -glucosaminidasa	Sulfato de heparán.
<b>MPS IIID</b>	Sanfilippo D	N-acetilgalactosamina 6-sulfatasa	Sulfato de heparán.
<b>MPS IVA</b>	Morquio A	Galactosa 6 sulfatasa	Sulfato de queratán y coidrintin 6 sulfato.
<b>MPS IVB</b>	Morquio B	$\beta$ -galactosidasa	Sulfato de queratán.
<b>MPS VI</b>	Marateaux-Lamy	Arilsulfatasa B	Sulfato de dermatán.
<b>MPS VII</b>	Sly	$\beta$ -glucoronidasa	Sulfato de dermatán, heparán, coindrintin 4 y 6.
<b>MPS IX</b>		Hialuronidasa	Hialuronano.

El diagnóstico de las MPS se basa en el cuadro clínico, apoyado por los estudios radiológicos, los cuales muestran disostosis múltiple. La determinación cuantitativa en orina determina el tipo y concentración de glicosaminoglicanos excretados<sup>48</sup>. La microscopía de luz y la electrónica de una biopsia de permiten visualizar el material de depósito (Fig. 1.13), posteriormente se realiza la confirmación del diagnóstico con la determinación enzimática específica<sup>49</sup>.

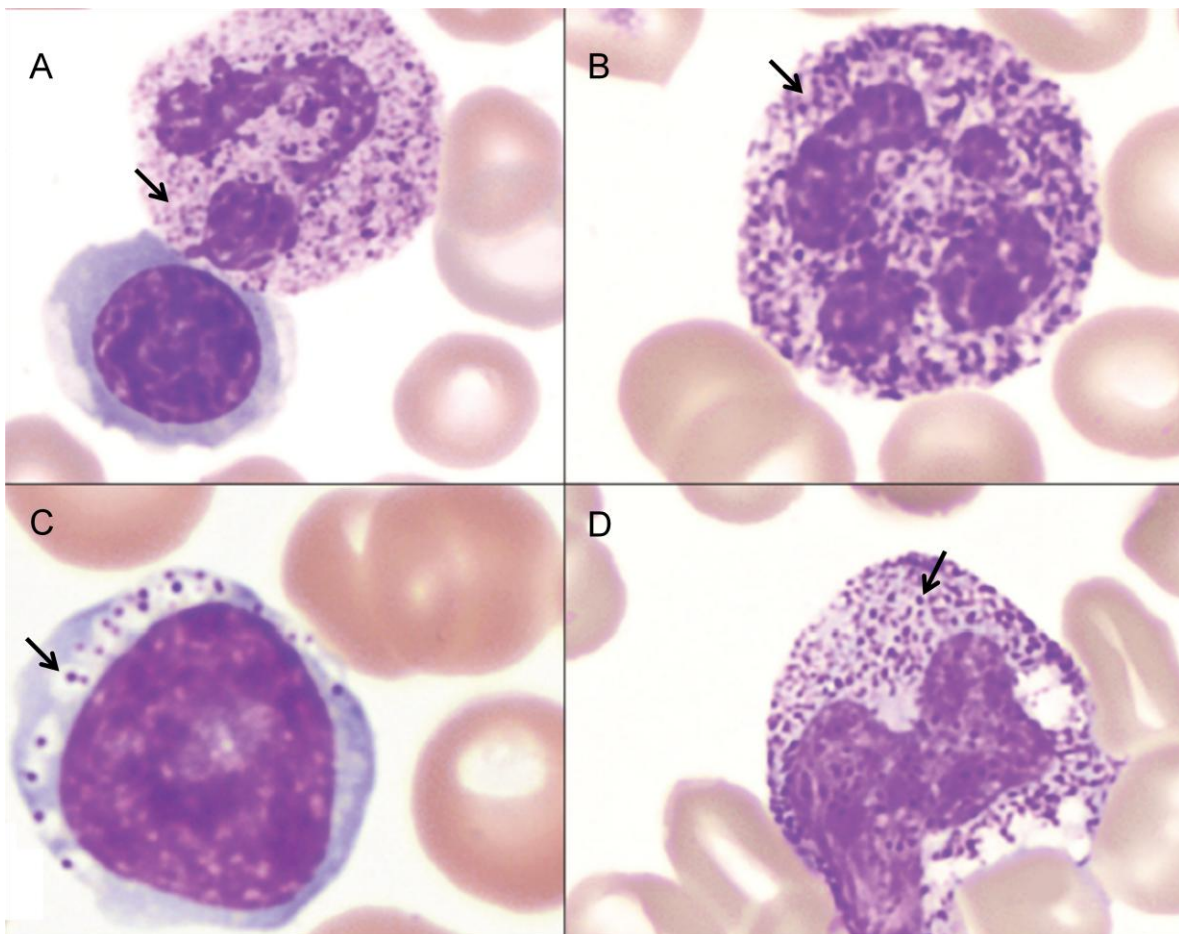


Fig.1.13. Las flechas muestran diversas células sanguíneas con vacuolas citoplasmáticas, A: Eosinófilo, B: Neutrófilo, C: Linfocito y D: Monocito. Fotografía tomada de Carrillo-Farga J<sup>50</sup>.

El manejo de estos pacientes es multidisciplinario (genetistas, cardiólogos, neurólogos, neumólogos, otorrinolaringólogos, oftalmólogos, ortopedistas, rehabilitadores) debido a que es una afección multisistémica.

El trasplante de células madres fue el primer tratamiento utilizado para las MPS, con esto las células del donador producen enzima lo que genera reducción del almacenamiento lisosomal; este tratamiento es útil para algunos tipos, particularmente la tipo I, sin embargo, presenta un riesgo incrementado de mortalidad<sup>51</sup>.

El remplazo enzimático es una alternativa que sigue en desarrollo, donde una enzima recombinante es dada de forma exógena. Actualmente únicamente existe tratamiento para la tipo I, II y VI, sin embargo su uso y disponibilidad es limitado. Otras terapias que se encuentran en investigación son la terapia génica, el uso de chaperonas y la deprivación de sustrato<sup>52</sup>.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

- Existen pocos casos reportados del síndrome de duplicación 3q, aproximadamente el 60% son debidos a una translocación balanceada presente en alguno de los padres. En ninguno de los casos descritos hasta ahora en la literatura, se ha reportado alteración bioquímica del tipo de glicosaminoglicanos asociada al síndrome. En el caso de nuestra propósita se describieron alteraciones fenotípicas, morfológicas y bioquímicas que corresponden al síndrome por duplicación 3q, sin embargo presenta además mucopolisacariduria. Ya que la paciente tiene una aberración cromosómica, se debió descartar que esta fuese *de novo* o derivada de un padre portador, lo que dio inicio al estudio familiar para en base a la historia familiar, descartar la presencia de individuos portadores y afectados, lo cual es un requisito indispensable para establecer el diagnóstico, manejo y asesoramiento genético.



### 3. JUSTIFICACIÓN

- El estudio clínico, citogenético y bioquímico de esta paciente nos permitirá establecer una explicación acerca de la relación entre los fenotipos clínico y bioquímico con el genotipo, determinar el estado de portadores de la translocación balanceada y desbalanceada en los integrantes de la familia y establecer los riesgos de recurrencia para la descendencia de los portadores balanceados de la t(3;13) y así brindar un asesoramiento genético adecuado a los miembros de dicha familia.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Principal:

- Describir por clínica, citogenética convencional y molecular y bioquímica enzimática a los miembros de una familia con translocación recíproca t(3;13) identificada a partir de una paciente trisomía 3q26-pter y fenotipo de síndrome por duplicación 3q así como mucopolisacariduria.

### 4.2 Secundarios:

- Establecer si existe relación entre el fenotipo morfológico y bioquímico de la paciente con la alteración cromosómica identificada.
- Identificar los puntos de ruptura de la alteración cromosómica utilizando las técnicas de análisis cromosómico con bandas GTG y NOR así como análisis de FISH.
- Analizar y correlacionar los hallazgos citogenéticos de la propósa con las alteraciones metabólicas encontradas.
- Establecer la correlación fenotipo-cariotipo en esta familia y compararla con los casos publicados en la literatura.
- Analizar la segregación meiótica en un portador balanceado de la translocación para brindar asesoramiento genético adecuado.
- Brindar asesoramiento genético a la familia así como establecer el manejo y seguimiento multidisciplinario requerido.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

Como se describe en la Fig. 5.1. previo consentimiento informado, con autorización Institucional y del Comité de Tesis, se incluyó a esta familia en el protocolo “Determinación de puntos de ruptura por técnica de FISH en casos de rearrreglos cromosómicos complejos en 9 pacientes del Hospital Infantil de México Federico Gómez” registro HIM/2007/011, cuyo investigador responsable es la Dra. Rosa Isela Ortíz de Luna. (Anexo I)

Se realizó estudio clínico, bioquímico (tamiz metabólico en orina y actividad enzimática), citogenético (con bandas GTG, NOR y FISH, a partir de cultivo de linfocitos de sangre periférica), así como análisis por microscopía electrónica de transmisión en sangre periférica a la paciente. De acuerdo a los lineamientos internacionales y posterior a consentimiento informado, se propuso realizar estudio citogenético con bandas GTG en sangre periférica a los padres. Posteriormente, se realizó análisis con técnica de bandas NOR y FISH utilizando una sonda para pintado completo del cromosoma 3 (*Whole Chromosome Painting, WCP 3 Cytocell*®) en las preparaciones cromosómicas obtenidas a partir de cultivo de linfocitos de sangre periférica de la madre. En los anexos II se describen las técnicas de laboratorio empleadas.

A partir de los resultados obtenidos del estudio cromosómico a los padres, se decidió realizar estudio citogenético y tamiz metabólico cuantitativo en orina a los familiares de segundo grado por rama materna.

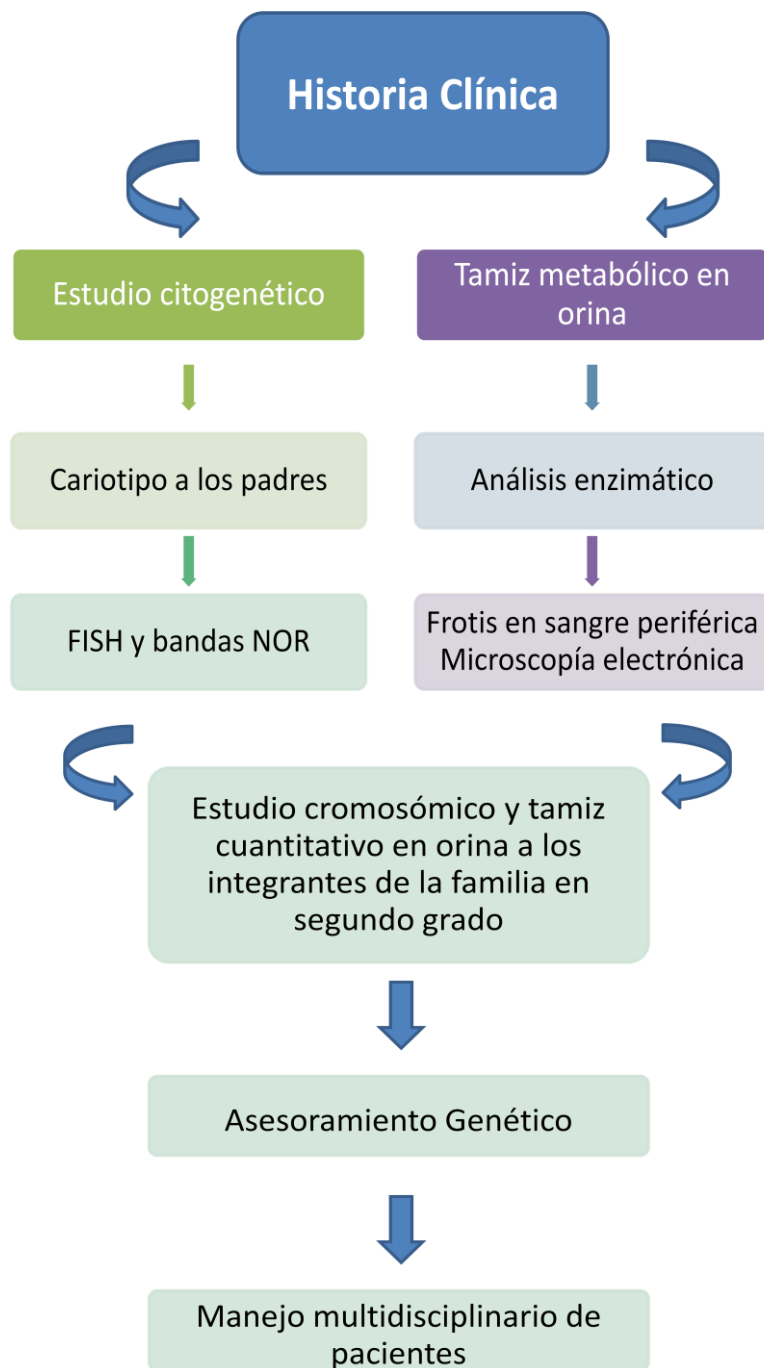


Fig. 5.1 Algoritmo de abordaje diagnóstico de la propósa y su familia.

## 5.1 Presentación del caso clínico (individuo IV.6 en la Fig.6.6.)

La paciente acudió a nuestra Institución habiendo sido previamente valorada en otra Institución en donde se había determinado presencia de glicosaminoglicanos urinarios. Acude al HIMFG solicitando manejo integral por presentar síndrome dismórfico y sospecha de error innato del metabolismo. Se realizó evaluación integral de la paciente e historia clínica, iniciando estudio por síndrome dismórfico y retraso en el desarrollo psicomotor.

### 5.1.1 Descripción clínica del caso 1

Paciente femenina conocida en nuestra institución en el departamento de Genética a los 13 meses de edad. Es producto de la tercera gesta de padres jóvenes, originarios del Estado de México, no consanguíneos, ni provenientes de una comunidad endogámica, aparentemente sanos, con antecedente de un aborto en primer trimestre del cual se desconoce la causa. Tiene dos hermanas de 6 y 2 años aparentemente sanas (Fig. 6.6.). Tío materno de 30 años de edad, con retraso mental, no conocido por nuestro Departamento, descrito en fotografías como con fenotipo similar a la paciente. Dos primos hermanos, por rama materna, de 7 años (Fig. 6.6. individuo IV.2) y 6 años de edad (Fig. 6.6. individuo IV.3) descritos como con RDPM. Uno de ellos fue conocido en nuestra Institución desde los 2 meses de edad por síndrome colestásico, siendo manejado por el Departamento de Gastroenterología, y el cual no fue referido al Departamento de Genética para evaluación.

La propósita es producto de embarazo con hipomotilidad fetal, obtenida por vía abdominal a término por desproporción céfalo-pélvica. Peso 4500gr ( $\geq$ p.95), talla 51 cm (p.75), Apgar 8/9. Presentó cianosis al 4to día de vida, se realizó ecocardiograma descartándose cardiopatía.

A la exploración física a los 13 meses de edad presentó peso de 12kg (p.97), talla 73cm (p.25) y perímetro cefálico 46cm (p.75). Se describió braquicefalia, cara con hipertrichosis en frente, sinofris, fisuras palpebrales oblicuas hacia arriba, pestañas largas y abundantes. Puente nasal ancho, narinas antevertidas, comisuras labiales hacia abajo, fosetas preauriculares. Cuello corto y ancho, teletelia, cardiopulmonar sin agregados. Abdomen blando depresible, borde hepático 3-2-2, la columna y extremidades íntegras. Genitales acorde a edad y sexo. Se iniciaron valoraciones y manejo multidisciplinario en los servicios de Genética, Gastroenterología y Pediatría.

La Fig. 5.2. muestra una fotografía de la propósita a los 3 años edad donde se aprecia engrosamiento de pliegues nasogeneanos, puente nasal ancho, filtrum largo, foseta preauricular y cuello corto. Estas alteraciones fueron descritas desde su primera consulta.



Fig. 5.2. Fenotipo de la propósita a los 3 años 3 meses (A) y a los 3 años con 5 meses (B) respectivamente.

Debido al fenotipo de la paciente y con el antecedente del estudio previo de tamiz metabólico en orina cualitativo descrito como positivo a glicosaminoglicanos, se determinó confirmar la presencia de alteración metabólica.

Se realizó estudio de tamiz metabólico cualitativo en orina en el departamento de Genética del HIMFG (M. en C. Patricia Baeza Capetillo) el cual fue negativo, sin embargo con el antecedente de un resultado externo positivo para glicosaminoglicanos, se solicitó cuantificación de glicosaminoglicanos en orina (Dra. Patricia Gallegos Arreola, CIBO IMSS). Se determinaron enzimas lisosomales iduronato 2 sulfatasa y arilsulfatasa B. (Dra. Paula Rosemberg, Universidad La Plata, Argentina) y  $\beta$ -glucuronidasa en dos ocasiones (Instituto de Hematopatología, México).

Como parte del abordaje de nuestra paciente se le realizó estudio citogenético con bandas GTG a la paciente y de acuerdo al resultado se solicitó el estudio a otros miembros de la familia (QFB. Ana Aparicio Onofre, Departamento de Genética HIMFG).

Debido a los hallazgos citogenéticos, se realizó cariotipo con bandas NOR a la madre de la propósita (M. en C. Roberto Guevara Yáñez, Laboratorios Biogen) y FISH con la sonda WCP 3 Cytocell® (Dra. Rocío Sánchez Urbina, Departamento de Genética HIMFG). Se realizó frotis sanguíneo y análisis microestructural con microscopía electrónica de transmisión buscando cuerpos de inclusión (Dr. Pedro Valencia Mayoral y Biol. Alejandra Rodríguez Departamento de Patología HIMFG).

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Análisis Bioquímico.

Se realizó estudio de tamiz metabólico cualitativo en orina en donde se obtuvo una relación ácido urónico/creatinina compatible con mucopolisacaridosis. Se cuantificó glicosaminoglicanos en orina en tres ocasiones, la primera de tipo cualitativo (ANEXO IV), fue negativa para la prueba de azul de toluidina (negativo para glicosaminoglicanos). Sin embargo, ante el fenotipo de la paciente se decidió llevar a cabo nuevamente el estudio de manera cuantitativa para determinar la presencia y en su caso tipo de MPS, obteniéndose los siguientes resultados (Tabla. 6.1.):

Tabla. 6.1. Resultados del análisis de glicosaminoglicanos en orina.

Análisis en orina	Resultados
Tamiz en orina cuantitativo (2009) Dra. Patricia Gallegos Arreola CIBO, IMSS.	Dermatan Sulfato (+), Heparan sulfato (+), Condroitin 4 y 6 sulfato (+++).
Tamiz en orina cuantitativo (2010) Dra. Patricia Gallegos Arreola CIBO, IMSS.	Heparan sulfato (+), Condroitin 4 y 6 sulfato (++)

Con base en los resultados anteriores, se determinó realizar el estudio de actividad enzimática para enzimas implicadas en el metabolismo de los glicosaminoglicanos. El análisis de actividad enzimática fue realizado para 3 enzimas lisosomales: iduronato 2 sulfatasa, arilsulfatasa B y  $\beta$ -glucuronidasa de acuerdo al patrón específico de glicosaminoglicanos urinarios encontrado. (Tabla. 6.2.)



TABLA. 6.2. Resultados de la determinación de la actividad de enzimas lisosomales.

Enzima analizada 2009	Resultado	Rangos
<i>Iduronato 2 sulfatasa</i> <b>Diagnóstico e Investigación de Enfermedades Lisosomales, Argentina (DIEL).</b>	100.47nmol/l.h	57.39-149.47nmol/l.h.
<i>Aril-sulfatasa B</i> <b>Diagnóstico e Investigación de Enfermedades Lisosomales, Argentina (DIEL).</b>	9.81nmol/l.h	7.01-21.07nmol/l.h.
<b><i>B- glucoronidasa.</i></b> <b>Instituto de Hematopatología, México.</b>	52 pmol/disco*h	59-275.4pmol/disco*h.

Debido a que los valores reportados en el estudio enzimático de  $\beta$ -glucoronidasa se encontraron por debajo de los límites normales, se repitió para confirmar este dato con resultados por debajo de los rangos de normalidad determinada. Sin embargo, se reportó que la muestra estaba degradada por lo que se tomó una tercera determinación, la cual se encontraba en límites normales. Tabla.6.2.

Tabla. 6.2. Resultados de actividad enzimática para  $\beta$ -glucoronidasa realizado por el Instituto de Hematopatología, México.

<b><i>B-glucoronidasa.</i></b> <b>(Nov 2009)</b>	<b>52 pmol/disco*h</b> <b>14 <math>\mu</math>mol/L*h</b>	<b>59-275.4pmol/disco*h</b>
<b><i>B-glucoronidasa.</i></b> <b>(Jun 2010)</b>	40 pml/disco*hr 11 $\mu$ mol/L*h	59-275.4pmol/disco*h Muestra degradada.
<b><i>B-glucoronidasa.</i></b> <b>(Jun 2010)</b>	173 pmol/disco*h 49 $\mu$ mol/L*h	59-275.4pmol/disco*h

Se realizó frotis de sangre periférica con la técnica de Wright, encontrando linfocitos vacuolados (Fig. 6.1.), sin embargo, por las condiciones de la muestra se decidió complementar el estudio, por lo que se buscaron intencionadamente alteraciones microestructurales por microscopía electrónica de transmisión. No se encontraron acumulaciones sugestivas de enfermedad por almacenamiento lisosomal en linfocitos. (Fig. 6.2.)

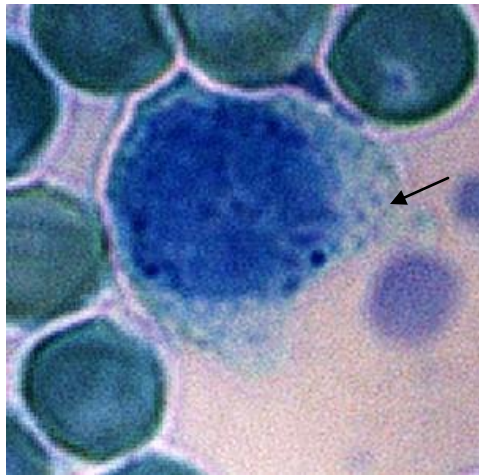


Fig. 6.1. Frotis de sangre periférica teñido con Wright, la flecha señala vacuolas citoplasmáticas en un linfocito.

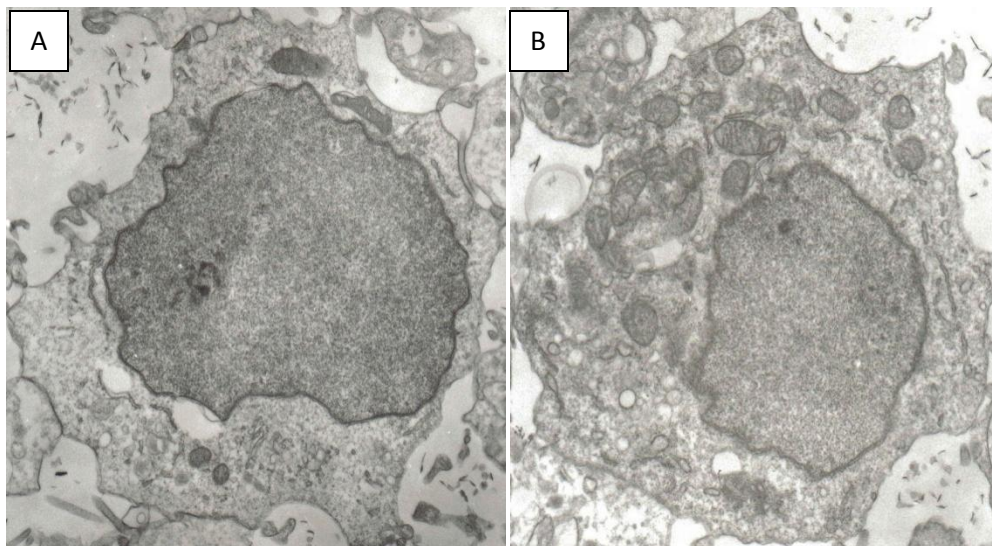


Fig. 6.2. Microscopía electrónica de transmisión de dos linfocitos de sangre periférica (A y B). Ambos son negativos para la acumulación de material lisosomal.

## 6.2. Análisis Cromosómico

### 6.2.1. Análisis Cromosómico de la propósita

Se realizó análisis cromosómico con técnica de bandas GTG en sangre periférica a la paciente, se revisaron 25 metafases y se encontró el siguiente complemento cromosómico (Fig. 6.3.):

46,XX,add(13)(p12)

El cual corresponde a un individuo femenino con material adicional en los brazos cortos del cromosoma 13.

### 6.2.2. Análisis cromosómico de la madre de la paciente (Individuo III.4, Fig. 6.6.)

Siguiendo el algoritmo de abordaje de pacientes con una anormalidad cromosómica, se solicitaron estudios citogenéticos con técnica de bandas GTG a los padres. El cariotipo del padre fue normal, 46,XY. El cariotipo de la madre (individuo III.4, Fig. 6.6.), fue 46,XX,t(3;13)(q26;p12), con lo que se determinó que el material cromosómico adicional encontrado en el cromosoma 13 de la paciente era proveniente del cromosoma 3 materno. (Fig. 6.4.A. y Fig. 6.4.B.)

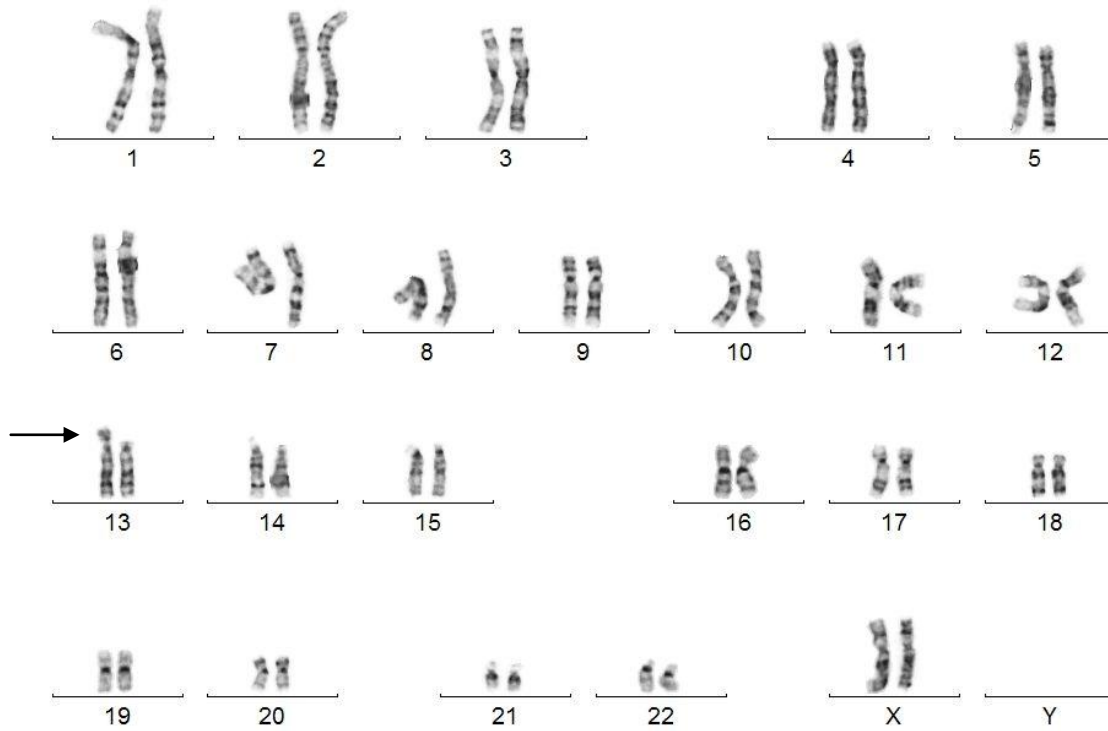


Fig. 6.3. Cariotipo de la propósita con técnica de bandas GTG. La flecha señala el material adicional en los brazos cortos del cromosoma 13.

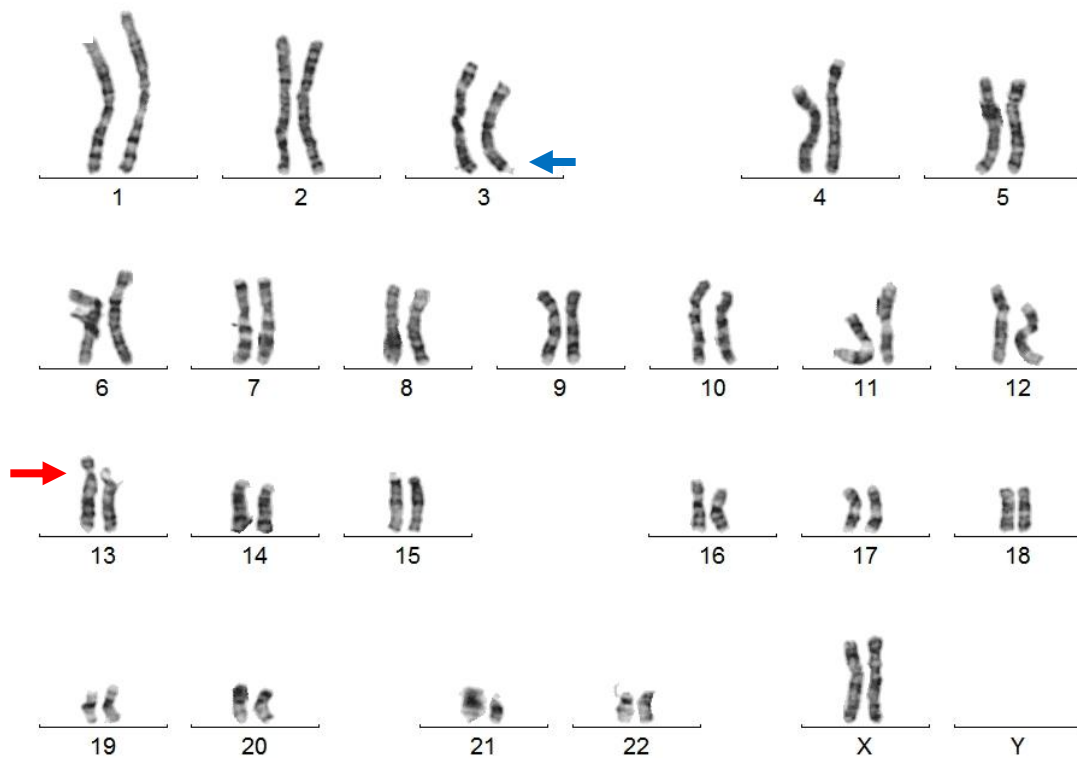


Fig.6.4.A. Cariotipo la madre de la paciente 46,XX,t(3;13)(q26;p12) con técnica de bandas GTG (individuo III.4). La flecha de color azul muestra los satélites del cromosoma 13 en el extremo qter del cromosoma 3 y la flecha de color rojo muestra el material adicional en 13p que corresponde a una región proveniente de 3q, por lo que se trata de una translocación recíproca aparentemente balanceada.



Fig. 6.4.B. Cariotipo parcial con bandas GTG del individuo III.4 donde se demuestra la  $t(3;13)(q26;p12)$ . Obsérvense los satélites del cromosoma 13 (flecha azul) y el material adicional en 13p (flecha roja).

La fórmula desarrollada del complemento cromosómico materno es:

$46,XX,t(3;13)(3pter \rightarrow 3q26::13p12 \rightarrow 13pter;3qter \rightarrow 3q26::13p12 \rightarrow 13qter)$ .

Se realizó tinción con técnica de bandas NOR en los cromosomas de la madre, en donde se observó impregnación argéntica en el cromosoma 3 con satélites y su asociación con los cromosomas acrocéntricos. (Fig. 6.5.A)

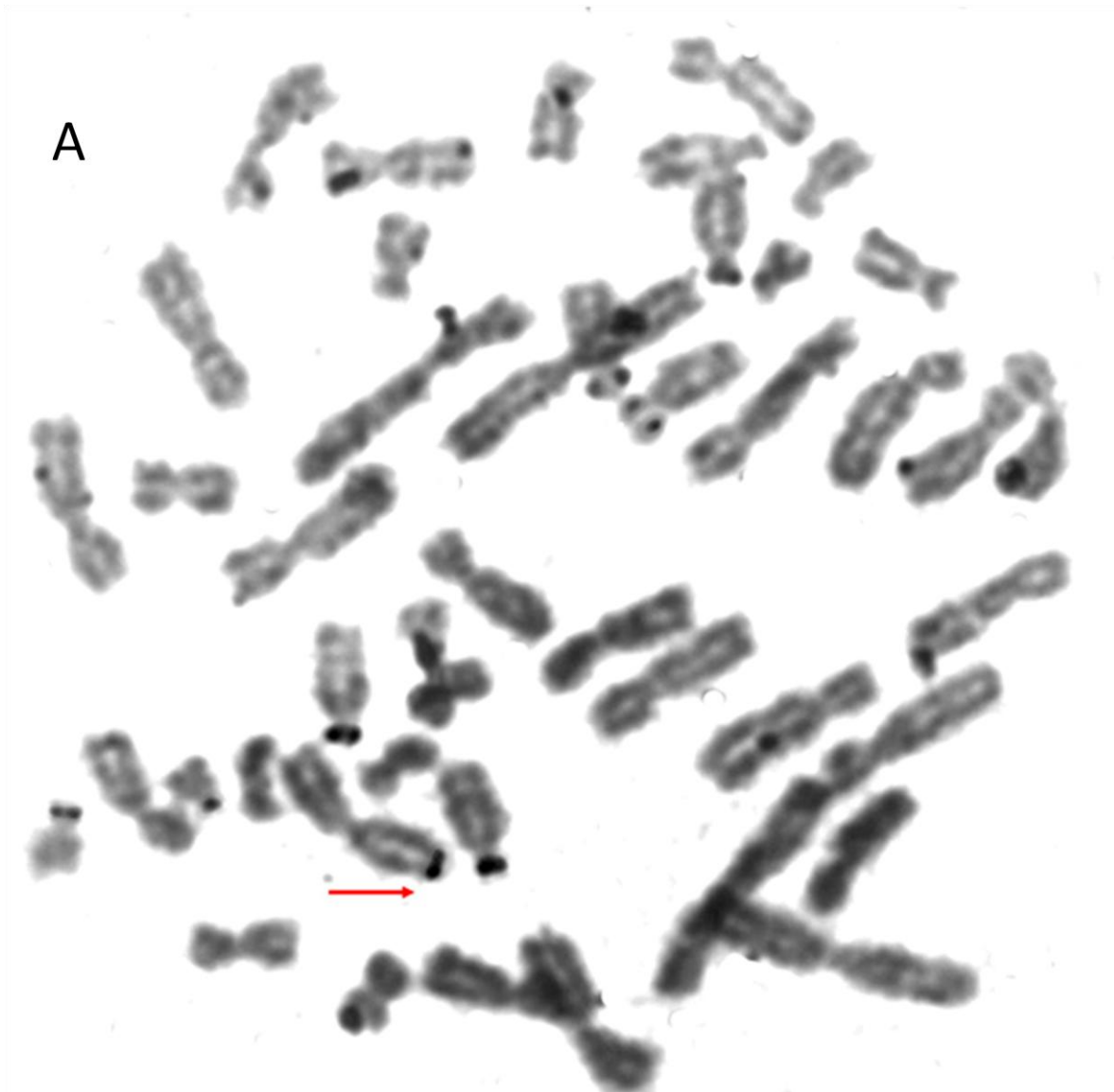


Fig. 6.5.A. Metafase teñida con técnica de bandas NOR obtenida a partir de la muestra de sangre periférica materna. La flecha señala la región organizadora nucleolar en la región telomérica del cromosoma 3q.

Además, se realizó estudio citogenético molecular en muestra de sangre periférica de la madre de la propósita para lo cual se utilizó pintado cromosómico tipo Whole Chromosome Painting con la sonda WCP 3 Cytocell®, demostrando translocación de material del cromosoma 3 (Fig. 6.5.B.).

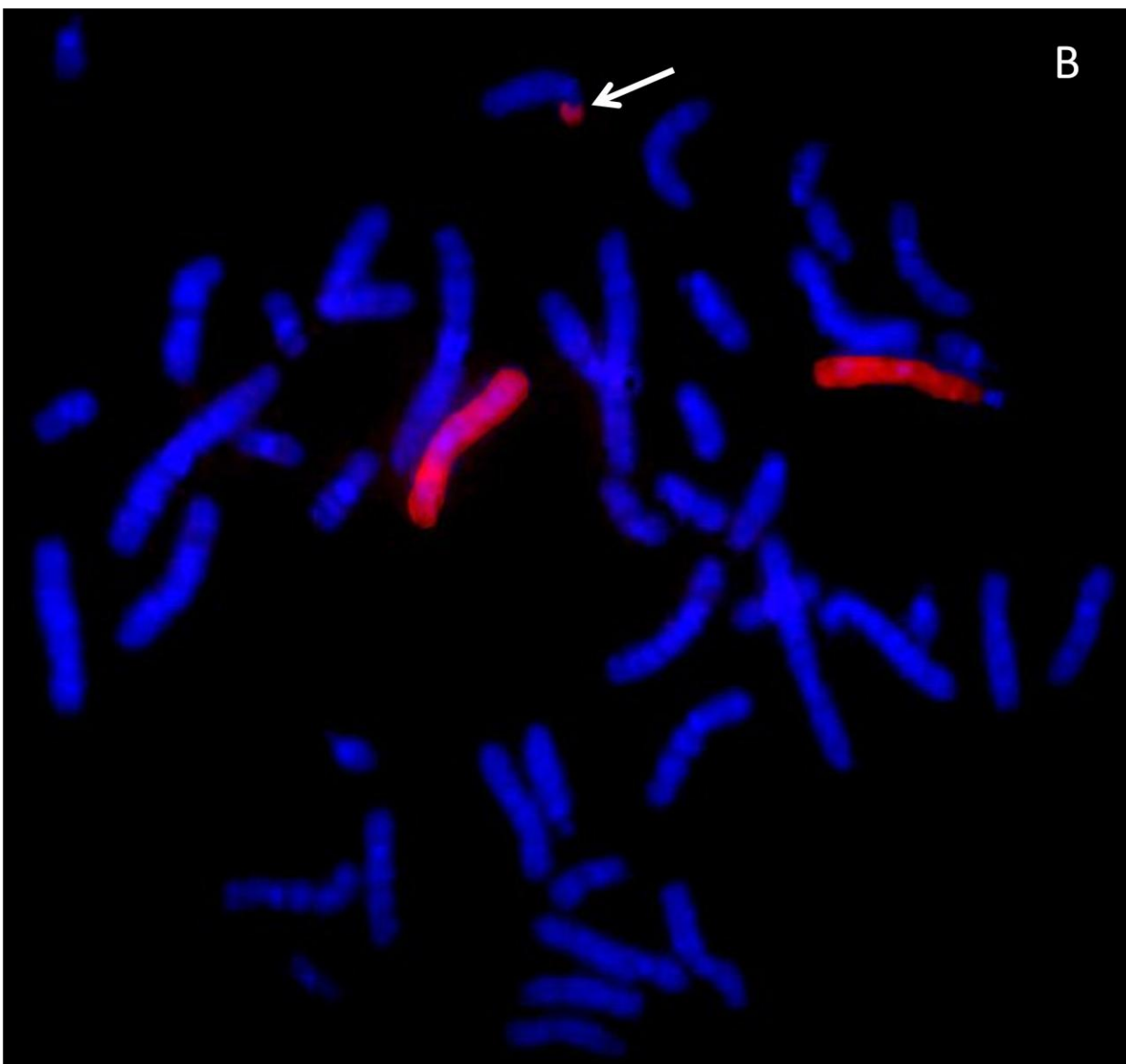


Fig. 6.5.B. Metafase de la madre con FISH con WCP3 Cytocell®, donde se demuestra o se observa material del cromosoma 3 en el 13.

La fórmula cromosómica después del análisis con la sonda WCP es:

46,XX,t(3;13)(q26;p12), ish der(13)t(3;13)(q26;p12)(wcp3+)



### 6.3. Análisis Familiar

#### 6.3.1. Análisis Citogenético Familiar

Se completó el estudio familiar por medio de análisis de cariotipo con técnica de bandas GTG en sangre periférica en los familiares (Fig. 6.6.), encontrando varios portadores de la translocación balanceada (individuos II.2, III.3, III.4, III.5, IV.4 y IV.9) y tres individuos desbalanceados (IV.2, IV.3 y IV.6), todos con el  $der(13)t(3;13)(q26;p12)$ .

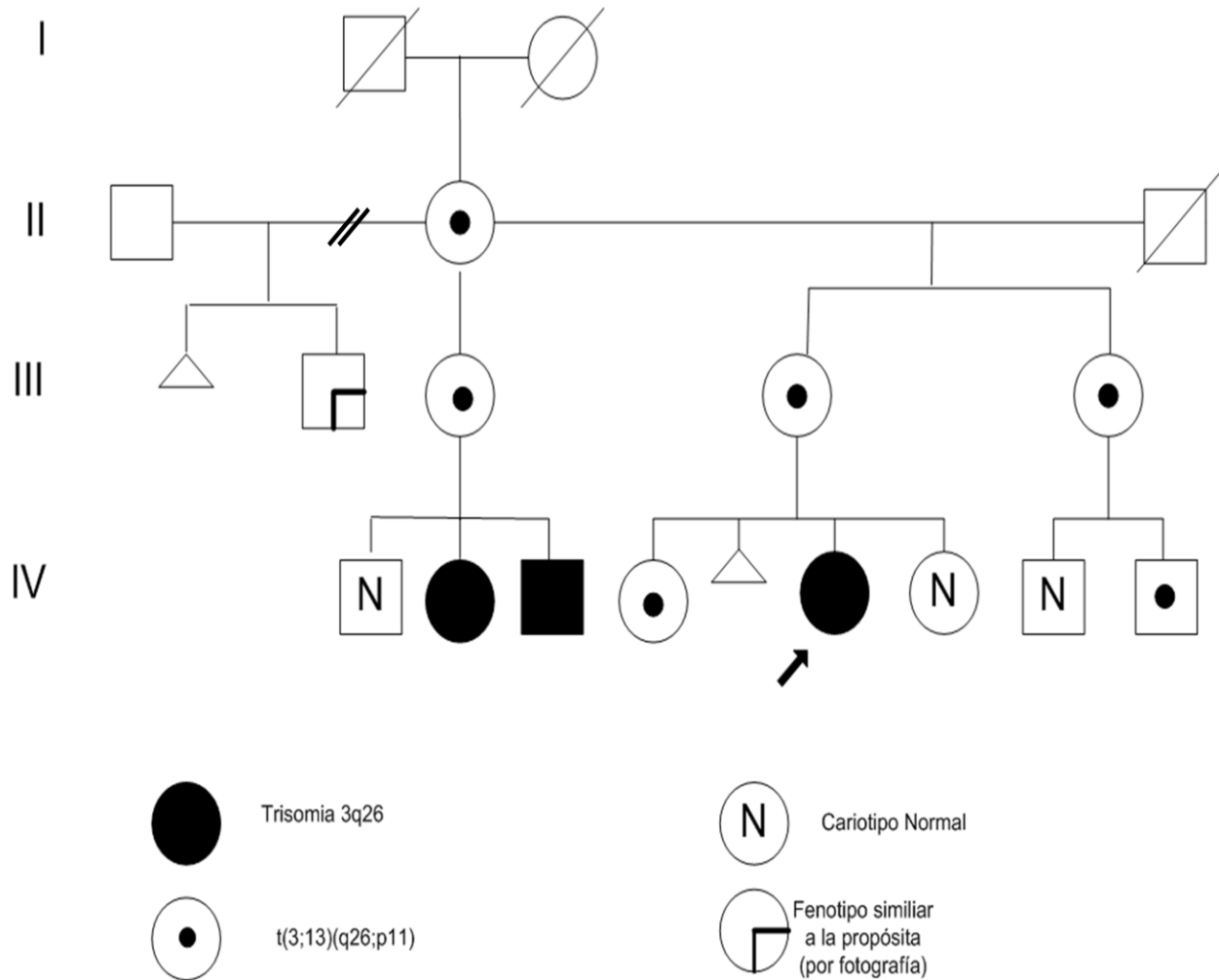


Fig. 6.6. Árbol Genealógico de la familia estudiada. El individuo III.2 comparte las características clínicas de la propóstita (revisado en fotografía), no fue posible realizar estudio citogenético. El individuo II.2 tuvo 3 parejas, la segunda pareja, padre del individuo III.3, se omite por no ser relevante para el análisis del caso.

### 6.3.2 Descripción del Caso 2 (Individuo IV.3 en la Fig. 6.6.)

Paciente masculino, conocido a los 2 meses de edad en nuestra Institución por síndrome colestásico. Padre de 34 años a la concepción, originario de Puebla, fuera del núcleo familiar por lo que se desconocen antecedentes por rama paterna. Madre de 24 años a la concepción, alfabetizada, empleada doméstica, sin toxicomanías. G3P2C1. Medio hermano materno de 10 años aparentemente sano. Hermana de 7 años con retraso en el desarrollo psicomotor y soplo cardiaco (Caso 3, individuo IV.2 en la Fig.6.6.).

Producto de la tercera gesta, control prenatal regular, ingesta de multivitamínicos a partir del segundo mes. Embarazo aparentemente normoevolutivo. Obtenido a término por vía abdominal por desproporción cefalopélvica, peso 4kg (p.90), talla 56 cm (p.98). Se desconoce perímetro cefálico y Apgar. Presentó succión adecuada y retraso en el desarrollo psicomotor de predominio en el área del lenguaje.

A los dos meses acude a valoración al HIMFG por presentar síndrome colestásico, debido a una probable atresia de vías biliares, siendo atendido por el Departamento de Gastroenterología hasta los 20 meses de edad. Durante su atención se realizó colangiografía transoperatoria descartando atresia de vías biliares. Se realizó toma de biopsia hepática donde únicamente se determinó hepatitis neonatal en resolución. Se realizaron dos estudios de tamiz metabólico cualitativo en orina y un tamiz ampliado, ambos negativos. Se completó abordaje infeccioso como causa de la colestasis, únicamente encontrando IgM dudoso para Citomegalovirus, dejando de acudir a sus consultas. No fue referido a lo largo de su atención al departamento de genética.

A los 4 años 9 meses de edad inicia con crisis convulsivas tónico-clónicas generalizadas, con una frecuencia de 1-2 al mes, manejado de forma externa con fenitoína por 6 meses, posteriormente fue modificado a ácido valpróico, ha continuado convulsionando a pesar del tratamiento.

Acude nuevamente a los 6 años para realización de estudio citogenético familiar en donde se encuentra a la exploración paciente masculino con peso de 20kg (p.50) y talla 108.5cm (p.10) con retraso global del desarrollo, hirsutismo generalizado, normocefalia, fisuras palpebrales oblicuas hacia arriba, puente nasal ancho, narinas evertidas, boca en forma de carpa, prognatismo, paladar alto, tendencia a mantener la boca abierta, pabellones auriculares con fosetas preauriculares y concha prominente, cuello corto. Tórax con pectum excavatum, ruidos cardiacos rítmicos, sin fenómenos agregados. Abdomen

blando, no doloroso, peristalsis normoactiva, extremidades íntegras con clinodactilia del 5to dedo bilateral y braquidactilia en pies. (Fig. 6.7.A-D.)



Fig. 6.7.A. Fenotipo del individuo IV.3, donde se aprecia hirsutismo, fisuras palpebrales oblicuas hacia arriba, nariz base ancha, boca en cara, cuello corto. B. Vista lateral, donde se observa pectum excavatum. C. Clinodactilia. D. Braquidactilia en pies.

El resultado del análisis cromosómico con bandas GTG fue 46,XY,der(13)t(3;13)(q26;p12)mat. (Fig. 6.8.).

Se solicitó tamiz metabólico cuantitativo en orina y se obtuvieron los siguientes resultados: Glicosaminoglicanos en orina de 0.223mg/ml con un patrón específico de coindritin 4 y 6 sulfato (++) y Heparán sulfato (+).

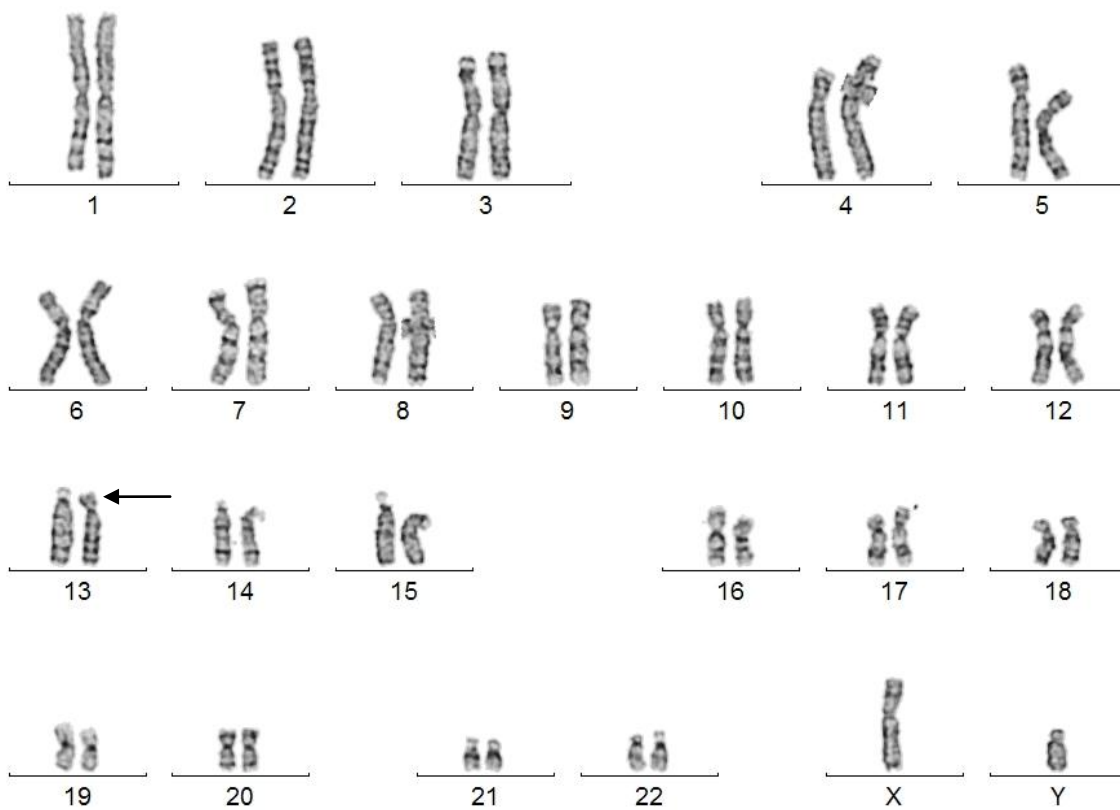


Fig. 6.8. Cariotipo con técnica de bandas GTG del individuo IV.3. La flecha señala el material adicional en los brazos cortos del cromosoma 13.

### 6.3.3. Descripción del Caso 3 (Individuo IV.2 de la Fig. 6.6.)

Paciente femenino de 7 años de edad conocida a partir del estudio familiar de t(3;13)(q26;p12) y quien presenta retraso en el desarrollo psicomotor y soplo cardiaco.

Producto de G2 materna, percepción de embarazo al mes, con adecuado control prenatal. Ingesta de multivitamínicos a partir de los 3 meses. 2 ultrasonidos reportados dentro de límites normales. Embarazo normoevolutivo, obtenida a término. No lloró ni respiró al nacer. Pesó 3,350gr (p.50). Se desconoce talla y Apgar, pero requirió maniobras de reanimación avanzadas.

Presenta retraso en el desarrollo psicomotor de predominio en el lenguaje. No acude a la escuela. Padeció varicela al año y medio de edad, sin complicaciones.

A la exploración física se encuentra con peso y talla en la p.50 para su edad. Normocefalia PC 52.5cm (p.25), hirsutismo generalizado, fisuras palpebrales oblicuas hacia arriba, pestañas largas, puente nasal ancho, narinas antevertidas, paladar alto, boca en carpa, fosetas preauriculares, pabellones auriculares grandes con concha prominente. Cuello corto, pectum excavatum. Soplo sistólico eyectivo II/IV. Abdomen blando depresible, no doloroso. Hernia umbilical reductible de 1 cm. Genitales femeninos acorde a edad y sexo. Extremidades íntegras con arcos de movilidad conservados. Clinodactilia del 5to dedo bilateral (Fig.6.9.A-C). Será valorada por Cardiología por soplo cardiaco.

El resultado del análisis cromosómico por cariotipo con bandas GTG fue 46,XX,der(13)t(3;13)(q26;p12)mat. (Fig. 6.10.)



Fig. 6.9.A. Fenotipo del individuo IV.2, donde se aprecia fisuras palpebrales oblicuas hacia arriba, nariz base ancha, boca en carpa, prognatismo, cuello corto, pectum excavatum .B. Vista del perfil, donde se observa pabellones auriculares grandes con fosetas preauriculares. C. Clinodactilia.

Se solicitó tamiz metabólico cuantitativo en orina obteniéndose: glicosaminoglicanos en orina de 0.158mg/ml con un patrón específico de coindritin 4 y 6 sulfato (++)

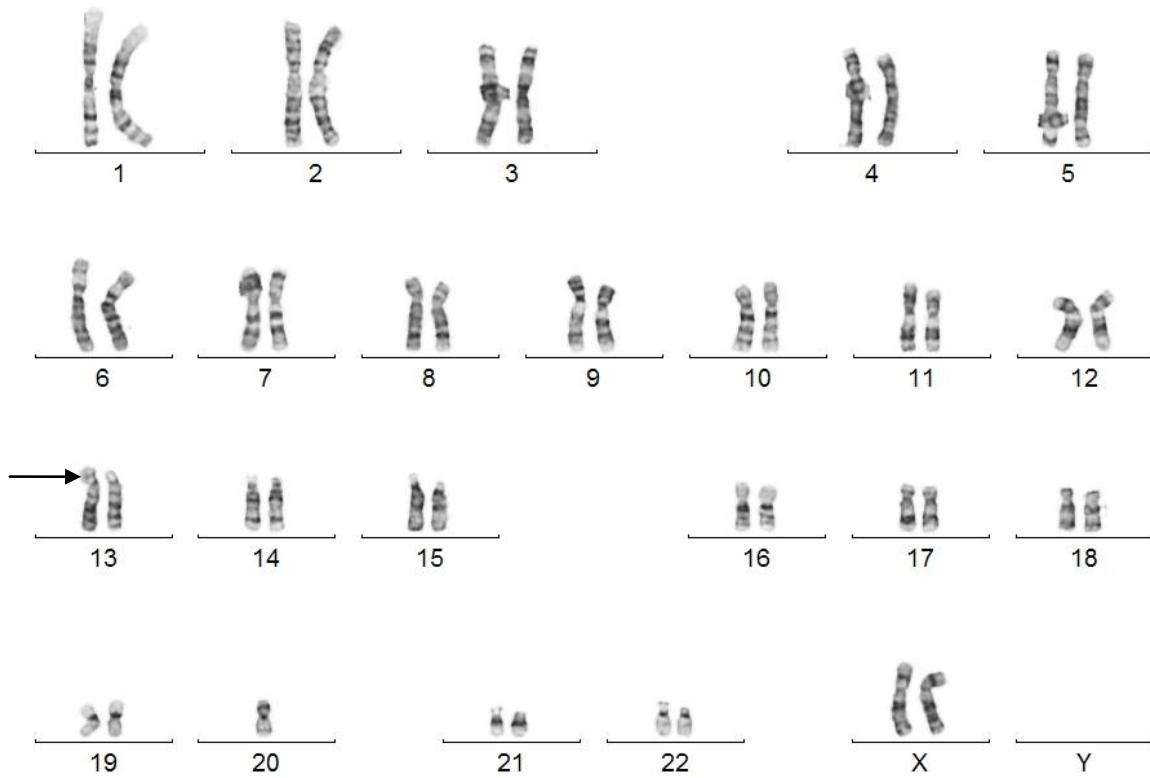


Fig. 6.10. Cariotipo con técnica de bandas GTG del individuo IV.2. La flecha señala el material adicional del cromosoma 3 en los brazos cortos del cromosoma 13.



#### 6.4. Análisis Bioquímico Familiar

Debido a la presencia de mucopolisacariduria en los pacientes (casos 1, 2 y 3) se realizó determinación cuantitativa de glicosaminoglicanos en orina al resto de los integrantes de la familia. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla.6.3. El rango de normalidad de los glicosaminoglicanos (GAGs) es de 0.130 +/- 0.035mg/ml. Como se muestra en la Tabla 6.3 los 10 individuos analizados fueron positivos para condroitin 4 y 6 sulfato.

Tabla.6.3. Determinación de Glicosaminoglicanos en orina en la familia de la propósi. GAG: glicosaminoglicanos, CPC: cloruro cetilpiridinio, Ch-4-S (condroitin 4 sulfato), Ch-6-S (condroitin 6 sulfato), HS (heparan sulfato) y DC (dermatan sulfato).

<b>NOMBRE</b>	<b>CPC</b>	<b>ALBUMINA ACIDA</b>	<b>GAGs</b>	<b>TIPO</b>
Individuo IV.6 (propósi, Caso 1)	huellas	huellas	0.215mg/ml	Ch-4-S(++),Ch-6-S(++),HS(+)
Individuo IV.3 (Caso 2)	huellas	huellas	0.223mg/ml	Ch-4-S(++),Ch-6-S(++),HS(+)
Individuo IV.2 (Caso 3)	huellas	huellas	0.158mg/ml	Ch-4-S(++),Ch-6-S(++)
Individuo II.2	positivo	positivo	1.212mg/ml	Ch-4-S(+++),Ch-6-S(+++),HS(+),DS(+)
Individuo III.2	positivo	positivo	0.620mg/ml	Ch-4-S(+++),Ch-6-S(+++),HS(+),DS(+)
Individuo III.3	positivo	positivo	0.325mg/ml	Ch-4-S(++),Ch-6-S(++),HS(+)
Individuo III.5	positivo	positivo	0.363mg/ml	Ch-4-S(+++),Ch-6-S(+++),HS(+)
Individuo IV.1	positivo	huellas	0.254mg/ml	Ch-4-S(++),Ch-6-S(++),HS(+)
Individuo IV.8	positivo	huellas	0.233mg/ml	Ch-4-S(++),Ch-6-S(++),HS(+)
Individuo IV.9	positivo	positivo	0.387mg/ml	Ch-4-S(+++),Ch-6-S(+++),HS(+),DS(+)

## 7. DISCUSIÓN

En esta tesis se describe el caso de una paciente con trisomía 3q26-qter producto de la segregación adyacente I de la translocación balanceada  $t(3;13)(q26;p12)mat$ , quien presentó además un perfil de mucopolisacáridos positivos en orina. En este caso nos encontramos con varios aspectos clínicos, fenotípicos, cromosómicos y bioquímicos que deben ser considerados tanto para el diagnóstico y el manejo de la propósa, como para los familiares afectados y el asesoramiento genético de la paciente y su familia.

La paciente fue conocida a los 13 meses de edad en nuestra Institución y contaba con un tamiz metabólico previo, el cual era positivo para glucosaminglicanos en orina. Sin embargo, el estudio era cualitativo y de esta manera no era posible saber que glucosaminoglicanos estaban presentes y de acuerdo con ello determinar el diagnóstico, en su caso, del tipo de MPS. Otra consideración fue que el análisis fenotípico así como la historia familiar de la paciente si bien recordaban a una MPS, no tenía todos los datos clínicos clásicos de estos síndromes y en ese momento sólo con la historia clínica y el árbol genealógico de la familia, no podía integrarse un diagnóstico ni un patrón de herencia.

Por las consideraciones anteriores se determinó iniciar el abordaje de la paciente con la confirmación de la presencia de mucopolisacariduria e identificación de los glicosaminoglicanos en orina, así como realizando un análisis cromosómico.

Posterior a la identificación de la alteración cromosómica estructural como derivada de una translocación recíproca aparentemente balanceada en la madre, se realizó el estudio familiar como parte del algoritmo diagnóstico de las cromosomopatías. A partir de éste se encontraron otros familiares afectados con el mismo desbalance cromosómico (casos 2 y 3), así como también seis portadores balanceados de la translocación cromosómica (Fig. 6.6.). En relación al tío de la paciente (individuo III.2, Fig. 6.6), no ha sido posible valorarlo directamente en el departamento de Genética y por ello hasta este momento no se descarta que el retraso mental que presenta (descrito por los familiares) sea causado por la misma aberración cromosómica o que por otra parte, se deba a alguna otra causa ya sea cromosómica, genética o ambiental.

A partir de la revisión de la literatura, sabemos que la trisomía completa del cromosoma 3 es incompatible con la vida. Se ha reportado que está presente en el 1% de los abortos espontáneos del primer trimestre<sup>69</sup>. Por otra parte, las trisomías parciales del cromosoma 3 son viables, teniendo una variación amplia en la expresión fenotípica dependiendo de la región implicada en el segmento trisómico y de su extensión, en aproximadamente 60%

de los casos es derivada de una translocación balanceada presente en alguno de los padres<sup>53</sup>, como en la familia que se describe.

Las características clínicas del síndrome por duplicación 3q (MIM 122470) incluyen: una facies característica con microcefalia, cara tosca, redondeada, hirsutismo, sinofris, puente nasal ancho, narinas antevertidas, comisuras labiales hacia abajo, pabellones auriculares de baja implantación, alteraciones cardiacas y genitourinarias, con retraso mental y del desarrollo<sup>54</sup>. (Fig. 7.1.A.)

Al comparar el fenotipo de la propósita con las fotografías clínicas publicadas de pacientes con duplicación 3q podemos observar (Fig. 7.1.B) que nuestra paciente presenta el fenotipo asociado a esta patología.

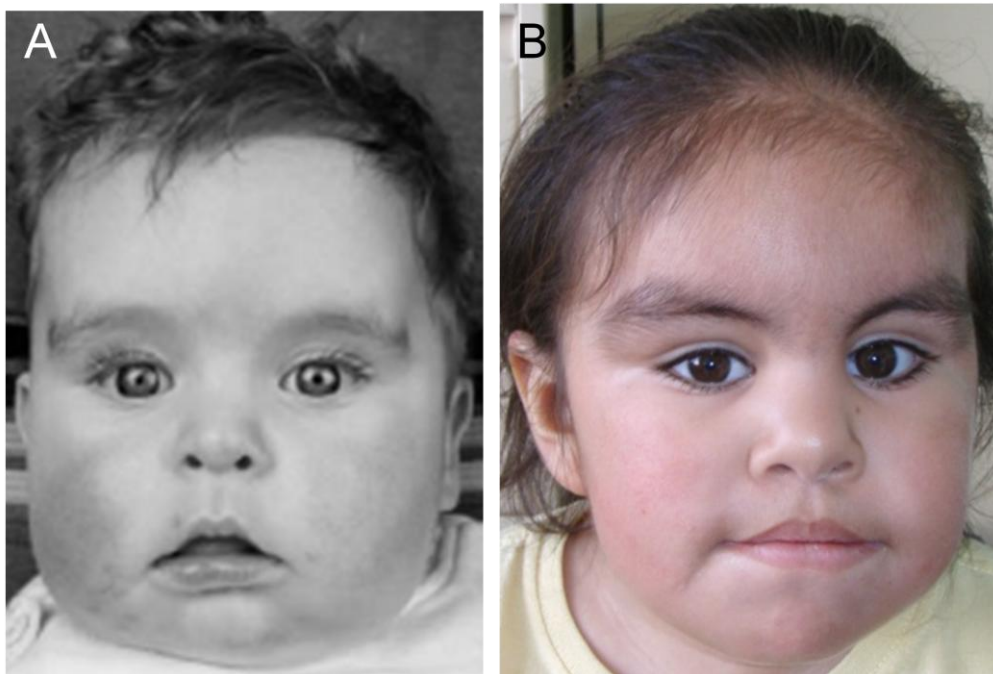


Fig. 7.1.A. Fenotipo de un paciente publicado por Faas BHW *et al*, 2002 con síndrome por duplicación 3q<sup>54</sup> y B. Fenotipo de la propósita, donde se puede apreciar la similitud de las dismorfias faciales.

Las características clínicas que presenta la propósita corresponden al diagnóstico de síndrome por duplicación 3q puro, a pesar de que sea derivada de una translocación familiar, lo que es debido a que la deleción del brazo corto de un cromosoma acrocéntrico ocasiona monosomía de 13p. Sin embargo, la pérdida de la región organizadora nucleolar

(NOR) del cromosoma 13 no afecta el fenotipo, pues su función es realizada por el resto de las NOR presentes en los demás cromosomas acrocéntricos.

En la tabla 7.1. se resumen las características clínicas descritas en los pacientes previamente publicados con síndrome por duplicación 3q puro, los cuales comparten la región crítica de 3q26.3-q27 y gran parte de las características clínicas. Así mismo se compara a los tres pacientes identificados en esta familia, a partir de la t(3;13)(q26;p12) con los descritos en la literatura.

En el presente caso familiar, el estudio cromosómico con bandas NOR fue realizado a la madre de la propósita, confirmándose la presencia de NOR activa en la región distal 3q, dado que el cromosoma 13 implicado en la translocación presenta material del cromosoma 3, como se demostró por FISH. El fenotipo de la madre es normal, como era de esperarse por ser portadora de una translocación recíproca aparentemente balanceada.

En los trabajos de Holder *et al*,<sup>65</sup> se delimitó la región crítica mínima que debe estar duplicada para que se presente el fenotipo de síndrome por duplicación 3q, la cual es 3q26.3-q27, contiene aproximadamente 60 genes. La región crítica se logró identificar a partir de lo publicado por Rizzu *et al*, en 1997<sup>55</sup> en donde estos autores describen un paciente con trisomía 3q25-q26.2 sin la presencia del fenotipo de síndrome de duplicación 3q, excluyendo dicha región de la región crítica del síndrome.

Tabla. 7.1. Resumen de las características clínicas de los pacientes con síndrome por duplicación 3q pura descritos previamente comparados con los tres pacientes identificados. NA: no aplica y ND: no descrita. Modificada de Fass et al. 2002<sup>54</sup>

	Wilson <sup>56</sup> (KR)	Wilson <sup>56</sup> (JB)	Stengel- Rutkowski <sup>57</sup>	Sciorra <sup>58</sup>	Rosenfeld <sup>59</sup>	Van Essen <sup>60</sup>	Faac <sup>54</sup>	Caso 1	Caso 2	Caso 3
Retraso Mental	+	+	NA	+	+	+	+	+	+	+
Retraso Crecimiento	+	+	+	+	+	ND	+	-	-	-
Implantación baja del cabello	+	+	+	+	ND	ND	+	+	+	+
Sinofris	+	+	ND	+	-	+	-	+	+	+
Pestañas largas	+	+	ND	+	ND	+	+	+	+	+
Pabellones dismorficos	-	-	+	ND	+	ND	+	+	-	+
Puente nasal ancho	ND	ND	+	+	+	ND	+	+	+	+
Narinas antevertidas	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Comisuras labiales hacia abajo	-	+	+	+	+	ND	+	+	+	+
Paladar Hendido	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
Micro/ Retrognatia	+	+	+	ND	+	+	+	-	-	-
Braquidactilia	+	+	ND	ND	ND	ND	+	+	+	+
Clinodactilia	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Hirsutismo	+	+	ND	-	ND	+	-	+	+	+
Cuello corto	+	+	+	ND	+	ND	+	+	+	+
Cardiopatía	ND	ND	+	+	+	+	+	-	-	+

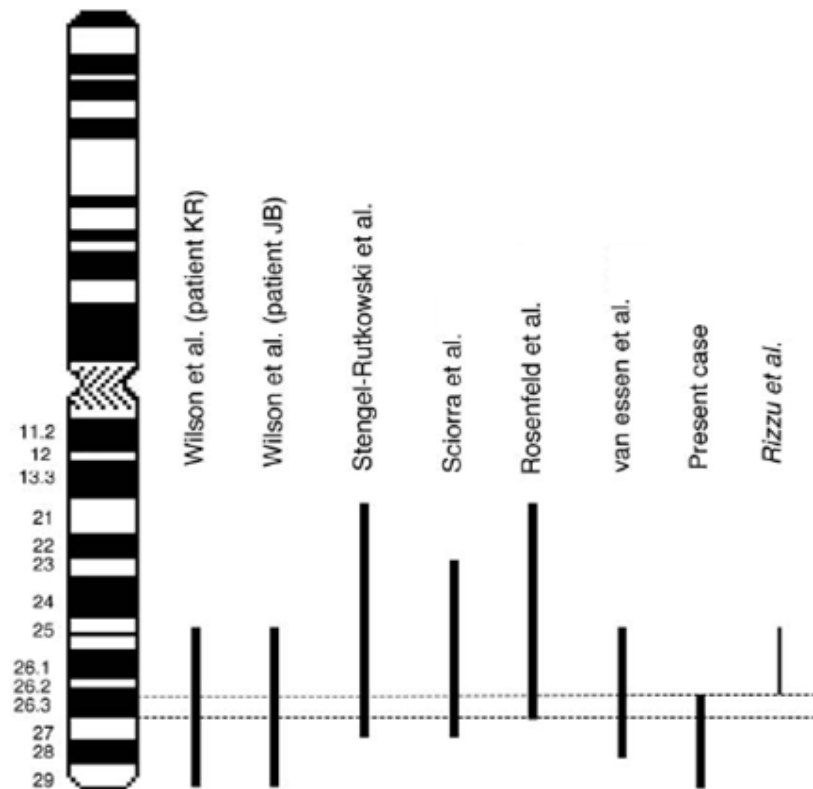


Fig. 7.2. Ideograma del cromosoma 3 donde se delimita la región crítica de acuerdo a los pacientes previamente publicados. Modificada de Faas BH, *et al.* 2002<sup>54</sup>.

En la Tabla. 7.2. se compara a la propósita y los casos 2 y 3 con las manifestaciones clínicas reportadas en el síndrome por duplicación 3q de acuerdo a su frecuencia. Los tres casos presentan la mayor parte de las características previamente descritas.

Tabla.7.2. Se indica el porcentaje de la frecuencia de la característica así como las características clínicas presentes en la propósita y sus familiares afectados. Modificada de Pires A *et al.* 2005<sup>69</sup>.

<b>Característica descrita en la literatura en el Síndrome duplicación 3q</b>	<b>% Frecuencia</b>	<b>Caso 1 Propósita IV.6</b>	<b>Caso 2 Individuo IV.3</b>	<b>Caso 3 Individuo IV.2</b>
Puente nasal ancho	100	+	+	+
Paladar alto	100	+	+	+
Dismorfia pabellones auriculares	94	+	-	+
Cuello corto	93	+	+	+
Narinas antevertidas	91	+	+	+
Clinodactilia	90	-	+	+
Anormalidades en tórax	89	-	+	+
Prognatismo maxilar	86	+	+	+
Hipertriosis	86	+	+	+
Labio superior largo	85	+	+	+
Comisuras labiales hacia abajo	82	+	+	+
Paladar hendido	79	-	-	-
Defectos cardíacos	75	-	-	+
Anormalidades genitourinarias	61	-	-	-
Sexo Femenino	58	+	-	+
Fisuras palpebrales hacia arriba	56	+	+	+
Onfalocele	23	-	-	-

Llama la atención en la tabla anterior que aunque no existe duda diagnóstica, los pacientes presentan variabilidad de expresión del fenotipo. Por ejemplo, se ha descrito que el 79% de los pacientes con síndrome por duplicación 3q tienen paladar hendido, el 61% presenta anomalías urinarias y el 23% onfalocele, ninguno de estos datos fue encontrado en los tres pacientes descritos en esta tesis.

Los defectos cardíacos son descritos en el 75% de los casos, sólo uno de nuestros pacientes presentaba esta alteración. El 94% presenta alteraciones de pabellones auriculares, uno de nuestros pacientes no tuvo esta característica. La clinodactilia y las

anormalidades en el tórax se encuentran en el 90 y 89% de los casos respectivamente y por lo menos uno de nuestros pacientes no tuvo este dato.

Se registra un ligero predominio del género femenino (58%) en los casos reportados, situación que correlaciona con los tres pacientes descritos (dos femeninos y un masculino), incluso en el supuesto de que el tío de los pacientes (Fig. 6.6 individuo III.2) tuviese este diagnóstico, se mantiene cercano al 50%. Lo anterior es un dato interesante ya que al parecer esta alteración cromosómica no afecta de manera letal a un género en específico.

La variabilidad fenotípica de los pacientes podría estar en relación a la acción sinérgica de diversos alelos en el genoma que funcionan como genes modificadores, los cuales pueden modular la expresión cualitativa y cuantitativa de las variantes genéticas, además de los factores ambientales<sup>61</sup>.

Con el poder de definición del cariotipo con bandas GTG y FISH pudo establecerse que en los tres pacientes así como en las portadoras, los puntos de ruptura son aparentemente los mismos. Sin embargo ahora se sabe que alteraciones citogenéticas idénticas detectadas por cariotipo convencional presentan microdeleciones o microduplicaciones cuando se estudian a través de la técnica de CGH-microarreglos<sup>62</sup>.

Por lo tanto sería de utilidad realizar CGH-microarreglos para definir mejor los puntos de ruptura. Este análisis podría especificar la región cromosómica y por lo tanto los genes que podrían estar implicados, además determinaría si la extensión de las regiones se conserva en todos los portadores y en los pacientes desbalanceados, y en su caso si estas variaciones moleculares podrían explicar la variabilidad fenotípica<sup>63</sup>. Lo anterior debe ser considerado sin perder de vista que muchas de las características clínicas probablemente estarán influidas por otros genes en otras regiones cromosómicas o el ambiente, que pueden actuar como modificadores del fenotipo<sup>64</sup>.

El diagnóstico y manejo de la propósa y su familia fue complejo, debido a la baja frecuencia del síndrome, a su variabilidad fenotípica y a que el rearrreglo cromosómico es único. Esta situación se ejemplifica desde las descripciones iniciales del síndrome de duplicación 3q, en que fue considerado como síndrome de Cornelia de Lange asociado a anomalía cromosómica. Lo anterior debido a ciertas características fenotípicas que se superponen entre ambos síndromes<sup>65</sup>, como son el retraso mental, microcefalia y dismorfias faciales. Inclusive se habían propuesto ciertos criterios para distinguir entre dichos síndromes como retraso en el crecimiento intrauterino, filtrum prominente y alteraciones en extremidades en el síndrome de Cornelia de Lange<sup>66, 67</sup>.



Por otra parte se sugirió considerar el síndrome por duplicación 3q cuando se presentara craneosinostosis, paladar hendido y anomalías genitourinarias<sup>65</sup>. Sin embargo gracias a estudios de ligamiento en casos familiares de síndrome de Cornelia de Lange (MIM 122470) se ha establecido que son dos entidades diferentes<sup>68</sup>. El fenotipo de nuestros pacientes no recordaba al Síndrome de Cornelia de Lange pero sí presentó dificultades diagnósticas tanto por el fenotipo como por el antecedente de glicosaminoglicanos positivos en orina.

Hasta donde sabemos, el único caso reportado en la literatura de trisomía parcial 3q derivado una translocación balanceada que involucraba a los cromosomas 3 y 13, se diagnosticó de forma prenatal. Este paciente presentaba datos ultrasonográficos sugestivos de una cromosopatía como son agenesia del vermis del cerebelo, micrognatia, higroma quístico, labio hendido, defecto ventricular septal y acortamiento de extremidades. Se realizó amniocentesis obteniéndose como resultado 46,XY,der(13)t(3;13)(q12;p11.1)mat, realizándose aborto terapéutico<sup>69</sup>. El caso anteriormente descrito involucraba una ruptura cromosómica más proximal y no presentaba los datos clínicos del síndrome de duplicación 3q, ya que el punto de ruptura no involucraba la región crítica.

Las cardiopatías congénitas se encuentran presentes en el 84-75% de los casos, estas características no estaban presentes en nuestra cohorte. Una de nuestras pacientes (individuo IV.2, Fig. 6.6.) presentó cardiopatía, la cual se encuentra en estudio, si bien clínicamente parecería no impactar de manera grave en las actividades normales de la paciente, ya que tiene 7 años y nunca ha presentado descompensación hemodinámica o requerido tratamiento médico por esta razón.

De acuerdo a lo reportado en la literatura, la sobrevida de estos pacientes está relacionada con la gravedad de las malformaciones. Podemos inferir que la sobrevida se encuentra en relación particularmente a las alteraciones cardíacas y al retraso en el desarrollo psicomotor que se detecta tempranamente en aquellos pacientes que sobreviven más del año de edad.

Es importante mencionar que a través del estudio familiar se encontraron 3 productos desbalanceados los cuales eran dos femeninos y un masculino y de diferentes edades. Lo que nos indica que esta alteración cromosómica presenta sobrevida (los pacientes se encuentran en etapa escolar) lo que coincide con lo reportado por Wilson *et al* quien describe un paciente de 8 años<sup>56</sup>.

Se ha propuesto por Faas *et al*<sup>54</sup> que deben existir genes implicados en el desarrollo de las dismorfias y malformaciones típicas del síndrome de duplicación 3q dentro de la región crítica, inclusive considerando un síndrome de genes contiguos. Dentro de los genes postulados<sup>66, 70</sup> que podrían explicar las manifestaciones clínicas encontramos al gen *NLGN1*, que codifica para Neuroglina 1, implicada en la sinaptogénesis del sistema nervioso central y su alteración sería un candidato para explicar el retraso mental de los pacientes con síndrome de duplicación 3q.

En el estudio de esta familia se identificaron 6 portadores de la translocación balanceada (individuos II.2, III.3, III.4, III.5, IV.4 y IV.9, Fig. 6.6.) y tres de forma desbalanceada (IV.6, IV.2 y IV.3, Fig. 6.6.), un individuo más presenta discapacidad intelectual probablemente secundaria a esta anormalidad cromosómica (III.2, Fig. 6.6.).

Lo anterior es importante para brindar asesoramiento genético a la familia, ya que los portadores de una translocación balanceada presentan riesgo de tener hijos con malformaciones físicas y retraso mental debido a aneusomías segmentales, originando trisomías y monosomías parciales, pues en meiosis los cromosomas involucrados forman un cuadrivalente para poder aparear sus regiones homólogas, posteriormente cada cromosoma homólogo se distribuye hacia cada polo celular, generando una segregación 2:2.

Dentro de las posibilidades de segregación que se encuentran en esta familia tenemos (Fig. 7.3.):

- a) La segregación alterna obteniendo productos sin la translocación o portadores balanceados de ella.
- b) La segregación adyacente 1 dando gametos que generaran productos con trisomía parcial 3q26-qter con las características clínicas previamente descritas o la monosomía parcial 3q26 que presenta retraso en el desarrollo psicomotor y del crecimiento, hipotonía, telecanto, anomalías en los pabellones auriculares y falla cardíaca<sup>71</sup>.
- c) La segregación adyacente 2 genera productos con trisomías y monosomías parciales muy extensas por lo que serían incompatibles con la vida.

d) Tanto la segregación 3:1 como la 4:0, generarían desbalances muy extensos por lo que serían abortos tempranos.

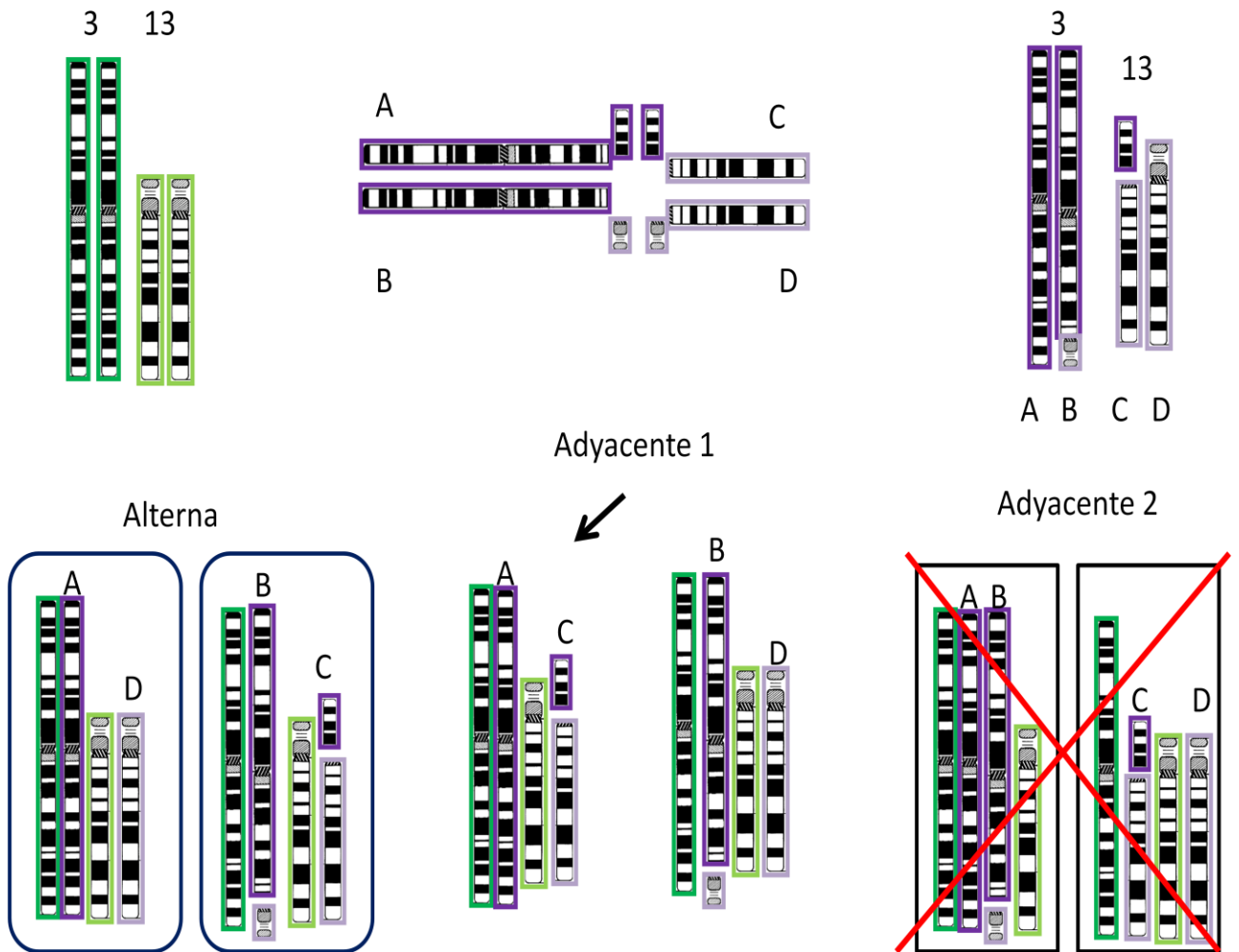


Fig. 7.3. Ideogramas de la segregación de la  $t(3;13)(q26;p12)$ . La flecha muestra la segregación adyacente 1. Los cromosomas verdes son de origen paterno y los morados son de origen materno, identificados con las letras A, B, C y D. Al segregar el cromosoma materno A con el D se obtiene un producto sin alteraciones, al segregar B con C son portadores balanceados, al segregar A con C se obtiene una trisomía 3q26, al hacerlo B con D es monosomía 3q26. La segregación adyacente 2 es incompatible con la vida.

Por lo descrito, el riesgo de recurrencia teórico para esta familia incluye 10 posibilidades, (dos posibilidades en la segregación alterna, adyacente 1 y adyacente 2, 3:1 y 4:0 respectivamente). Sin embargo, como los productos resultantes de la segregación adyacente 2, 3:1 y 4:0 serían abortos tempranos, se excluyen. Por lo tanto habría que considerar que tendríamos un riesgo de  $\frac{1}{4}$  (25%) para cada posibilidad restante.

El riesgo empírico de recurrencia para los hijos de los portadores de una translocación t(3;13) está calculado en 16.31%<sup>72</sup>, y probablemente el que sea menor al riesgo teórico se deba a un efecto de dosis génica o por la disrupción génica durante la embriogénesis generando abortos. Al analizar las alteraciones cromosómicas de nuestros pacientes se define que los casos 1, 2 y 3 son producto de una segregación adyacente 1.

Un dato que llamó la atención y que en esta familia es de particular relevancia es que además del desbalance cromosómico presentan excreción de glicosaminoglicanos en orina, dato descubierto durante el abordaje inicial de la propósito por el fenotipo semejante al observado en los pacientes con MPS, si bien como ya se ha explicado no reunía todos los datos clínicos para hacer este diagnóstico.

El patrón específico de excreción de glicosaminoglicanos en orina en la paciente fue determinado como sulfato de dermatan (+), sulfato de heparan (+), sulfatos de condroitin 4 y 6 (+++), siendo compatible desde el punto de vista del perfil bioquímico en orina con un síndrome de Sly o MPS VII (MIM 253220).

La MPS VII o Síndrome de Sly fue descrita por primera vez en 1973 por Sly *et al*<sup>73</sup>, es una enfermedad autosómica recesiva caracterizada por la deficiencia de  $\beta$ -glucuronidasa, la que conlleva a la acumulación de sulfato de dermatán, condroitín, y heparán en los lisosomas de varios tejidos ocasionando disfunción celular<sup>74</sup>.

El gen de  $\beta$ -glucuronidasa, *GUSB*, se encuentra en 7q21.2–22, abarca 20kb, tiene 12 exones y 11 intrones, y codifica para una proteína de 651 aminoácidos, después de ciertas modificaciones postraduccionales es transportado a los lisosomas donde es transformado a su forma activa. Se han descrito 49 mutaciones de las cuales 78% corresponden a mutaciones de sentido equivocado, 12.6% son sin sentido, 5.8% son deleciones y 2.9% generan cambios en el corte y empalme<sup>74</sup>. Además se ha encontrado un alelo de pseudodeficiencia c.454G≤A p.D152N en el exón 3 y un polimorfismo c.1946C≤T p.P649L en el exón 12 con una actividad in vitro del 88.3%.

Se sabe que el dinucleótido CpG es un sitio donde frecuentemente ocurren mutaciones (o *hot spot*). Más del 50% de las mutaciones puntuales descritas en el gen *GUSB* no se

encuentran relacionadas a este dinucleótido, por lo que en términos generales las mutaciones no relacionadas con CpG serán únicas en cada familia o provendrán del mismo origen (tienen efecto fundador)<sup>75</sup>.

Interesantemente, se reportó por Islam *et al*, en 1996<sup>76</sup>, un caso de MPS VII clásica en un paciente con ascendencia mexicana, donde los padres (no consanguíneos) eran portadores de un alelo doblemente mutado para P408S y P415L. En un estudio posterior se descartó que alguno de estos alelos fuera un polimorfismo en la población mexicana<sup>77</sup>.

Las características clínicas de la MPS tipo VII, incluyen retraso mental severo, cara tosca, hepatoesplenomegalia, opacidad corneal, valvulopatía cardíaca, macrocefalia, hernias, contracturas en flexión, disostosis múltiple y puede presentarse de forma neonatal<sup>78</sup>, datos que a excepción de la facies no se encuentran en nuestra propósitosa.

El cuadro clínico clásico que presentan los pacientes con MPS VII está asociado a una actividad enzimática de 0-2%. Sin embargo, existe una gran variabilidad fenotípica que incluye desde hidrops fetalis hasta una xifoesciosis leve con inteligencia normal<sup>47</sup>. En un estudio publicado por Chamoles *et al*, en 2001<sup>79</sup> se determinaron los niveles de actividad enzimática de  $\beta$ -glucoronidasa en 35 recién nacidos sanos y en 50 adultos sanos (Tabla.7.2.):

Tabla. 7.2. Niveles enzimáticos normales de  $\beta$  glucoronidasa en recién nacidos y adultos sanos. Modificada de Chamoles *et al*, 2001.<sup>79</sup>

Enzima	$\beta$ glucoronidasa
Recién Nacido	131-426 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{h}$
Adultos	50-205 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{h}$

Llama la atención que en los recién nacidos la actividad enzimática es mayor que en los adultos, sin embargo al no haber reportes en infantes la interpretación del resultado es compleja. Los niveles de actividad podrían estar explicados por factores como respuesta inflamatoria, el sexo de los controles ya que se ha identificado que es mayor la actividad enzimática de los hombres vs las mujeres y que existe una correlación con la edad vs el índice de masa corporal<sup>80</sup>.

El tamiz metabólico cuantitativo fue realizado a nuestra propósa en dos ocasiones, con dos muestras de orina diferentes obteniéndose el mismo patrón de excreción, por lo que se decidió solicitar el estudio enzimático de  $\beta$ -glucuronidasa. El laboratorio de Diagnóstico e Investigación de enfermedades lisosomales en Argentina (DIEL) analizó la actividad enzimática para iduronato 2 sulfatasa y arilsulfatasa B y el Instituto de Hematopatología determinó la actividad de  $\beta$ -glucuronidasa.

Los valores de  $\beta$ -glucuronidasa obtenidos de forma inicial en nuestra propósa fueron de 14  $\mu\text{mol}/\text{disco}\cdot\text{h}$ , los cuales se encuentran por debajo del rango promedio del especificado por el laboratorio de envío y por debajo de lo previamente descrito por Chamoles *et al* en 2001<sup>79</sup> para recién nacidos y adultos, pero con las determinaciones posteriores se pudo confirmar que sí existe actividad enzimática en la paciente. (Tabla. 6.2.)

El laboratorio de análisis enzimático regularmente reporta sus resultados en unidades  $\text{pmol}/\text{disco}\cdot\text{hr}$ , a petición expresa para poder ser comparados los valores enzimáticos reportados en la propósa con lo publicado en la literatura por Chamoles *et al*<sup>79</sup>, se solicitó al laboratorio de análisis su conversión, siendo realizado por la Biol. Edith Aguilera (Instituto de Hematopatología, México). Considerando esta información en las dos muestras fidedignas, ambos valores (14 y 49  $\mu\text{mol}/\text{L}\cdot\text{hr}$ , respectivamente, Tabla. 6.2.) están por debajo de los rangos normales de acuerdo a lo publicado. Sin embargo, ambos valores se encuentran dentro de los parámetros normales del laboratorio de reporte cuando se consideran en unidades de  $\text{pmol}/\text{disco}\cdot\text{hr}$ , si bien por lo menos en la primera determinación estarían en el límite bajo.

Como se expuso con anterioridad, no existe duda diagnóstica acerca de que la paciente presenta un síndrome por duplicación 3q, sin embargo al presentar también mucopolisacariduria y actividad enzimática limítrofe para  $\beta$  glucuronidasa y todos los individuos estudiados en esta familia presentaron mucopolisacariduria con patrón similar, tanto los pacientes con trisomía, los portadores como los individuos con cariotipo normal (los dos últimos casos con fenotipo aparentemente normal).

Se plantearon las siguientes preguntas. La primera es ¿existe algún gen en la región cromosómica de 3q que se relacione con la presentación de glucosaminglicanos en orina?, y la segunda es si la paciente (y sus familiares con trisomía) presentan dos síndromes, uno cromosómico y otro metabólico. La respuesta a la primera consideración es negativa por las siguientes razones:

Para poder formular alguna hipótesis sobre genes implicados debemos considerar que deben ser sensibles a dosis génica, ya que la alteración citogenética es una trisomía parcial, y que su sobreexpresión ocasione estas alteraciones metabólicas. En ninguno de los casos reportados con el Síndrome por duplicación 3q se especifica si fue realizado una determinación de glicosaminoglicanos en orina.

Por lo anterior se realizó una búsqueda en el OMIM Gene Map para identificar los genes presentes en 3q26-qter, que pudieran estar involucrados en una alteración lisosomal. Se encontraron 118 genes en la región duplicada, de los cuales existen dos involucrados en el tránsito de vesículas: el gen del factor 5 similar a la biogénesis peroxisomal *PEX5L* (MIM 611058) y el de la glicoproteína de membrana asociada a los lisosomas específica de células dendríticas *DCLAMP* (MIM 605883), éste último presente en la región crítica 3q26.3-q27 descrita para el síndrome por duplicación 3q.

El gen *PEX5L* se expresa en cerebro y se une a la proteína PTS1 (peroxisome-targeting signal 1), involucrada en el funcionamiento peroxisomal<sup>81</sup>. Los peroxisomas son componentes ubicuos de las células eucariotas con funciones metabólicas que incluyen la generación de peróxido de hidrógeno, la oxidación  $\beta$  de ácidos grasos de cadena larga y la biosíntesis de fosfolípidos, ácidos biliares e isopreno<sup>82</sup>. Existen diversas enfermedades que son ocasionadas por mutaciones en genes que codifican para las enzimas peroxisomales, pudiéndose agrupar en el espectro del síndrome de Zellweger (MIM 214100) y la rizomelia con condrodisplasia punctata (MIM 215100)<sup>83</sup>. Dentro de las características clínicas de estos síndromes se encuentra retraso mental profundo, hipotonía, crisis convulsivas, alteraciones esqueléticas u oftalmológicas. A excepción de las crisis convulsivas ninguno de nuestros pacientes con síndrome por duplicación 3q presenta estos datos clínicos, inclusive el retraso mental en ellos es leve, aún así no podemos descartar que este gen se encuentre implicado en la mucopolisacariduria presente en esta familia.

Por otro lado encontramos a *DC-LAMP*, gen que codifica para una glicoproteína asociada a la membrana lisosomal en las células dendríticas, la cual es homóloga a las glicoproteínas lisosomales expresadas en macrófagos y plaquetas que pueden estar involucradas en la endocitosis y el tráfico lisosomal, particularmente relacionado en el procesamiento de antígenos exógenos. Si bien no se han identificado enfermedades monogénicas asociadas a las LAMP<sup>84</sup>, pudiera tener una sobreexpresión al presentarse un exceso de dosis génica de esta región.

Ninguno de los genes anteriores nos explica de forma completa el fenotipo bioquímico de la paciente o su posible alteración enzimática, dado que ninguna de las MPS reportadas o conocidas tiene su locus en 3q26-qter.

En relación a la segunda pregunta, se plantea que esta consideración diagnóstica es la que aplica a la paciente y su familia, ya ha coincidido la alteración cromosómica con una alteración metabólica de tipo a definir. El patrón de glucosaminoglicanos en orina (y posteriormente el análisis enzimático) nos orienta hacia una deficiencia de  $\beta$ -glucuronidasa o MPSVII.

Una posible explicación para la presencia de MPS en orina y la actividad baja de  $\beta$ -glucuronidasa, es que la paciente sea portadora de un alelo de pseudodeficiencia. En el reporte de Vervoort R *et al*, 1995<sup>86</sup>, describen una serie de casos con MPS tipo VII, a la que llaman atípica por la ausencia del cuadro clínico característico. Refieren el caso de un niño Italiano de 8.5 años que presentaba vacuolas citoplasmáticas en el frotis de sangre periférica, la prueba de azul de toluidina negativa, excreción aumentada de glicosaminoglicanos urinarios y disminución de la actividad enzimática para  $\beta$ -glucuronidasa, cuya única manifestación clínica es una xifosis torácica. Se identificó que este paciente era homocigoto para D152N<sup>85</sup>, alelo descrito como pseudodeficiente.

El fenotipo bioquímico descrito en el caso de Vervoort R *et al*, 1995<sup>86</sup> es similar al de nuestra propósita. Por lo que podríamos sospechar que la paciente es pseudodeficiente para la  $\beta$ -glucuronidasa.

En las enfermedades por almacenamiento los alelos conocidos como pseudodeficientes se presentan en los individuos sanos como una disminución *in vitro* de la actividad enzimática en rangos considerados como deficientes, pero sin evidencia de falta de degradación de los sustratos *in vivo*<sup>86</sup>, molecularmente son heterocigotos para la deficiencia enzimática con presentación clínica mínima y esto pudiera orientar a la presencia de un umbral para el adecuado funcionamiento enzimático.

Otro hallazgo que pudiera orientar a la presencia del alelo D152N en la propósita es que al repetirse el estudio enzimático debido a la determinación de actividad por debajo de los límites de referencia, se encontró nuevamente en límites bajos (Tabla. 6.2.) con aparente degradación enzimática, y es interesante que la mutación en el alelo D152N genera una degradación enzimática acelerada<sup>86</sup>.



Además, existen varios reportes de que la presencia de las vacuolas citoplasmáticas observadas en los frotis de sangre periférica de los pacientes con MPS VII (Fig. 7.4.) también han sido observadas en los heterocigotos, lo que indica que un alelo normal puede no ser suficiente para prevenir el almacenamiento de MPS en algunas células y que su presencia no necesariamente se asocia a la presencia de enfermedad o MPS VII. Inclusive, Gitzelmann *et al*, en 1978 sugirieron que la deficiencia de  $\beta$ -glucuronidasa, puede estar presente en la población general y no detectarse clínicamente<sup>87</sup>.

La actividad enzimática reportada en portadores obligados es inclusive mayor a la que presenta la propósa, sin embargo del mismo modo no se conocen los rangos en niños heterocigotos o pseudodeficientes, pero sí podemos concluir que ella no presenta ni por clínica, ni por determinaciones bioquímicas enzimáticas MPS VII, ya que los pacientes afectados tienen una actividad enzimática cercana a cero o nula<sup>79</sup>. (Tabla. 7.3.)

Tabla. 7.3. Niveles de  $\beta$ -glucuronidasa de un portador obligado y de dos homocigotos. Modificada de Chamoles *et al*,2001<sup>79</sup>.

<b><math>\beta</math>-glucuronidasa</b>	<b>Actividad enzimática</b>
Heterocigoto (Portador obligado)	81 mmol/L*h
Homocigoto	0 mmol/L*h

Por todo lo anteriormente discutido se solicitaron bajo consentimiento informado, glicosaminoglicanos urinarios en los integrantes de la familia, de los cuales se pudo realizar en 10 individuos. Encontrándose excreción de glicosaminoglicanos en orina en todos los individuos estudiados. Tabla. 7.4.

Tabla. 7.4. Comparación del cariotipo y la excreción de glicosaminoglicanos urinarios.

<b>Individuo</b>	<b>Cariotipo</b>	<b>Tipo Glicosaminoglicanos</b>
Individuo IV.6 (propósito) 3ª5m	46,XX,der(13)t(3;13)(q26;p12)mat	Ch-4-S(++),Ch-6-S(++),HS(+)
Individuo IV.3 (Caso 2) 6a	46,XY,der(13)t(3;13)(q26;p12)mat	Ch-4-S(++),Ch-6-S(++),HS(+)
Individuo IV.2 (Caso 3) 7a	46,XX,der(13)t(3;13)(q26;p12)mat	Ch-4-S(++),Ch-6-S(++)
Individuo II.2	46,XX,t(3;13)(q26;p12)	Ch-4-S(+++),Ch-6-S(+++),HS(+), DS(+)
Individuo III.2		Ch-4-S(+++),Ch-6-S(+++),HS(+), DS(+)
Individuo III.3	46,XX,t(3;13)(q26;p12)	Ch-4-S(++),Ch-6-S(++),HS(+)
Individuo III.5	46,XX,t(3;13)(q26;p12)	Ch-4-S(+++),Ch-6-S(+++),HS(+)
Individuo IV.1	46,XY	Ch-4-S(++),Ch-6-S(++),HS(+)
Individuo IV.8	46,XY	Ch-4-S(++),Ch-6-S(++),HS(+)
Individuo IV.9	46,XY,t(3;13)(q26;p12)	Ch-4-S(+++),Ch-6-S(+++),HS(+), DS(+)

Este hallazgo es un dato muy importante porque una vez que se analiza el árbol genealógico se determinan dos situaciones: la primera es que todos los individuos en que se realizó el estudio de glicosaminoglicanos en orina fueron positivos y la segunda, que esta determinación era independiente de las alteraciones citogenéticas del individuos en cuestión (trisómico, portador balanceado o con cariotipo normal).

Si bien existe variabilidad en los glicosaminoglicanos excretados en orina, el patrón en esta familia corresponde a MPS VII. Por lo que podrían ser portadores heterocigotos de una mutación o portadores de un alelo de pseudodeficiencia.

La hipótesis anterior también es apoyada por el hecho de que la excreción de glicosaminoglicanos no se encuentra en relación al estado de portador de translocación o trisomía parcial 3q26. Aún más, los individuos IV.1 y IV.8 presentan mucopolisacariduria generalizada con cariotipo normal, en este sentido su perfil de excreción es similar al individuo III.2 quien al parecer tiene el fenotipo correspondiente al síndrome por duplicación 3q.

Lo anterior nos orienta a que la mucopolisacariduria es un dato no asociado al desbalance cromosómico, pudiendo tratarse de heterocigotos o pseudodeficientes para alguna deficiencia enzimática o a la presencia de genes modificadores que pudieran explicar la presencia de la alteración metabólica en este caso familiar. Además, en principio son todos asintomáticos, ya que los portadores de la translocación no presentan ningún fenotipo morfológico asociado ni a la translocación ni a la alteración bioquímica. No se encontró en la literatura datos en relación a la asociación de una MPS con alteración cromosómica, ya sea numérica o estructural.

Solamente en la propósa fue realizada la determinación de actividad enzimática y para determinar si efectivamente existe un alelo mutado que condicione la pseudodeficiencia mencionada, una consideración a futuro es realizar estudio tipo secuenciación del gen *GUSB* para confirmar o descartar variantes en la secuencia del mismo.

## 8. CONCLUSIÓN

En esta tesis se describe por clínica, citogenética, citogenética molecular y bioquímica a una paciente con síndrome por duplicación 3q derivado de una translocación recíproca t(3;13)mat y mucopolisacariduria.

El estudio cromosómico con bandas GTG, NOR y FISH con sonda WCP del cromosoma 3 definieron que se trata de una familia con translocación t(3;13)(q26;p12) y posiblemente sean portadores de un cambio en las secuencia del gen de  $\beta$ -glucuronidasa o estén segregando un alelo pseudodeficiente.

Este caso es relevante porque hay pocos casos de síndrome de duplicación 3q reportados en la literatura, ayudando a definir el fenotipo del síndrome, el cual tiene una sobrevida hasta el momento de la etapa escolar. Este estudio aporta además la presencia de glicosaminoglicanos en orina, probablemente no relacionados con la anomalía cromosómica pero que hacen complejo el diagnóstico y el asesoramiento genético.

El reto diagnóstico presente en esta familia se puede ejemplificar con los individuos IV.2 y IV.3, que de manera inicial no se consideró un diagnóstico genético de tipo cromosómico y no fueron referidos al departamento de genética, inclusive cuando el individuo IV.3 había sido valorado en nuestra institución.

Este caso pone en evidencia los diferentes aspectos de la Genética Médica, como la importancia de realizar el abordaje integral de los pacientes basados en la historia clínica, el árbol genealógico y las características fenotípicas, a partir de donde se llega a los diagnósticos posibles, los cuales se confirman o descartan con los estudios de laboratorio.

Esto también se refleja en el consejo genético que podría ofrecerse a esta familia, es decir si consideramos únicamente la alteración cromosómica el riesgo de un producto desbalanceado para los portadores de la translocación de acuerdo con la literatura es del 16.33%, además de explicar los otros posible productos que pueden ocurrir en la segregación. En relación a la posible alteración metabólica que condiciona la presencia de glucosaminoglicanos urinarios aparentemente no tiene impacto en el fenotipo. Se continúa con el manejo integral de los pacientes con el síndrome por duplicación 3q.

Para concluir el estudio de esta familia queda abierta la posibilidad en un futuro de realizar análisis de CGH-microarreglos (para definir de manera precisa los puntos de ruptura cromosómica y hacer correlación fenotipo genotipo), así como también la realización de la secuenciación de *GUSB* para búsqueda de las variaciones en la secuencia para estudiar las hipótesis bioquímicas expuestas.

## 9. REFERENCIAS

1. Kass DH, Batzer MA. Genome Organization: Human. En: *Encyclopedia of Life Science*. John Wiley & sons, Ltd. 2004. doi: 10.1038/npg.els.0003855.
2. Lewin B. En: *Genes IX*. Jones and Bartlett Publishers, Inc. 2008. 867.
3. Lam WWK, Mueller RF. Human Genetics: Principles. En: *Encyclopedia of Life Science*. John Wiley & sons, Ltd. 2002. doi: 10.1038/npg.els.0001873.
4. Rando OJ. Chromatin structure in the genomics era. *Trends Genet*. 2007. 23, 2:67-73.
5. Eissenberg JC, Elgin SCR. Heterochromatin and Euchromatin. En: *Encyclopedia of Life Science*. Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group. 2005. doi: 10.1038/npg.els.0003844.
6. Strachan T, Read A. En: *Genética Humana*. 3ªed. México; Mc.Graw Hill-Interamericana; 2006.
7. Bernstein E, Hake SB. The nucleosome: a little variation goes a long way. *Biochem. Cell Biol*. 2006. 84: 505–517.
8. Jin J, Cai Y, Li B, Conaway RC, Workman JL, Conaway JW, Kusch T. In and out: histone variant exchange in chromatin. *Trends Biochem Scien*. 2005. 30, 12, 680-687.
9. Tremethick DJ. Higher-Order Structures of Chromatin: The Elusive 30 nm Fiber. *Cell*. 2007, 128, 4: 651-4.
10. Holland KA. Chromosomes: Nonhistone Proteins. En: *Encyclopedia of Life Science* 2002. Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing. doi 10.1038/npg.els.0001158
11. Passarge, E. En: *Color atlas of Genetics*. 2<sup>nd</sup> Edition. Thieme. New York. 2001, 457.
12. Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE, Korf B. En: *Principles and Practice of Medical Genetics*. 5<sup>ta</sup> Edición. Elsevier Ltd. Estados Unidos de América. 2007, 378.
13. Przewloka MR, Glover DM. The Kinetochore and the Centromere: A Working Long Distance Relationship. *Annu Rev Genet*. 2009. 43:439–65.
14. Mellone BG. Structural and temporal regulation of centromeric chromatin. *Biochem Cell Biol*. 2009. 87, 255-264.
15. Bloom K. Centromere dynamics. *Curr Opin Genet Dev*. 2007, 17:151–156
16. Cam HP, Noma K, Ebina H, Levin HL, Grewal SI. Host genome surveillance for retrotransposons by transposon-derived proteins. *Nature*. 2008 24, 451, 431-6.

17. Kwon MS, Hori T, Okada M, Fukagawa T. CENP-C is involved in chromosome segregation, mitotic checkpoint function, and kinetochore assembly. *Mol. Biol. Cell.* 2007. 18:2155–68.
18. Martin CL, Ledbetter DH. Telomere. En: *Encyclopedia of Life Science*. John Wiley & sons, Ltd. 2008. doi: 10.1002/9780470015902.a0005787.pub2.
19. Artandi SE, Pinho RA. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis*. 2010. 31, 1: 9–18.
20. Satyanarayana A, Kaldis P. Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene*. 2009. 28, 2925–2939.
21. Moore CM, Best RG. Chromosome Mechanics. En: *Encyclopedia of Life Science* John Wiley & sons, Ltd. 2007. doi 10.1002/9780470015902.a0001441.pub2.
22. Funk JO. Cell Cycle Checkpoint Genes and Cancer. En: *Encyclopedia of Life Science*. John Wiley & sons, Ltd. 2005. doi 10.1038/npg.els.0006046.
23. Cooper GM. En: *The Cell, a Molecular Approach*. 2nda ed. Sinauer Associates, Inc. Washington DC. 2000. 725.
24. Luthardt W, Keitges El. Chromosomal Syndromes and Genetic Disease. En: *Encyclopedia of Life Science*. John Wiley & sons, Ltd. 2001. doi 10.1038/npg.els.0001445
25. Nussbaum RL, McInnes RR, Williard HF. *Genética en medicina*. 5ta Edición. España Elsevier Masson. 2007. 470.
26. Gardner RJ, Sutherland, GR. En: *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling*, 3rd Edition. Oxford University Press. 2004.
27. Pack SD, Stratakis CA. Chromosomes: Methods for Preparation. En: *Encyclopedia of Life Science*. 2005. doi 10.1038/npg.els.0002709.
28. Barch MJ, Knutsen T, Spurbeck JL. En: *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. Third Edition. Lippincott-Raven. Philadelphia. 1997.644.
29. Crocker P, Murray PG. En: *Molecular Biology in Cellular Pathology*. John Wiley & Sons, Ltd. 2003.
30. Volpi EV, Bridger JM. FISH glossary: an overview of the fluorescence in situ hybridization technique. *BioTechniques* 45:385-409.
31. Liehr T. En: *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)–Application Guide*. Springer-Verlag 2009 Berlin Heidelberg. 441.

32. Levy B, Dunn TM, Kaffe S, Kardon N, Hirschhorn K. Clinical applications of comparative genomic hybridization. *Genet. Med.* 1998. 1:4–12.
33. Lichter P, Joos S, Bentz M, Lampel S. Comparative genomic hybridization: uses and limitations. *Semin. Hematol.* 2000. 37: 348–57.
34. Ming JE, Geiger E, James AC, Ciprero KL, Nimmakayalu M, et al. Rapid detection of submicroscopic chromosomal rearrangements in children with multiple congenital anomalies using high density oligonucleotide arrays. *Hum. Mutat.* 2006. 27:467–73.
35. Kamboj M. Diagnoses of Inborn Errors of Metabolism. *Pediatr Clin N Am.* 2008. 55 1113–1127.
36. Levy, PA. Inborn Errors of Metabolism: Part 1: Overview. *Pediatr Rev.* 2009. 30, 131-138.
37. Lanpher B, Brunetti-Pierri N, Lee B. Inborn errors of metabolism: the flux from Mendelian to complex diseases. *Nat Rev Genet.* 2006. 7, 6:449-60.
38. Couce ML, Fernández Lorenzo JR, Fraga JM. Manifestaciones en el periodo neonatal de los errores innatos del metabolismo. Protocolos diagnósticos y terapéuticos en pediatría. En: *Protocolos de la Asociación Española de Pediatría.* 2nda Edición. 2008.
39. Leonard JV, Morris AAM. Diagnosis and early management of inborn errors of metabolism presenting around the time of birth. *Acta Pædiatrica,* 2006. 95, 6-/14.
40. Applegarth DA, Dimmick JE, Toone JR. Laboratory detection of metabolic disease. *Pediatr. Clin. North Am.* 1989. 36, 49–65.
41. Gonzalez-Lamuño D, Couce ML, Bueno MA, Aldamíz-Echevarría L. Cuando las enfermedades raras se convierten en algo urgente: los errores innatos del metabolismo en atención primaria. *Aten Primaria.* 2009. 41,4: 221–226.
42. Gómez-Gómez M, Danglot-Banck C, Vega-Franco L. Pautas para el diagnóstico temprano de los errores innatos del metabolismo. *Rev Mex Pediatr* 2006. 73, 3: 139-147.
43. Thomas GH and Howell RR. Selected Screening Test for Genetic Metabolic Diseases. Year Book Medical Publishers, 1973.
44. Filiano JJ. Neurometabolic Diseases in the Newborn. *Clin Perinatol* 2006. 33, 411–479.
45. San Antonio JD, Iozzo RV. Glycosaminoglycans: Structure and Biological Functions. En: *Encyclopedia of Life Sciences.* John Wiley & Sons. 2001.

46. Hendriksz CJ. Inborn errors of metabolism for the diagnostic radiologist. *Pediatr Radiol*. 2009. 39:211–220.
47. Muenzer J. The Mucopolysaccharidoses: A Heterogeneous Group of Disorders with Variable Pediatric Presentations. *J Pediatr* 2004. 144: S27-S34.
48. Mabe P, Valiente A. Evaluation of reliability for urine mucopolysaccharidosis screening by dimethylmethylene blue and Berry spot tests. *Clin Chim Acta*. 2004. 345, 135–140.
49. Rudolph CD, Rudolph AM, Lister GE, First L, Gershon AA. En: Rudolph's Pediatrics. 22th Edition. Metabolic Disorders. 2006.
50. Carrillo-Farga J. En: Atlas Digital de Hematología. Cybercell, México. 2005.
51. Neufeld EF, Muenzer J, Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. The metabolic and molecular bases of inherited disease. Online 2010. doi: 10.1007/s00439-001-0669-z.
52. Jakóbkiewicz-Banecka J, Wêgrzyn A, Wêgrzyn G. Substrate deprivation therapy: a new hope for patients suffering from neuronopathic forms of inherited lysosomal storage diseases. *J Appl Genet*. 2007. 48, 4: 383–388.
53. Steinbach P, Adkins WN Jr, Caspar H, Dumars KW, Gebauer J, Gilbert EF, Grimm T, Habedank M, Hansmann I, Herrmann J, Kaveggia EG, Langenbeck U, Meisner LF, Najafzadeh TM, Opitz JM, Palmer CG, Peters HH, Scholz W, Tavares AS, Wiedeking C. The dup(3q) syndrome: report of eight cases and review of the literature. *Am J Med Genet*. 1981. 10, 2:159-77.
54. Faas BH, De Vries BB, Van Es-Van Gaal J, Merkx G, Draaisma JM, Smeets DF. A new case of dup(3q) syndrome due to a pure duplication of 3qter. *Clin Genet*. 2002. 62, 4:315-20.
55. Rizzu P, Haddad BR, Vallcorba I et al. Delineation of a duplication map of chromosome 3q: a new case confirms the exclusion of 3q25–q26.2 from the duplication 3q syndrome critical region. *Am J Med Gen* 1997. 68: 428–432.
56. Wilson GN, Hieber VC, Schmickel RD. The association of chromosome 3 duplication and the Cornelia de Lange syndrome. *J Pediatr*. 1978. 93, 5: 783–788.
57. Stengel-Rutkowski S, Murken JD, Pilar V et al. New chromosomal dysmorphic syndromes. 3. Partial trisomy 3q. *Eur J Pediatr*. 1979. 130, 111–125.
58. Sciorra LJ, Bahng K, Lee MI. Trisomy in the distal end of the long arm of chromosome 3. *Am J Dis Child*. 1979. 133, 727–730.



59. Rosenfeld W, Verma RS, Jhaveri RC, Estrada R, Evans H, Dosik H. Duplication 3q: severe manifestations in an infant with duplication of a short segment of 3q. *Am J Med Genet.* 1981. 10, 187–192.
60. van Essen AJ, Kok K, van den Berg A, de Jong B, Stellink F, Bos AF, Scheffer H, Buys CH. *Hum Genet.* Partial 3q duplication syndrome and assignment of D3S5 to 3q25-3q28. 1991. 87, 2:151-4.
61. Agarwal S, Moorchung N. Modifier genes and oligogenic disease. *J Nippon Med Sch.* 2005. 72, 6: 326-34.
62. Watson MS. Moving Microarrays Into Clinical Care. *Hum Mut.* 2008. 29, 9,1081-1082.
63. Bejjani BA, Shaffer LG. Clinical Utility of Contemporary Molecular Cytogenetics. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2008. 9:71–86.
64. Génin E, Feingold J, Clerget-Darpoux F. Identifying modifier genes of monogenic disease: strategies and difficulties. *Hum Genet.* 2008. 124, 4: 357-68.
65. Holder SE, Grimsley LM, Palmer RW, Butler LJ, Baraitser M. Partial trisomy 3q causing mild Cornelia de Lange phenotype. *J Med Genet.* 1994. 31: 150-152.
66. Ounap K, Ilus T, Bartsch O. A Girl with inverted triplication of chromosome 3q25.3-q29 and multiple congenital anomalies consistent with 3q duplication syndrome. *Am J Med Genet.* 2005. 134A, 434-438.
67. Zafra de la Rosa G, Venegas-Vega CA, Monroy N, Contreras-Bucio G, Friedrich U, Houman M, Saad A, Fernández P, Kofman-Alfaro S, Cervantes A. Trisomy 3q25.1-qter and Monosomy 8p23.1-pter in a Patient: Cytogenetic and Molecular Analysis With Delineation of the Phenotype. *Am J Med Genet A.* 2005. 30, 136, 3:259-64.
68. Krantz ID, Tonkin E, Smith M, Devoto M, Bottani A, Simpson C, Hofreiter M, Abraham V, Jukofsky L, Conti BP, Strachan T, Jackson L. Exclusion of linkage to the CDL1 gene region on chromosome 3q26.3 in some familial cases of Cornelia de Lange syndrome. *Am J Med Genet.* 2001. 15, 101, 2: 120-9.
69. Pires A, Ramos L, Venâncio M, Rei AI, Castedo S, Saraiva J. Prenatal foetal diagnosis of partial trisomy 3q and monosomy 13p due to a maternal balanced rearrangement. *Prenat Diagn.* 2005. 25, 4: 292-5.
70. Meins M, Hagh JK, Gerresheim F, Einhoff E, Olschewski H, Strehl H, Epplen JT. Novel case of dup(3q) syndrome due to a de novo interstitial duplication 3q24-q26.31 with minimal overlap to the dup(3q) critical region. *Am J Med Genet A.* 2005. 132A, 1: 84-9.

71. Brueton LA, Barber JCK, Huson SM, Winter RM. Partial monosomy 3q in a boy with short stature, developmental delay, and mild dysmorphic features. *J Med Genet.* 1989. 26, 11: 729–730.
72. Cohen O, Mermet MA, Demongeot J. HC Forum: a web site based on an international human cytogenetic database. *Nucleic Acids Res.* 2001. 29, 1:305-7.
73. Sly WS, Quinton BA, McAlister WH, Rimoin DL. Beta-glucuronidase deficiency: report of clinical, radiologic, and biochemical features of a new mucopolysaccharidosis, *J. Pediatr.* 1973. 82, 249–257.
74. Tomatsu S, Montan AM, Dung VC, Grubb JH, Sly WS. Mutations and Polymorphisms in GUSB Gene in Mucopolysaccharidosis VII (Sly Syndrome). *Hum Mut.* 2009. 30, 4: 511–519.
75. Vervoort R, Islam MR, Sly WS, Zobot MT, Kleijer WJ, Chabas A, Fensom A, Young EP, Liebaers I, Lissen W. Molecular Analysis of Patients with  $\beta$ -Glucuronidase Deficiency. Presenting as Hydrops Fetalis or as Early Mucopolysaccharidosis VII. *Am. J. Hum. Genet.* 1996. 58: 457-471.
76. Islam, M.R., Vervoort, R., Lissens, W., Hoo, J.J., Valentino, L.A., Sly, W.S.  $\beta$ -glucuronidase P408S, P415L mutations: evidence that both mutations combine to produce an MPS type VII allele in certain Mexican patients, *Hum. Genet.* 1996. 98, 281–284.
77. Islam MR, Gallegos Arreola MP, Wong P, Tomatsu S, Corona JS, Sly WS.  $\beta$ -glucuronidase P408S, P415L allele in a Mexican population: Population Screening in Guadalajara and Prenatal Diagnosis. *Prenat. Diagn.* 1998. 18: 822–825.
78. Nampoothiri S, Mahesh K, Hiran KR, Sunitha V. Sly Disease: Mucopolysaccharidosis Type VII. *Indian Pediatrics.* 2008, 45, 859-861.
79. Chamoles N, Blanco M, Gaggioli D, Casentini C. Hurler-like Phenotype: Enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin Chem.* 2001, 47, 12: 2098–2102.
80. Gratz M, Kunert-Keil C, John U, Cascorbi I, Kroemer H. Identification and functional analysis of genetic variants of the human  $\beta$ -glucuronidase in a German population sample. *Pharm Genom.* 2005. 15: 875–881.
81. Amery, L., Sano, H., Mannaerts, G. P., Snider, J., Van Looy, J., Fransen, M., Van Veldhoven, P. P. Identification of PEX5p-related novel peroxisome-targeting signal 1 (PTS1)-binding proteins in mammals. *Biochem J.* 2001, 357, 635-646.
82. Wanders RJ. Metabolic and molecular basis of peroxisomal disorders: a review. *Am J Med Genet.* 2004. 126A: 355–75.

83. Rosewich H, Ohlenbusch A, Gartner J. Genetic and clinical aspects of Zellweger spectrum patients with PEX1 mutations. *J Med Genet.* 2005. 42:e58.
84. De Saint-Vis B, Vincent J, Vandenabeele S, Vanbervliet B, Pin J, Ait-Yahia S, Patel S, Mattei MG, Banchereau J, Zurawski S, Davoust J, Caux C, Lebecque S. A Novel Lysosome-Associated Membrane Glycoprotein, DC-LAMP, Induced upon DC Maturation, Is Transiently Expressed in MHC Class II Compartment. *Immunity.* 1998, 9, 325–336.
85. Vervoort R, Gitzelmann R, Bosshard N, Maire I, Liebaers I, Lissens W. Low  $\beta$ -glucuronidase enzyme activity and mutations in the human  $\beta$ -glucuronidase gene in mild mucopolysaccharidosis type VII, pseudodeficiency and a heterozygote. *Hum Genet.* 1998. 102 : 69–78.
86. Vervoort R, Islam MR, Sly W, Chabas A, Wevers R, De Jong J, Liebaers I, Lissens W. A Pseudodeficiency Allele (D I 52N) of the Human  $\beta$ -Glucuronidase Gene. *Am. J. Hum. Genet.* 1995. 57:798-804.
87. Gitzelmann R, Wiesmann UN, Spycher MA, Herschkowitz N, Giedion A Unusually mild course of beta-glucuronidase deficiency in two brothers (mucopolysaccharidosis VII). *Helv Paediatr Acta.* 1978. 33, 4-5: 413-28.

## 10. Anexo I



HOSPITAL INFANTIL de MÉXICO

FEDERICO GÓMEZ

Instituto Nacional de Salud

### Carta de Consentimiento informado.

Protocolo de investigación:

*"Determinación de puntos de ruptura por técnica de FISH en casos de rearreglos cromosómicos complejos en 9 pacientes del Hospital Infantil de México Federico Gómez"*

Estimado paciente o tutor:

Por medio de esta carta, lo invitamos a participar en el estudio mencionado arriba, la cual es una investigación que pretende conocer y entender mejor porque se presenta la enfermedad que tiene su hijo. Durante los estudios realizados en el Departamento de Genética, y como le ha sido explicado previamente por su médico tratante, se ha determinado por estudio cromosómico de bandas G o cariotipo, que Usted o su hijo presentan una variante en la forma o número de sus cromosomas por lo que podrían realizarse estudios más precisos para poder determinar exactamente las características de estos cromosomas. Por esta razón nos dirigimos a Usted para hacerle una invitación a participar en el protocolo de investigación.

Esta investigación estudia las características y los cambios que pudiera haber en el material genético y estos cambios pueden causar alteraciones en el desarrollo. Por ello esta investigación puede proporcionarnos más conocimientos que ayudarían a otras personas en un futuro.

Queremos que Usted sepa que participar en esta investigación es totalmente voluntario y que Usted puede decidir no participar o retirarse del estudio en cualquier momento. En cualquier caso, no perderá ninguna prestación a la que tenga derecho, en el manejo integral de su hijo.

Este protocolo está orientado al análisis de los cromosomas, que son estructuras diminutas que se encuentran en nuestras células y que funcionan como archiveros de nuestra información genética. El protocolo tiene el objetivo de determinar de manera más precisa cuales son las regiones cromosómicas involucradas y de que manera están relacionadas con la enfermedad que su hijo presenta. Para ello es necesario realizar el análisis cromosómico que se llama estudio FISH (hibridación por fluorescencia in situ) en el cual los cromosomas son coloreados con sustancias específicas en las regiones cromosómicas involucradas que identifican de manera más precisa las partes de los cromosomas en estudio.

Para este estudio, necesitamos tomarle a su hijo y a Ustedes, una muestra de sangre, mediante el siguiente procedimiento:

1.- Con una jeringa desechable se le tomará a su hijo y a Ustedes una muestra de sangre de la vena del brazo, aproximadamente 3ml (o menos, la cantidad dependerá de las condiciones del paciente). Esta muestra será procesada para el estudio de cariotipo habitual y posteriormente al estudio mencionado de FISH.

2.- Queremos que sepa, que no daremos a conocer ninguna información acerca de Usted ni de su familia que los pueda identificar, debido a que la información que se recabe es absolutamente confidencial y con fines de investigación y se publicará en revistas científicas de reconocimiento internacional.

**BENEFICIOS:** Se les dará a Ustedes asesoramiento genético y posteriormente se agregará la información que llegue a integrarse en este estudio cuando se tengan los resultados. Su colaboración permitirá obtener conocimiento que tal vez ayudará a otras familias que presenten problemas similares en un futuro.

INSTITUCIÓN DE SERVICIO MÉDICO, ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN, AFILIADA A LA UNAM

Dr. Márquez 162, Col. Doctores, c.p. 06720, México, D. F.  
Teléfono: 52 28 99 17

www.himfg.edu.mx





HOSPITAL INFANTIL de MÉXICO

FEDERICO GÓMEZ

Instituto Nacional de Salud

RIESGOS Y MOLESTIAS: Los posibles riesgos de la extracción de sangre son los siguientes: molestia leve en el sitio por donde se le extrajo la sangre; a veces, la formación de moretones, desmayos y rara vez infección.

COSTOS: Tanto la extracción de muestras de sangre como las pruebas y cualquier consulta que Usted tenga con el médico para hablar del estudio de investigación, así como los resultados no tendrán ningún costo para Usted.

Si surgiera alguna duda o tuviese Usted una pregunta con respecto a este estudio, a sus derechos como participante en la investigación o a cualquier lesión relacionada con la investigación, deberá Usted comunicarse con los médicos del departamento de genética o con el investigador principal (Dra. Rosa Isela Ortiz de Luna, médico adscrito al departamento de Genética) al teléfono 52 28 99 17 ext. 1495. Si deseara hablar con alguien más acerca del protocolo, aparte de los investigadores relacionados, puede Usted dirigirse a la Dirección de Investigación de nuestra Institución a la ext. 1482.

Le sugerimos que conserve una copia de este documento para consultarla si es necesario.

He leído las explicaciones acerca de este estudio y se me ha dado la oportunidad de discutirlos y de hacer preguntas. Por este medio otorgo mi consentimiento para participar en el estudio.

México, D.F. \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del \_\_\_\_\_

Nombre y firma del paciente \_\_\_\_\_  
(de ser el caso)

Nombre y firma de la Madre

Nombre y firma del Padre

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Nombre y firma de testigo 1  
Parentesco con el paciente

Nombre y firma de testigo 2  
Parentesco con el paciente

\_\_\_\_\_

EL PRESENTE DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO HA SIDO APROBADO PARA USARSE ENTRE EL DIA\_\_ DEL MES DE \_\_\_\_\_ DE 2007 Y EL DIA\_\_ DEL MES DE \_\_\_\_\_ DE 2009



## 11. Anexo II

### 1. Técnica de bandas GTG.

Preparación de Soluciones:

- Solución de Carnoy o fijador  
3 porciones de Metanol absoluto por 1 porción de Ácido acético glacial.
  - Solución Hipotónica de KCl 0.075M  
Cloruro de Potasio 5.6g 1L  
Agua destilada 1L
- a. Se obtienen 1.5ml de muestra de sangre periférica, en una jeringa con 0.1ml de heparina sódica de 1, 000 U.I
  - b. Se agregan 700µl de la muestra en 2 tubos de ensayo Falcon desechables de polipropileno esterilizados.
  - c. Se agregan 5ml de medio de cultivo PB-MAX (contiene RPMI 1640, fitohemaglutinina, suero fetal de bovino, antibióticos estreptomycin y penicilina, L- glutamina).
  - d. Se incuba por 72 horas a 37-37.5°C.
  - e. A las 72 hrs se agregan 20µl de colchicina a cada tubo, se agita y se incuban 30min más a 37-37.5°C.
  - f. Se centrifuga por 10min a 2, 500 rpm.
  - g. Se decanta el sobrenadante y se resuspende agitando en vortex y se agrega solución hipotónica para completar un volumen de 12ml.
  - h. Se incuba 30min a 37-37.5°C.
  - i. Centrifugar 10min a 2, 500 rpm.
  - j. Con pipeta se retira el sobrenadante y en agitación se agrega fijador frío o solución de Carnoy, gota a gota para completar un volumen de 8ml.
  - k. Se refrigera por 20 min
  - l. Se centrifuga y se retira el sobrenadante, se lleva a un volumen de 8ml para el primer lavado
  - m. Se centrifuga nuevamente, se retira el sobrenadante y se lleva a volumen de 6ml para el segundo lavado.
  - n. Se gotea el cultivo en laminillas de vidrio y se revisa el material determinando la calidad y cantidad de metafases presentes.
  - o. Las laminillas obtenidas se incuban en estufa a 60°C por espacio de 24hr.
  - p. Se realiza técnica de bandeo GTG
  - q. Se monta tren de bandeo

- r. Se utilizan 5 vasos Koplick, en el primero se colocan 98ml de amortiguador de fosfato pH7+2ml de tripsina, en el segundo 100ml de amortiguador de fosfato pH7, en el tercero 96ml de amortiguador de fosfato pH 6.8 + 4ml de tinción de Wright, en el cuarto 96ml de amortiguador de fosfato pH6.8 + 4ml de colorante Giemsa y en el último agua destilada.
- s. Se estandarizó la técnica para tiempos en tripsina y colorantes.
- t. Se fijan las laminillas y se observan al microscopio.
- u. Se analizan 20 metafases.

### Referencia

Barch MJ, Knutsen T, Spurbeck JL. En: The AGT Cytogenetics Laboratory Manual. Third Edition. Lippincott-Raven. Philadelphia. 1997.

## 2. Técnica de cariotipo con bandas NOR

Preparación de soluciones:

- Solución de nitrato de plata al 50%

Nitrato de plata 5g

Agua destilada 10mL

Debe guardarse en frascos oscuros a 0°C

- Solución de plata amoniacal

Nitrato de plata 4g

Agua destilada 5mL

Hidróxido de amonio 5mL

La solución puede guardarse en frascos oscuros por algunos días.

- Solución reveladora

Formaldehído (Formalina a 37%) 8mL

Agua destilada 98.5mL

Se neutraliza la solución de formalina con cristales de acetato de sodio, y se ajusta el pH a 5.6 con ácido fórmico antes de usar la solución.

- a. Se preparan laminillas para técnica habitual (Anexo I del a-p).
- b. Se ponen 5 a 6 gotas de una solución de nitrato de plata a 50% y se coloca un cubreobjetos de vidrio.

- c. Se introducen las laminillas en baño María a 37°C durante 40 horas.
- d. Las laminillas se enjuagan con agua destilada, se agregan cuatro gotas de solución de plata amoniacal y se coloca un cubreobjetos.
- e. Se deja que actúe la solución y se añaden cuatro gotas de solución reveladora de formaldehído, observándola al microscopio y usando objetivo seco débil. En el momento que los cromosomas toman un color amarillo dorado, se debe remover con rapidez el cubreobjetos y lavar con agua destilada.
- f. Se monta la laminilla y observa al microscopio.

### Referencia

Guizar-Vázquez JJ. En: Genética clínica: Diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias. Cap. 10. 3ra Edición. Manual Moderno 2001. pp 172.

3. Técnica para FISH (hibridación in situ con fluorescencia) con sonda de pintado cromosómico
  - a. Se realiza la técnica de cariotipo hasta la preparación de laminillas.
  - b. Se deshidrata el portaobjetos que fue goteado, sumergiéndolo en una serie de etanol (70%, 85% y 100%), 2 minutos en cada uno.
  - c. Se saca la sonda del congelador de -20°C y se deja calentar a temperatura ambiente, se hace uniforme la solución mezclando varias veces con una pipeta.
  - d. Se pone 10µL de la mezcla de hibridación en el portaobjeto.
  - e. Se cubre el portaobjetos con un cubreobjetos de cristal sellando con solución de goma y se deja secar completamente.
  - f. Se coloca el portaobjetos en el equipo hybrite para hibridación, programándolo a 75°C, desnaturalizándolo por 2 minutos.
  - g. Se inicia la hibridación en el hybrite a 37°C por 24 horas.
  - h. Posteriormente se inician los lavados posthibridación, quitando el cubreobjetos y los restos de goma.
  - i. Se lava el portaobjetos en el amortiguador SSC 0.4X de pH 7 a 72°C durante dos minutos.



- j. Se seca el portaobjetos y se lava en amortiguador SSC 2X, 0.05% Tween-20 a temperatura ambiente por 30 segundos.
- k. Se seca el portaobjeto y se aplica 10  $\mu$ L del DAPI Antifade.
- l. Se cubre con el cubreobjetos y se deja la preparación en la oscuridad durante 10 min para estabilizar el DAPI.
- m. Se observa en el microscopio de fluorescencia.

#### Referencia

Manual del fabricante Aquarius Probes Cytocell Ltd..

#### 4. Técnica para detección de glucosaminoglicanos en orina cualitativo (Prueba de azul de toluidina).

Esta es una de las 5 reacciones de análisis realizadas en el tamiz metabólico cualitativo que se realiza en el Laboratorio de Bioquímica del Departamento de Genética. Las otras son: dinitrofenilhidrazina, nitrosonaftol, Brand y cloruro férrico. Para motivo de esta tesis solo se describe la prueba de azul de toluidina, única utilizada en el presente análisis.

Preparación de Soluciones:

- Reactivo de azul de toluidina  
Se disuelve 1g de azul de toluidina en una solución de 400mL de acetona y 100mL de agua.
- a. Se añade 25  $\mu$ L de orina a un punto marcado en papel filtro, usando incrementos de 5 $\mu$ L, dejándose secar antes de añadir la siguiente.
  - b. Se sumerge el papel filtro en el reactivo de azul de toluidina durante 45 segundos y se dejan secar.
  - c. Se lava en ácido acético al 10% por 2 horas.
  - d. Se deja secar y se observa resultado.

#### Referencia

Thomas GH and Howell RR. Selected Screening Test for Genetic Metabolic Diseases. Year Book Medical Publishers, 1973