



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

IDENTIFICACIÓN MEDIANTE HIBRIDACIÓN *IN SITU* CON FLUORESCENCIA (FISH) DEL SÍNDROME DEL CROMOSOMA 20 EN ANILLO EN UN PACIENTE FEMENINO EN

T E ^{MOSAICO} S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

Mario A. López Gordillo

Director de tesis:

Biol. Karem Nieto Martínez

Asesor interno:

Biol. María Cristina Alvarado Domínguez

2012



ÍNDICE

Resumen	1
1. Introducción	3
1.1 Genética humana	3
1.2 Citogenética humana	4
1.3 Anomalías cromosómicas	8
1.3.1 Anomalías cromosómicas numéricas	8
1.3.2 Anomalías cromosómicas estructurales	9
1.4 Citogenética molecular	10
1.4.1 Hibridación <i>In situ</i> con fluorescencia (FISH)	11
1.4.2 FISH en metafase	13
1.4.3 FISH en interfase	14
2. cromosomas en anillo	15
2.1 generalidades de los cromosomas en anillo y su influencia en el fenotipo	15
2.2 Mecanismos de formación	16
2.3 Inestabilidad	17
2.4 Segregación	19
3. Síndrome del cromosoma 20 en anillo [S(r(20))]	20
3.1 Características fenotípicas	21
3.1.1 Aprendizaje y comportamiento	21
3.1.2 Neuroclínica	21
3.2 Manejo clínico	22
3.3 Etiología	23
3.4 Casos clínicos en México	26
4. Justificación	27
5. Objetivos	28
5.1 Objetivo general	28
5.2 Objetivos particulares	28
6. Métodos	29
6.1 Caso clínico	29
6.2 Siembra	29
6.3 Cosecha	29
6.4 Elaboración de láminas	30
6.5 Técnica de bandas G	30
6.6 Técnica para obtener mucosa bucal para FISH	30
6.7 Técnica de FISH	30
6.8 Lavados posthibridación	31
6.9 Criterios de análisis para FISH	31
7. Resultados	32
7.1 Clínica	32
7.2 Citogenética	33
8. Discusión	38
9. Conclusiones	40
10. Perspectivas	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fases del ciclo celular	4
Figura 2. Cariotipo masculino teñido con Giemsa	7
Figura 3. Ideogramas de bandas G del cromosoma 11 humano con resolución (de izquierda a derecha 350, 550 y 850 bandas)	8
Figura 4. Fundamento de la técnica de FISH	12
Figura 5. Célula en metafase que muestra ambos cromosomas 20 normales las regiones subteloméricas se presentan en color verde para el brazo “p” y en color rojo para el brazo “q”	14
Figura 6. Célula en interfase que muestra monosomía del cromosoma 20 las regiones subteloméricas se presentan en color verde para el brazo “p” y en color rojo para el brazo “q”	14
Figura 7. Mecanismos clásicos de formación de un anillo cromosómico	15
Figura 8. Formación de un anillo cromosómico por división transversal del centrómero combinada con un cambio tipo “U”	16
Figura 9. Replicación y segregación en diferentes tipos de anillo cromosómico	19
Figura 10. Posibilidades de segregación para anillos cromosómicos	20
Figura 11. Localización de los genes descritos como responsables de las características clínicas del S(r20)	23

Figura 12. Metafase que muestra un cromosoma 20 normal y su homólogo en anillo	33
Figura 13. Metafases que muestran diferentes líneas celulares observadas en FISH	35
Figura 14. Células de mucosa bucal en interfase que muestran diferentes líneas celulares observadas en FISH	36
Figura 15. Genes cubiertos por las sondas subteloméricas	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Técnicas de bandeado y sus características	6
Tabla 2. Tipos de sonda utilizados en la técnica FISH	15
Tabla 3. Genes candidatos descritos como responsables de las características clínicas del S(r20) y su mecanismo de acción	24
Tabla 4. Análisis comparativo del cuadro clínico del paciente con el cuadro clínico del S(r20)	32
Tabla 5. Porcentajes de las líneas celulares observadas en cariotipo y en FISH	36

Resumen

Este trabajo fue realizado en el Servicio de Genética del Hospital General de México gracias al apoyo del proyecto ESTUDIO MULTICÉNTRICO Y MULTIDISCIPLINARIO PARA EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO - MOLECULAR Y MANEJO DE NIÑOS MEXICANOS CON RETRASO MENTAL financiado por el CONACYT con clave 2005-C01-13947.

Responsable: Carlos Venegas Vega Médico adjunto al Servicio de Genética del Hospital General de México.

Corresponsable: Dra. Susana Kofman Alfaro Investigador Emérito del Servicio de Genética del Hospital General de México.

Durante la realización de este trabajo se obtuvo una beca como “ayudante de investigador” por el CONACyT con número de registro 24717088 solicitada por la Dra. Susana Kofman.

AGRADECIMIENTOS

A la Biol. Karem Nieto (Servicio de Genética del Hospital General de México):

Por sus enseñanzas técnico-académicas y por el tiempo dedicado para realizar esta tesis.

A la Dra. Susana Kofman y al Dr. Carlos Venegas (Servicio de Genética del Hospital General de México):

Por sus enseñanzas académicas y por permitirme formar parte de su equipo de trabajo durante la realización de este estudio.

A la M. en C. Alicia Cervantes, al Dr. en C. Fernando Fernández y la M. en C. Laura Gómez (Hospital General de México):

Por compartir sus conocimientos y por haber hecho todo lo posible para mejorar esta tesis.

DEDICATORIA

Para mi Mamá:

Por haberme dado la vida, por permitirme ser un hombre libre, por brindarme tu cariño, sin ti no habría llegado hasta esta etapa de mi vida.

Para mi Papá:

Por haberme formado como hombre, por enseñarme a crecer como persona, por dar todo por mí sin esperar algo a cambio, te debo mucho.

Para mi tía Elena:

Por apoyarme en todo lo que hago, por tratarme como tu tercer hijo, por estar conmigo en cada momento de la vida.

Para mi primo Pepe:

Por crecer junto a mí, por ser el hermano que nunca tuve, por regalarme tu confianza.

Para mi primo Roberto:

Por creer en mí, por tratarme como tu hermano, por estar al pendiente de mí.

Para mi tío Cris:

No importa donde estés algún día nos encontraremos.....

Para mi abuelo Pablo:

Cuando te vuelva a ver te daré las gracias ya que gracias a ti nunca nos faltó comida a mi madre y a mí.

Al Biol. Javier Castro (Instituto Nacional de Perinatología):

Por sus enseñanzas técnico-académicas y por brindarme su confianza.

Al Biol. Juan Carlos Ibañez (Instituto Nacional de Perinatología):

Por sus enseñanzas técnico-académicas y por creer en mí.

A la Biol. Mónica Quintana, Anita, Dra. Mónica Aguinaga, Dra. Dora Gilda Mayen, Dra. Roció Báez (q.e.p.d.), Dr. Alejandro Martínez, por sus enseñanzas durante mi estancia en el Instituto Nacional de Perinatología.

A la Biol. Ixi Torres (UAM-Iztapalapa):

Por su apoyo, por creer en mí, por brindarme su amistad incondicional, por su compañía en el Instituto Nacional de Perinatología y por sus consejos.

A Moonse Ivonnet Ekis (gracias por todo), Estrella, Karol, Adriana, Gina, Vero, Neto, Susy, Gabriel, Cinthya, Eli, Tere (bandaaaaaaaaaaaaa), Luz, QFB Adrian Pérez, a la Maestra Rosi, por su compañía y por compartir sus enseñanzas durante mi estancia en el Hospital General de México.

A todos los céstodos de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza:

Ale, Vero, Mago, Vane, Uri, Reno, Negro, Talibán, Concho, Misa, Martha, Richi, Paco, Enano, Adri, Kannon, Margara, Turista, León, Leona, Anakin, Greñas, Cecy, Bulto, Steve, Didi, Karicias, Pelón, Keni, Jorch, Aguacate, Gudy, Lucy, Du, Mire, Lalo, Chris, Haruka y al Espejo (para unir galaxias distantes con mundos paralelos solo se requieren agujeros de gusano).

Resumen

El síndrome del cromosoma 20 en anillo [S(r(20))] es una entidad genética asociada a epilepsia refractaria electroclínica, con expresión variable de dismorfias y discapacidad intelectual.

En el presente trabajo se estudió una paciente con S(r(20)) que presentó epilepsia refractaria y retraso psicomotor leve, la cual acudió al Servicio de Genética del Hospital General de México. El objetivo fue establecer la correlación de las

características clínicas de la paciente con lo observado mediante las técnicas de citogenética clásica y molecular.

Se realizó cultivo de linfocitos de la paciente y sus padres para obtener cariotipo. En células de la paciente se realizó hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) tanto en linfocitos como en mucosa bucal.

El cariotipo en 25 metafases analizadas y el FISH en 100 metafases con sondas para las regiones subteloméricas de los brazos p y q del cromosoma 20 resultó en mosaicismo con 80 y 81% de 46,XX, r(20)(p13q13.3) y de 12 y 10% la línea normal 46,XX respectivamente. Mientras que en 200 núcleos de células de mucosa bucal analizadas por FISH con las mismas sondas, se encontró que el 50% presenta el anillo y el 45% representan la línea normal. Los porcentajes restantes estaban representados por células con monosomía por pérdida del anillo y un anillo doble, referidas como mosaicismo dinámico por la inestabilidad característica del anillo durante la división celular. La técnica de FISH delimitó hasta las secuencias subteloméricas hibridadas, que no había pérdida de material en ambos brazos del cromosoma 20 que formó el anillo.

Las características clínicas de la paciente se pueden relacionar con el porcentaje de la línea con anillo, González y colaboradores en 2004 señalan que si el anillo está en más del 50% de las células, se presenta un fenotipo severo. El porcentaje de la línea con anillo varía en los diferentes tejidos; la inestabilidad estructural del anillo durante las divisiones celulares produce constantes aneuploidías secundarias que pueden causar falla en el crecimiento, principalmente en la embriogénesis donde hay una alta tasa de división y esto influye en características fenotípicas de la paciente.

Como conclusiones tenemos que el S(r(20)) se diagnostica mediante estudio citogenético, la técnica de FISH permite delimitar el tamaño de las deleciones terminales con mayor precisión que por bandeado GTG. Se requiere de estudios adicionales para saber si el anillo es por fusión de repetidos teloméricos o si hay alguna microdelección que contenga genes que por hemicigocidad puedan relacionarse con el fenotipo. Conocer la etiología de la epilepsia refractaria en estos pacientes será de gran ayuda para que el médico proporcione asesoramiento, tratamiento y seguimiento genético adecuados.

1 Introducción

1.1 Genética Humana

Las características de un ser vivo están determinadas por la interacción del conjunto único de sus genes con el ambiente, la genética es la ciencia que se encarga de estudiar estas interacciones. Es importante en humanos no solo en el sentido de su propia naturaleza, sino en la medicina.

Una buena proporción de los problemas de salud tienen una causa genética. Se estima, que al menos el 30% de las admisiones hospitalarias tienen un componente genético. Se trata seguramente de una estimación baja, ya que la genética médica ha avanzado rápidamente en los últimos años y se han descubierto cada vez más predisposiciones genéticas a enfermedades que anteriormente no se sospechaba que tuvieran un componente genético.

Las alteraciones genéticas de la salud pueden dividirse en tres grupos principales. El primer grupo es el de las enfermedades hereditarias debidas a genes anormales que se transmiten de una generación a la siguiente como la fibrosis quística, la fenilcetonuria y las distrofias musculares. El segundo grupo es el de las enfermedades genéticas somáticas, que se deben a la aparición repentina de una forma anormal de un gen en una parte del cuerpo. El cáncer es el ejemplo más significativo de este tipo de enfermedades. Aunque los cambios somáticos no se transmiten a la siguiente generación, puede existir predisposición a cáncer debido a la herencia de genes anormales de forma heterocigota. El tercer grupo es el de las alteraciones cromosómicas, tales como el síndrome de Down o el del Maullido de Gato, cuyas causas son anomalías heredadas en la estructura o número de cromosomas.

Debido a que gran número de enfermedades tienen como causa genes mutados actualmente se utilizan técnicas genéticas moleculares para analizar estos genes ya descritos, o bien aislar y caracterizar nuevos genes con la finalidad de

encontrar nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento y seguimiento de los pacientes.

La genética médica en la actualidad, se ha convertido en una parte de la medicina genómica, que persigue la aplicación del análisis del genoma humano, incluyendo el control de la expresión génica y la variación entre los genes humanos. La genética médica no solamente está centrada en el paciente sino en toda su familia, de ahí la importancia de una buena elaboración de una historia familiar, ya que permite la determinación de riesgo de padecimiento de la enfermedad (Griffiths *et al.*, 1993; Pierce 2009).

1.2 Citogenética

En las células el material genético se presenta en diferentes formas dependiendo de la fase del ciclo celular en que se encuentre (fig.1), en interfase se presenta dentro del núcleo celular en forma de cromatina, el DNA está laxo acompañado de histonas, RNAs y proteínas necesarias para el metabolismo del DNA. El avance de la citogenética se logró gracias a la técnica de cultivo de tejidos donde se pudo detener el ciclo celular en fase de división (metafase), donde el material genético alcanza el máximo grado de compactación y se forman los cromosomas que pueden ser observados al microscopio.

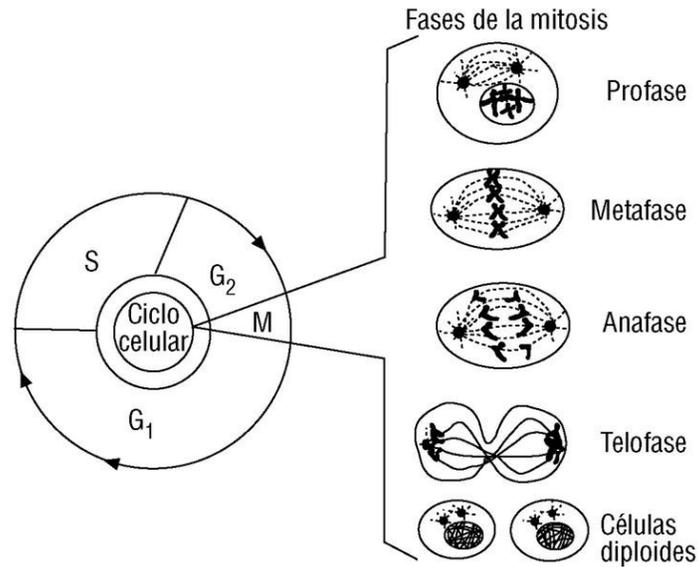


Figura 1. Fases del ciclo celular. Tomado de Rojas *et al.*, 2001.

Los cromosomas humanos son lineales, compuestos morfológicamente por dos brazos, uno corto “p”, uno largo “q”, una región central llamada centrómero y segmentos terminales llamados telómeros que funcionan como estructura de protección.

La citogenética es el estudio de la estructura, función y evolución de los cromosomas, además, esta área estudia el comportamiento cromosómico durante las divisiones de células somáticas (mitosis) y germinales (meiosis). La citogenética humana se enfoca en estudiar las alteraciones que ocurren durante estos procesos de división y como se originan los cambios en número o estructura cromosómica, ya que estas modificaciones son causas de discapacidad intelectual, malformaciones congénitas, cáncer, infertilidad y aborto espontáneo.

Hacia mediados del siglo XX diversas publicaciones pretendían demostrar que la especie humana contiene 48 cromosomas en sus células somáticas y muchas más basaban sus experiencias en dicha afirmación que era universalmente aceptada. Durante tres décadas la comunidad científica perseveró en esta

creencia hasta que en 1956, Tjio y Levan reportaron que los humanos presentan 46 cromosomas, vistos en células embrionarias cultivadas, éste hallazgo fue confirmado por Ford y Hamerton el mismo año en células de testículo.

El arresto mitótico con colchicina y el uso de la solución hipotónica, facilitaron enormemente el análisis microscópico ya que permitían obtener preparaciones celulares con mayor cantidad de metafases y con cromosomas menos sobrepuestos entre sí. Desde ese momento los hallazgos de patologías humanas relacionadas a aberraciones cromosómicas, dejaron en claro la importancia de la citogenética en la clínica médica. Como se mencionó anteriormente, los cromosomas pueden ser observados en la etapa de metafase de la división celular ya sea en mitosis o meiosis. En el humano existen 23 pares de cromosomas, de los cuales 22 son autosomas y un par es de cromosomas sexuales, XX en mujeres y XY en varones. La clasificación de los cromosomas se basa en tres criterios: (1) tamaño de mayor a menor, (2) posición del centrómero –metacéntrico, submetacéntrico y acrocéntrico- y (3) patrón de bandeo específico de cada cromosoma, a este ordenamiento cromosómico se le denomina cariotipo (fig.2), el cual es una herramienta de diagnóstico muy importante en medicina y en genética humana (Bickmore, 2001; Spurbeck *et al.*, 2004). Para reportar un cariotipo, se tiene un sistema de nomenclatura internacional.

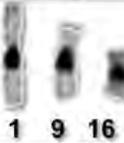
La nomenclatura cromosómica humana tiene como objetivo referir de manera inequívoca los hallazgos citogenéticos y moleculares de cada individuo y evitar confusiones en la presentación de resultados e informes de investigación a la comunidad científica internacional. Hoy conocidas como ISCN (International System of Chromosome Nomenclature) está basada en los resultados de varias conferencias internacionales, la primera se llevó a cabo en Denver en 1960.

En la Conferencia de París, en 1971 quedaron establecidas las reglas de nomenclatura citogenética basadas principalmente en el bandeo G. El avance de las nuevas tecnologías moleculares han demandado modificaciones continuas que llevaron a la última publicación en 2009 donde se contempla la nomenclatura para el reporte de microarreglos (Shaffer *et al.*, 2009).

INTRODUCCIÓN

Existen diferentes técnicas que producen patrones de bandeo específicos para cada cromosoma, gracias a estas se pueden analizar las anomalías en número y estructura cromosómica (Tabla 1).

Tabla 1. Técnicas de bandeo y sus características.

Q Casperson (1970)	Mostaza de Quinacrina		Regiones ricas en A-T
G Sumner (1971)	Tripsina Giemsa		Regiones ricas en A-T. Interactúa con los grupos fosfato del esqueleto de DNA.
R Dutrillaux y Lejeune (1971)	BrdU Giemsa		Regiones ricas en G-C
C Arrigui y Hsu (1971)	Tratamiento con sales y pH alcalino Giemsa	 1 9 16	Región Heterocromatica 1, 9, 16, Y y centrómicos.
NOR Sasaki (1973)	Tinción con Ag Regiones activas Transcrip. genes de RNA ribosomal		Regiones Org. Nucleolares Tallos D - 13, 14, 15 G - 21, 22

Hacia fines de los años 70 la técnica de bandeo G ya había alcanzado un grado de desarrollo suficiente de suma utilidad en la descripción de anomalías cromosómicas. Se definieron diversos síndromes de deleciones y se destacó la relación patognomónica entre diversas translocaciones recurrentes y neoplasias hematológicas. El mejoramiento de la técnica y la obtención de bandas G en cromosomas con alta resolución (fig.3) en profase tardía o metafase temprana permitió detectar anomalías cromosómicas sutiles que no eran observadas por las técnicas clásicas, o que lo eran con mucha dificultad.

La técnica de bandeo G es el estándar para identificar cromosomas y para analizar anomalías numéricas y estructurales.

INTRODUCCIÓN

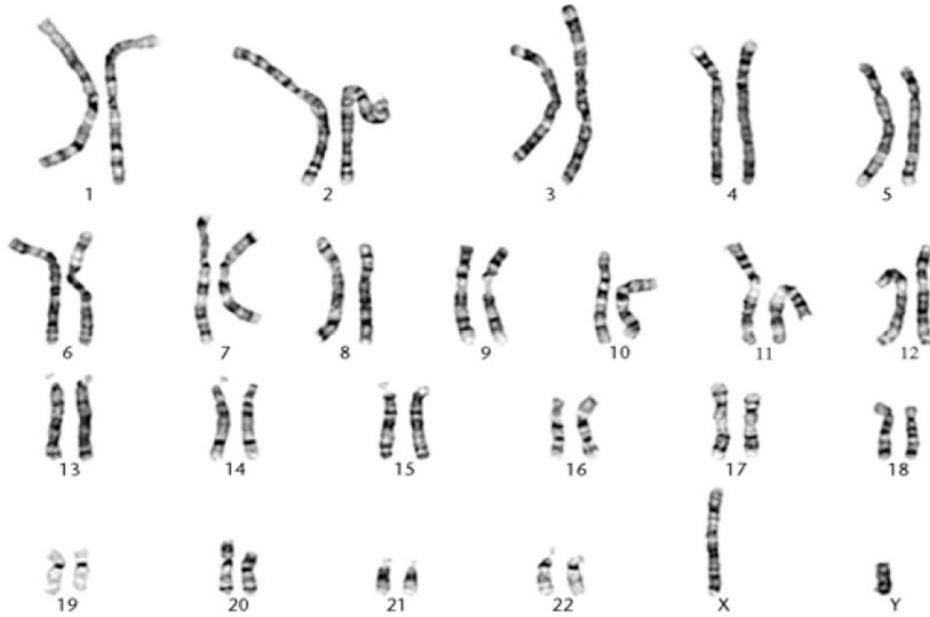


Figura 2. Cariotipo normal masculino tratado con tripsina y teñido con Giemsa (bandas G). Tomado de Shaffer, 2005.

Los ideogramas de las bandas G han sido publicados y son puntos estándar de referencia para el bandeado cromosómico (Shaffer *et al.*, 2009). Las bandas G generalmente se muestran en negro y las bandas R en blanco. El número total de bandas o resolución en el cariotipo humano depende de la compactación los cromosomas (fig.3) (Bickmore, 2001; Spurbeck *et al.*, 2004).

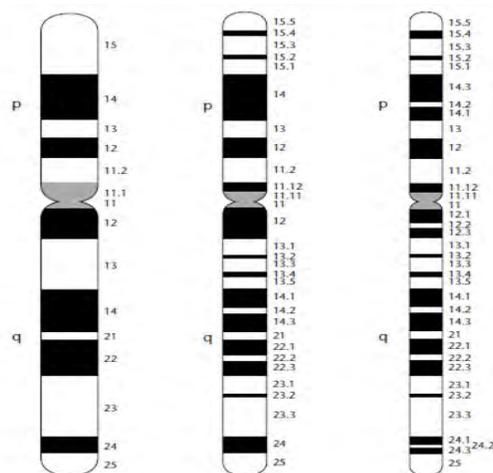


Figura 3. Ideogramas de bandas G del cromosoma 11 humano con resolución de izquierda a derecha 350, 550 y 850 bandas por set haploide, que permite un análisis entre 10 y 5 Mb respectivamente. Tomado de Bickmore, 2001.

Para un diagnóstico genético es necesario obtener un cariotipo con una resolución de al menos de 450 a 550 bandas por set haploide, ya que a mayor resolución, los cromosomas presentan un incremento en el número de bandas (Shaffer, 2005).

1.3 Anomalías cromosómicas

Las cromosomopatías corresponden a los padecimientos originados por alteraciones de los cromosomas y se clasifican en dos grupos: las de tipo numérico y las estructurales.

1.3.1 Anomalías Numéricas

Las anomalías cromosómicas numéricas pueden ser múltiplos exactos o inexactos del número haploide (46,XX o 46,XY), los múltiplos exactos son llamados poliploidías, como la triploidía 69, XXX o la tetraploidía 92,XXYY. Los múltiplos inexactos se llaman aneuploidias, como la monosomía 45,X (síndrome de Turner) o la trisomía 47,XX+21 (síndrome de Down). Al número normal de cromosomas se le llama euploidía.

1.3.2 Anomalías Cromosómicas Estructurales

Las anomalías cromosómicas estructurales son producidas por diferentes factores externos como la radiación, fármacos, virus o internos por errores en el metabolismo del DNA. Las alteraciones estructurales más frecuentes son: deleciones, duplicaciones, translocaciones, inversiones, inserciones,

isocromosomas, anillos cromosómicos, cromosomas dicéntricos, marcadores, dobles minutos y rearrreglos complejos.

Delección: es la pérdida de un segmento del cromosoma, es intersticial si la pérdida fue cercana al centrómero o terminal si la pérdida ocurrió en la región distal del cromosoma. Tienen repercusiones fenotípicas ya que originan una monosomía parcial. Ejemplo 46,XX,del(5)(p15.2) (síndrome del maullido de gato).

Duplicación: Es la repetición de un segmento cromosómico, es directa si el fragmento duplicado posee la misma orientación con respecto al centrómero y si se repite más de una vez, es en "tandem". La duplicación es invertida si el segmento duplicado se coloca con una orientación opuesta al centrómero. Originan una trisomía parcial. Ejemplo 46,XX,dup(3)(q25qter).

Translocación: Es el intercambio de segmentos entre los brazos de los cromosomas, es recíproca si no hay pérdida de material genético en los puntos de intercambio. Si el intercambio ocurre entre cromosomas acrocéntricos se llama translocación Robertsoniana. Ejemplo rob(14;21)(q10;q10).

Inversión: Se forma cuando un segmento cromosómico se rompe, se rota 180° y se une al mismo cromosoma. Es paracéntrica cuando el segmento involucrado en la inversión se encuentra en uno de los brazos por ejemplo 46,XY,inv(3)(p14p24). La inversión se llama pericéntrica cuando los dos puntos de ruptura implicados están situados en lados opuestos del centrómero y la unión invierte un segmento cromosómico que incluye el centrómero.

Inserción: Se produce por la delección de un fragmento de un cromosoma y se transfiere a una nueva posición en otro cromosoma, o en su homólogo. El segmento insertado puede situarse con su orientación original o invertido con respecto al centrómero. Ejemplo 46,XY,ins(2)(p13q31q34).

Cromosomas dicéntricos: son cromosomas que poseen dos centrómeros, es muy raro encontrarlos como anomalías constitutivas, ya que son inestables durante la segregación a menos que uno de los centrómeros se inactive o que la distancia intercentromérica sea muy corta y los dos centrómeros puedan segregarse hacia un mismo polo. Se han encontrado en las translocaciones Robertsonianas.

Cromosomas en anillo: Un anillo se forma por una ruptura en cada brazo de un cromosoma y reunión del segmento medio dando una estructura circular, los extremos se pierden o forman un fragmento acéntrico. Son frecuentes en mosaico. Ejemplo 46,XX,r(7)(p22q36).

Isocromosoma: Se originan por la división transversal del centrómero, lo que ocasiona la pérdida completa de un brazo y la duplicación del otro brazo originando un cromosoma en “espejo”, causa monosomía y trisomía parcial. Un ejemplo es el Síndrome de Turner con cariotipo 46,X,i(X)(q10q10).

Marcadores: Son cromosomas con morfología no identificada. Ejemplo 47,XX,+mar.

Dobles minutos (DM): se presentan como fragmentos muy pequeños y la mayoría de las veces en parejas. Son acéntricos, por lo que su segregación es irregular y el número es muy variable. En el caso más sencillo, representan deleciones intersticiales. Cuando los DM se detectan en procesos malignos, particularmente en tumores sólidos, pueden indicar amplificación oncogénica (Huret *et al.*, 2000).

1.4 Citogenética Molecular

Hacia principios de la década de 1980 se desarrollaron metodologías de hibridación *in situ* DNA-DNA con marcaje radiactivo. Un avance importante en el desarrollo de las técnicas de hibridación *in situ* fue la detección por métodos no radiactivos, utilizando técnicas basadas en la inmunofluorescencia. Hacia fines de los años 80 y principios de los 90 los diferentes laboratorios en el mundo comenzaron a utilizar métodos de hibridación *in situ* fluorescentes (Fluorescence *in situ* Hybridization, FISH) que aportan mayor precisión en la detección de alteraciones genéticas.

Las primeras técnicas utilizaban secuencias altamente repetidas organizadas en

“tándem”. Las diferencias significativas entre secuencias alfa-satélite de las regiones pericentroméricas de diferentes cromosomas, hicieron posible alcanzar una hibridación lo suficientemente específica para identificar a cada uno de los cromosomas. Sin embargo, las secuencias alfoides del 13 y 21, conservan un grado de homología demasiado alto como para poder ser diferenciadas entre sí.

El desarrollo de estas técnicas moleculares y su fusión con la citogenética clásica dieron origen a la citogenética molecular, esta área de la genética permite detectar e identificar rearrreglos crípticos que no pueden ser observados por las técnicas convencionales como el bandeo GTG de alta resolución (Bejjani and Shaffer, 2008).

1.4.1 Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH)

El método se basa en la desnaturalización (abrir la doble cadena de DNA con un método físico o químico) de una molécula de DNA muestra o problema y una molécula de DNA llamada sonda a la cual se le incorpora un fluorocromo. Estas monohebras de la sonda, encuentran su complementaria en las monohebras problema en condiciones de incubación adecuadas, lo que se define como hibridación (Fig.4)

Después se hacen lavados para eliminar la hibridación inespecífica y posteriormente se observan las sondas en el sitio en donde hubo hibridación con ayuda de un microscopio con fluorescencia. Cada vez que se realiza esta técnica, es necesario utilizar una sonda control para asegurar que se llevó a cabo la hibridación sin fallas.

INTRODUCCIÓN

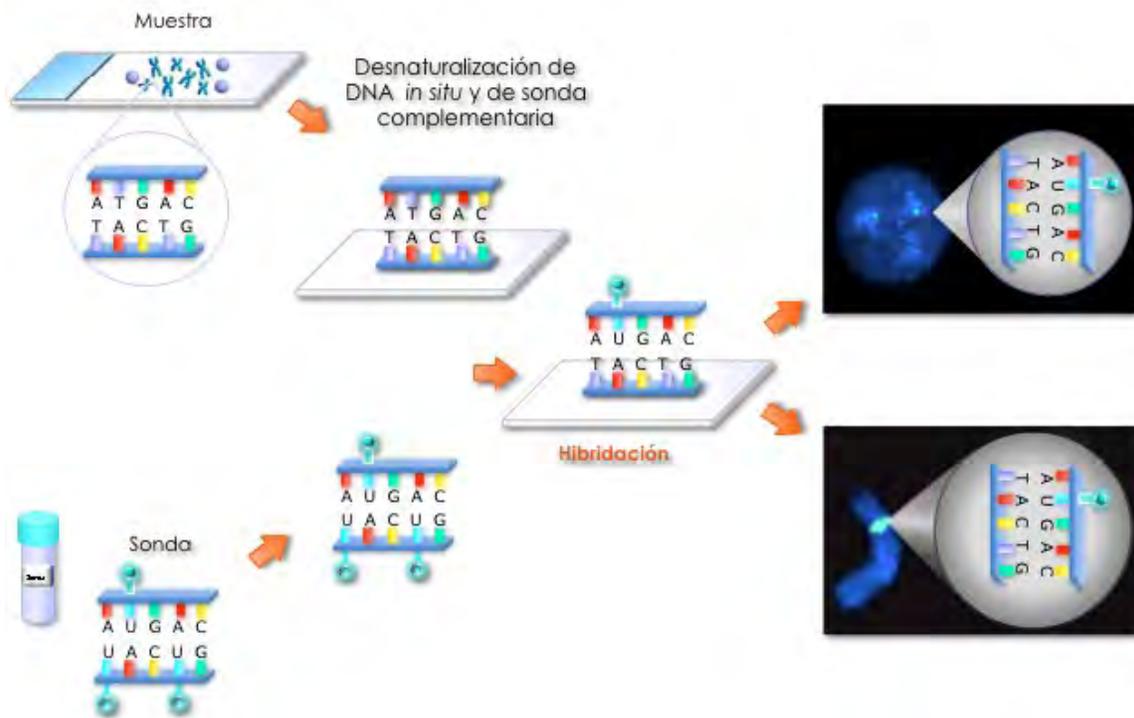


Figura 4. Principio de FISH, en núcleo en interfase se observa un segmento de DNA de la cromatina que hibrida con la sonda marcada, en un cromosoma, se muestra lo mismo.

Esta técnica se utiliza para detectar presencia o ausencia de genes, fragmentos de DNA y para identificar material genético que no ha podido ser determinado por técnicas de citogenética clásica, con una resolución de 200 a 0.5 Kb. Una ventaja que ofrece esta técnica es que se puede realizar en células sin cultivar, sobre núcleos en interfase (McNeil y Ried, 2000; Levsky y Singer, 2003; Speicher, 2005).

Los principales tipos de sondas se describen en la tabla 2 (McNeil y Ried, 2000; Levsky y Singer, 2003; Speicher, 2005).

Tabla 2. Tipos de sondas utilizadas en la técnica de FISH.

<p>SONDAS PARA UN LOCUS ESPECÍFICO</p>	<p>Estas sondas se utilizan para detectar genes específicos como: <i>ELN</i>, <i>LIS</i>, <i>TUPLE1</i>.</p> <p>Entre ellas están las sondas para regiones subtelo méricas.</p>	
<p>SONDAS PARA SECUENCIAS REPETIDAS</p>	<p>Las sondas para secuencias repetidas son de varios tipos: las que se encuentran en los centrómeros de los cromosomas, las DNA β-satélite para cromosomas acrocéntricos, para regiones centroméricas α-satelites, para telómeros y para heterocromatina de Yq12.</p>	
<p>SONDAS PARA TINCIÓN COMPLETA</p>	<p>Son colecciones de sondas de secuencia única, cada una de ellas hibrida a lo largo de un cromosoma y lo tiñen completamente. No se utiliza en interfase para diagnóstico.</p>	

INTRODUCCIÓN

	En metafase se utilizan para detectar: duplicaciones, translocaciones, anillos cromosómicos y marcadores cromosómicos. También se han utilizado para comparar genomas de diferentes especies.	
--	---	--

1.4.2 FISH en Metafase

Además de identificar microdeleciones y microduplicaciones sobre los cromosomas, se utiliza para identificar material extra de origen desconocido, cromosomas marcadores y rearrreglos cromosómico complejos (fig.5) (McNeil y Ried, 2000; Levsky y Singer, 2003; Speicher, 2005).

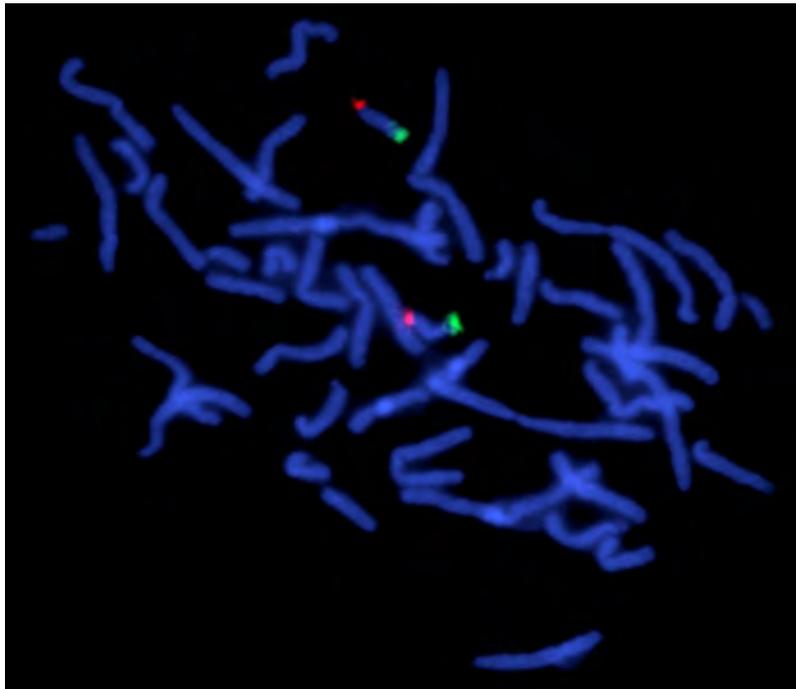


Figura 5. Metafase que muestra ambos cromosomas 20 normales, las sondas para las regiones subtelo méricas se presentan en color verde para el brazo “p” y en rojo para el brazo “q”.

1.4.3 FISH en Interfase

La principal ventaja de esta técnica es que no requiere de cultivo celular, por tanto el resultado se obtiene en menos de 24 horas, además de que se pueden analizar miles de células ya que no se requiere de aquellas que entraron a división y llegaron a metafase. Se puede realizar en cualquier tipo de tejido como aquellos incluidos en parafina (fig.6) (McNeil y Ried, 2000; Levsky y Singer, 2003; Speicher, 2005).

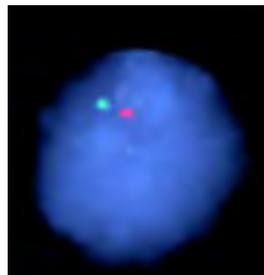


Figura 6. Célula en interfase de sangre periférica con sondas para las regiones subtelo méricas para el brazo “p” en color verde y en rojo para el brazo “q”. Al haber solo una señal para cada región indica monosomía.

2. Cromosomas en anillo

2.1 Generalidades de los anillos y su influencia sobre el fenotipo

Los cromosomas en anillo son una anomalía cromosómica estructural, la frecuencia de aparición reportada es de 1 en 30,000 a 1 en 60,000 casos presentados en estudios realizados en neonatos (Conlin *et al.*, 2011). La presencia de un anillo en un individuo puede ser *de novo* (99% de los casos) o heredado

(Keagle y Gersen, 1999; McKinlag y Sutherland, 2004). Se han reportado anillos de todos los cromosomas (Herva *et al.*, 1977; Knijnenburg *et al.*, 2007), los más comunes son los anillos de los cromosomas 13 y 18 (Keagle y Gersen, 1999).

El primer reporte de síndrome del cromosoma en anillo fue descrito por Cote *et al.*, 1981, en ese estudio se observó un fenotipo recurrente en pacientes donde uno de los 46 cromosomas es un anillo autosómico sin delección aparente.

Se ha observado que el fenotipo en pacientes con el síndrome del anillo autosómico varía considerablemente, ya que se observa desde retraso mental moderado a severo con malformaciones congénitas y retraso en el crecimiento hasta individuos aparentemente normales y fértiles.

Las causas de la variación fenotípica en los pacientes con anillo autosómico son:

- (1) El tamaño de la delección en cada brazo, ya que un individuo con una delección parcial en un anillo cromosómico tendrá características clínicas asociadas con una monosomía parcial (Keagle y Gersen, 1999).
- (2) Inestabilidad del anillo. Los anillos sufren cambios estructurales o se puede perder parte de su material genético, debido a la segregación durante la división celular o por intercambio de cromátides hermanas durante la mitosis y como resultado de estos procesos las células hijas pueden tener aneuploidías totales o parciales. Las líneas celulares originadas por este mecanismo pueden no ser viables o sobrevivir contribuyendo de manera desfavorable en el fenotipo, lo que se denomina como mosaicismo dinámico.
- (3) El porcentaje de células que tienen el anillo cuando este se presenta en mosaico (Conlin *et al.*, 2011) y la proporción de este en los diferentes tejidos (Kosztolanyi, 2009). Un mosaicismo verdadero se define como dos o más líneas celulares que derivan de un cigoto (Hall, 2005; Conlin *et al.*, 2011), a diferencia del mosaicismo dinámico, donde las diferentes líneas que están presentes en el individuo son originadas a partir de la línea celular que tiene el anillo.
- (4) la viabilidad de las líneas anormales que se generen por la inestabilidad del anillo, ya que la generación continua de estas células afecta el desarrollo del individuo.

Hay dos tipos de anillo asociados a fenotipo normal o a discapacidad intelectual moderada, retraso en el crecimiento y ausencia de anormalidades mayores:

(1) el anillo con una longitud casi completa que reemplaza a un homólogo normal con un cariotipo 46,XX,r(13)

(2) un anillo muy pequeño que contenga en su mayoría cromatina pericentromérica y que exista como un cromosoma supernumerario con un cariotipo 47,XX,+r(13). Los individuos con este tipo de anillos pueden ser fértiles (McKinlag y Sutherland, 2004). Existen anillos compuestos de uno o varios cromosomas y pueden presentar más de un centrómero. Ejemplo 46,XX,der(1)r(1;3)(p36.1q23;q21q27), sin embargo no discutiremos estos rearrreglos complejos.

Se pueden observar anillos de cromosomas sexuales sin embargo no presentan las mismas características que los anillos autosómicos.

2.2 Mecanismos de formación de un cromosoma en anillo

La formación de los anillos cromosómicos se debe a rupturas en ambos brazos de un cromosoma y la fusión de los extremos del segmento que contiene el centrómero, esta fusión puede producir inversiones, deleciones o duplicaciones en los telómeros y regiones subtelo méricas (Conlin *et al.*, 2011). Los dos mecanismos clásicos ocurren de la siguiente forma:

- a) Por una ruptura intersticial en ambos brazos del cromosoma, los extremos se pierden y el fragmento que tiene el centrómero se une en sus extremos (fig.7a).
- b) Por la fusión de los telómeros de un cromosoma o de dos cromátides hermanas sin la aparente perdida de material genético (fig.7b) (Atkins *et al.*, 1972; Inue *et al.*, 1997; Rossi *et al.*, 2008).

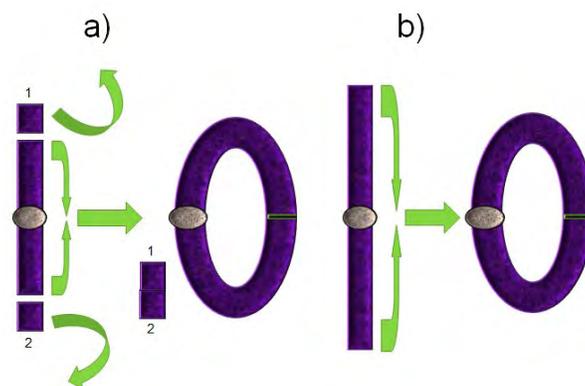


Figura 7. Formación de un anillo cromosómico. a) por deleción intersticial en ambos brazos, fusión de puntos de ruptura, de esto resulta el anillo y la formación de un segmento acéntrico. b) fusión de telómeros inestables. Adaptado de McKinlag y Sutherland, 2004.

La división transversal del centrómero combinada con una unión tipo “U” por una ruptura y unión de los extremos de las cromátides hermanas. (fig.8) (Callen *et al.*, 1991).

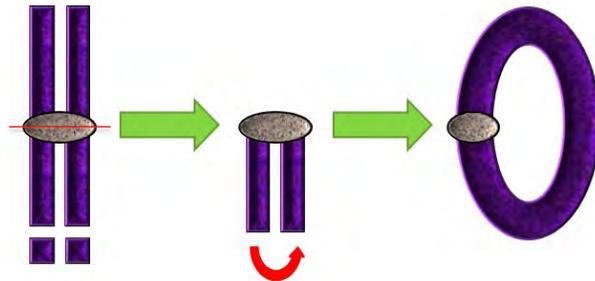


Figura 8. Formación de un anillo cromosómico por división transversal del centrómero (línea roja) y ruptura y unión combinada para formar una figura tipo “U”; la flecha roja indica la unión de los extremos (Adaptado de van der Veken *et al.*, 2010).

No obstante, existen reportes en la literatura donde algunos autores proponen diferentes mecanismos complejos de formación para anillos cromosómicos que presentan duplicación invertida asociada a deleción (McGinniss *et al.*, 1992; Knijnenburg *et al.*, 2007; Rossi *et al.*, 2008).

2.3 Inestabilidad de los anillos cromosómicos

Una característica importante de los anillos es su inestabilidad debido a la pérdida de linealidad del cromosoma, que trae como consecuencia alteraciones en la replicación, recombinación, segregación e intercambio de cromátides hermanas. Otra característica citogenética que contribuye a la severidad de las alteraciones fenotípicas es la disrupción mecánica del anillo a lo largo de las divisiones celulares

En la figura 9 se representa un anillo cromosómico de cromátide sencilla que replica durante la interfase, en este pueden ocurrir intercambios de cromátides hermanas (ICH). Estos intercambios favorecen la formación de anillos dobles, dicéntricos o concatenados. Los anillos con centrómeros múltiples y los anillos concatenados pueden estar orientados hacia polos opuestos durante la división

celular, lo que origina la ruptura del anillo cromosómico en anafase con la subsecuente generación de nuevos anillos con duplicaciones o deleciones y fragmentos, si los productos, anillos o fragmentos, no tienen centrómero, se pierden y pueden no observarse durante el análisis, incluso el anillo cromosómico se puede perder completamente y generar la monosomía del cromosoma. Estos eventos pueden generar varias "líneas celulares" por mosaicismo dinámico. Al no haber ICH, la segregación se resuelve como en la parte izquierda de esta figura (McKinlag y Sutherland, 2004).

La relación entre el tamaño del anillo y su estabilidad aún no es clara, en muchos casos, anillos pequeños poseen mayor estabilidad que los grandes ya que los anillos de menor tamaño tienen menos probabilidad de intercambiar cromátides hermanas (Pinto *et al.*, 2005).

INTRODUCCIÓN

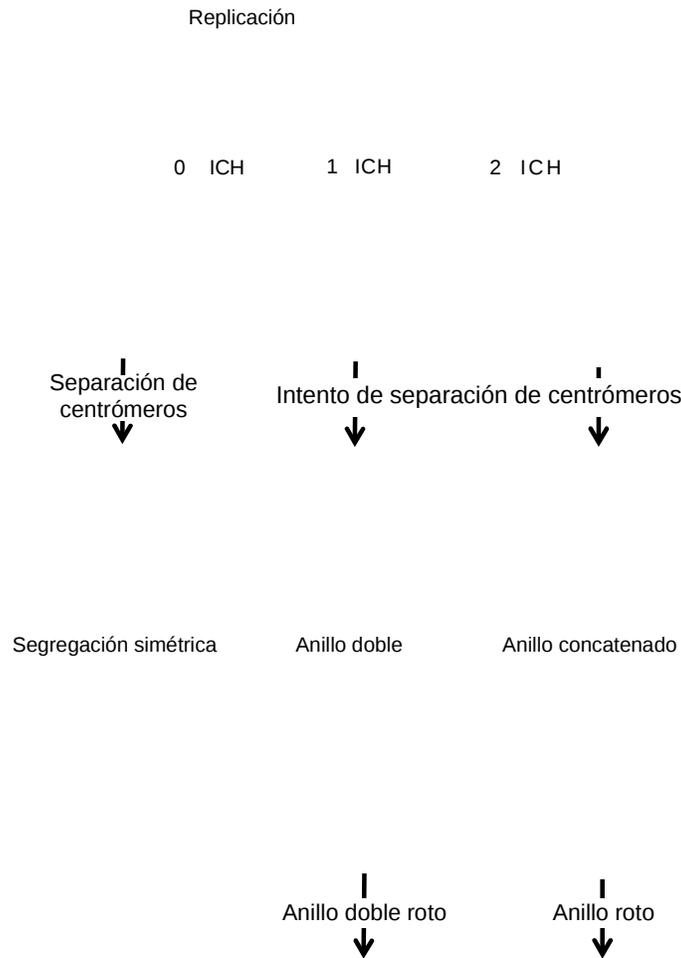


Figura 9. Replicación y segregación de un anillo cromosómico. Sin ICH (izquierda), un ICH que origina un anillo doble (centro) y dos ICH que originan anillos concatenados (derecha). Modificado de McKinlag y Sutherland, 2004.

2.4 Segregación de los anillos en meiosis

En la gametogénesis de un paciente con anillo cromosómico la segregación es 1:1 por disyunción simétrica. Así la mitad tendrá cariotipo normal y la otra mitad presentaría el anillo (fig. 10). Como se mencionó anteriormente existen razones para considerar que el anillo puede tener un incremento de riesgo por no

disyunción que resulta en una segregación 2:0 (fig. 10) (McKinlag y Sutherland, 2004).

Si ocurre este evento con respecto a los cromosomas 13, 18 y 21 se podría formar un individuo con una trisomía por anillo supernumerario. En la mayoría de los casos los anillos se transmiten por vía materna, ya que se propone que la espermatogénesis se puede ver comprometida por la presencia del anillo ocasionando infertilidad.

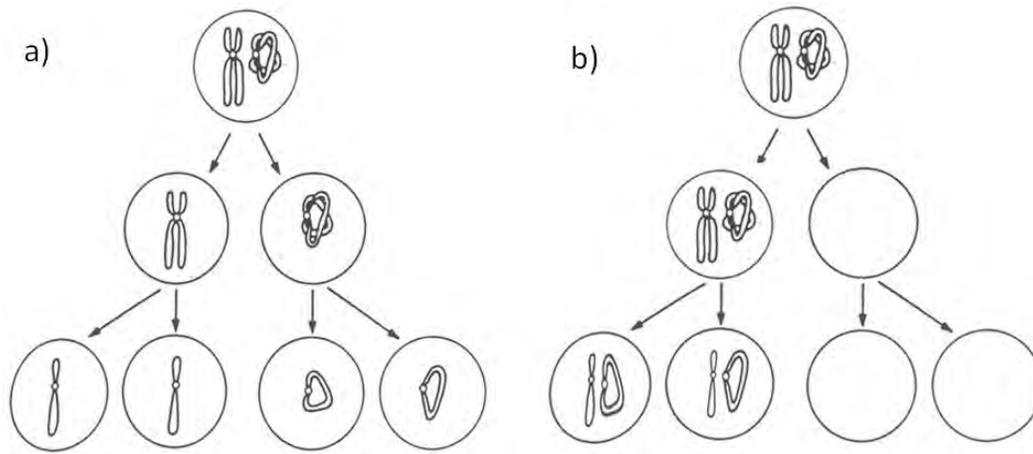


Figura 10. Probabilidades de segregación para anillos cromosómicos. a) meiosis con segregación simétrica. b) meiosis con segregación 2:0. Modificado de McKinlag y Sutherland, 2004.

3. Síndrome del cromosoma 20 en anillo [S(r(20))]

El S(r(20)) fue descrito por primera vez por Atkins y colaboradores en 1972, en un paciente con problemas de desarrollo, crisis epilépticas y microcefalia. Los pacientes generalmente presentan el anillo cromosómico en mosaico con líneas anormales en porcentajes variables (Canevini *et al.*, 1998; Nishiwaki *et al.*, 2005; Giardino *et al.*, 2010), de acuerdo a un trabajo reportado por González y colaboradores (2004) un individuo se considera severamente afectado cuando presenta signos característicos de este síndrome y un porcentaje de mosaicismo mayor al 50%, generalmente un bajo porcentaje de mosaico origina fenotipo leve. Un individuo con fenotipo normal y con bajo porcentaje de mosaicismo puede tener hijos afectados con el anillo cromosómico en alto porcentaje (Moore y Best, 2001).

3.1 Características fenotípicas del S(r(20))

Más de 100 casos han sido reportados a nivel mundial (Daber *et al.*, 2012), la epilepsia es una característica constante de este síndrome e inicia típicamente a edad temprana y en la gran mayoría de los casos es intratable. Se ha reportado que las convulsiones inician entre el primer año de vida hasta los 17 años de edad. Las crisis convulsivas son parciales complejas regularmente y son reportadas como alteraciones de conciencia con mirada fija, automatismo oral, comportamientos automáticos inespecíficos, síntomas motores focales y/o giros de la cabeza. Algunos pacientes presentan periodos de temor intenso y a veces estados prolongados de confusión que pueden durar minutos u horas, esto se define como estatus no epiléptico. Las convulsiones generalizadas tónico clónicas han sido reportadas en pocos estudios. (Back *et al.*, 1989; Canevini *et al.*, 1998; Hosain, 2009).

3.1.1 Aprendizaje y Comportamiento

El aprendizaje es generalmente normal antes de la aparición de las crisis epilepticas, sin embargo, existe la posibilidad de deterioro mental si las convulsiones son frecuentes. Algunos de estos individuos pueden tener aprendizaje normal a pesar de tener períodos de epilepsia mal controlada mientras que otros pueden tener dificultades profundas de aprendizaje y necesitar ayuda en todos los aspectos de la vida cotidiana. Los problemas de conducta pueden variar siendo el más leve poca concentración hasta dificultades de atención con altos niveles de actividad. Las dificultades en el aprendizaje y comportamiento varían con el tiempo y pueden empeorar con el incremento de las convulsiones. (González *et al.*, 2004; Hosain, 2009).

3.1.2 Neuroclínica

Las malformaciones mayores o menores incluyendo las dismorfias faciales son poco frecuentes o ausentes, La falta de rasgos dismórficos en pacientes con epilepsia refractaria y la omisión de estudios citogenéticos conduce a un diagnóstico tardío. Se han publicado algunos casos de S(r(20)) con rasgos dismórficos tales como microcefalia, hipotonía muscular, plagiocefalia, oclusiones dentales anormales, micrognatia, orejas en forma de coliflor y fisuras palpebrales

ascendentes o descendentes. Se han reportado en pocos casos anomalías renales y cardíacas (Ascurra *et al.*, 2008; Hosain, 2009).

No existen rasgos electroencefalográficos característicos para el S(r(20)) que lo diferencien de otros síndromes con epilepsia refractaria. Los hallazgos clínicos y electroencefalográficos en pacientes con S(r(20)) puede ser confundidos con el síndrome de Lennox-Gastaut (SLG), ya que este se caracteriza por convulsiones refractarias, sin embargo, en pacientes con S(r(20)) raramente se observan convulsiones tónicas y atónicas que son propias del SLG. Así mismo, pueden compartir similitudes con el síndrome de Landau-Kleffner (SLK) que es otra encefalopatía epiléptica, por tanto, el diagnóstico no puede ser obtenido o supuesto únicamente con un electroencefalograma (EEG). Además, en pacientes con estatus epiléptico no convulsivo, los patrones de EEG alterados pueden estar combinados con grandes porciones de actividad normal en el EEG, lo que hace más difícil el diagnóstico. (García *et al.*, 2000; Hosain, 2009).

Aunque existen algunos rasgos clínicos característicos y de EEG para el diagnóstico del S(r(20)) reportados en la literatura, el diagnóstico definitivo requiere de análisis citogenético.

3.2 Manejo clínico

Las convulsiones en este síndrome son difíciles de controlar y hasta ahora no se han hecho estudios comparativos entre los antiepilépticos de nueva generación y los usados comúnmente. Actualmente ningún antiepiléptico parece tener mejores efectos que otro, por tanto los pacientes están expuestos con frecuencia a múltiples medicamentos antiepilépticos.

La epilepsia en el síndrome r(20) no es susceptible para cirugía de resección, ya que pocos pacientes han sido sometidos a la cirugía sin beneficio aparente. La estimulación del nervio vago es un tratamiento que de acuerdo a lo reportado en la literatura ha dado un buen resultado en pocos casos. No hay informes publicados sobre el uso de la dieta cetogénica en estos pacientes, sin embargo, su eficacia y la seguridad está bien establecida en el SLG.

El pronóstico a largo plazo del síndrome r(20) no se encuentra bien documentado, si bien no es letal, al igual que en otras epilepsias refractarias existe riesgo de complicaciones por la epilepsia, incluyendo el estatus epiléptico y la muerte súbita. El mejor manejo de esta entidad es tratar de controlar en la medida que sea posible las convulsiones (Hosain, 2009).

3.3 Etiología

Se ha descrito que la deleción en el brazo largo del cromosoma 20 (región 20q13) es la que da origen a la epilepsia (Stewart *et al.*, 1979; Canevini *et al.*, 1998; Conlin *et al.*, 2011). Hasta ahora se han descrito dos entidades relacionados con deleción en 20q13:

- a) La epilepsia nocturna del lóbulo frontal autosómica dominante
- b) Las convulsiones neonatales familiares benignas

Los genes candidatos que han sido descritos como los responsables de las manifestaciones clínicas del S(r(20)) se encuentran en 20p13 y 20q13.33 (fig.11) (Koeptl *et al.*, 2008; Traylor *et al.*, 2010; Conlin *et al.*, 2011). El mecanismo de acción para cada gen se resume en la tabla 3 (www.genecards.org/; ghr.nlm.nih.gov/).

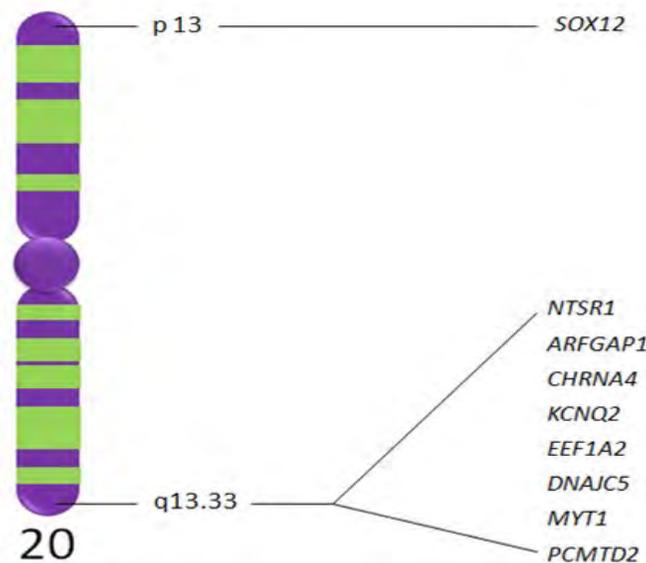


Figura 11. Localización de los genes descritos como posibles responsables de las características clínicas del S(r(20)).

Tabla 3. Genes candidatos de las características clínicas del S(r(20)) y su función encontrada hasta el momento.

GEN	FUNCIÓN
CHRNA4 Receptor colinérgico nicotínico subunidad α4	Este gen codifica la subunidad α4 del receptor colinérgico nicotínico, el cual fija acetilcolina que ocasiona la apertura de un canal conductor iónico para permitir la entrada de iones calcio, sodio y potasio a las neuronas. Si estos iones entran en exceso generan sobreexcitación neuronal lo cual se asocia a convulsiones.
KCNQ2 Canal de potasio disparador de voltaje subfamilia KQT miembro 2	Este gen codifica una de las subunidades estructurales de un canal iónico de potasio llamado canal M. Este es un canal de activación y desactivación lentas que desempeñan un papel importante en la excitación neuronal.
ARFGAP1 Factor de ribosilación de	La proteína codificada por este gen activa una GTPasa que se asocia con el aparato de Golgi e interactúa con el factor 1 de ribosilación de ADP (ARF1). Esta proteína promueve la hidrólisis de ARF1 asociado a GTP y es requerida para la disociación de la capa proteica que se encuentra en las

INTRODUCCIÓN

ADP asociado con la proteína 1 activadora de GTPasa	membranas y vesículas del aparato de Golgi. Dicha disociación es requerida para la fusión de las vesículas con sus cisternas. La sobreexpresión induce la redistribución del aparato de Golgi al retículo endoplasmático donde ARF1 es inactivado.
MYT1	
Factor 1 de transcripción de mielina	La proteína codificada por este gen es miembro de una familia neuronal específica, se une a las regiones promotoras de proteolípidos del sistema nervioso central y juega un papel importante en el desarrollo de las neuronas y oligodendrocitos.
SOX12	
Región Y determinante del sexo caja 12	La proteína codificada por este gen es un factor de transcripción que pertenece a la familia de proteínas SOX. Esta proteína se expresa en diferentes tejidos lo cual sugiere que actúa en el mantenimiento y diferenciación de varios tipos de células.
DNAJC5	
Homólogo DNAJ subfamilia C miembro 5	Este gen es miembro de la familia de proteínas J. Estas participan en muchos procesos celulares por regulación de la actividad de ATPasa. La proteína codificada por este gen interviene en el tráfico y plegamiento proteico. Se ha demostrado que tiene propiedades antineurodegenerativas, está relacionada con la fibrosis quística y la enfermedad de Huntington. Se ha propuesto que juega un papel importante en la función presináptica. Puede estar involucrada en la liberación de neurotransmisores dependientes de calcio hacia terminales nerviosas.
EEF1A2	
Factor 1 de elongación subunidad α2	Este gen codifica una isoforma de la subunidad α del factor 1 de elongación que se encarga de la entrega de aminoacil-tRNAs al ribosoma durante la síntesis de proteínas. La isoforma α2 es expresada en el cerebro, corazón y músculo esquelético. La isoforma α1 es expresada en cerebro, placenta, pulmón, hígado, riñón y páncreas.
NTSR1	
Receptor 1 de neurotensina	El receptor 1 de neurotensina pertenece a una superfamilia de receptores asociados a proteínas G. Este gen regula diversas funciones de la neurotensina como la hipotensión, hiperglucemia, hipotermia y la regulación de la secreción intestinal.

El cromosoma 20 contiene dos genes (*CHRNA4* y *KCNQ2*) que están asociados con epilepsia, lo que conllevó a suponer que estos genes podrían ser candidatos para las crisis epilépticas en S(r(20)). Aunque las mutaciones en *CHRNA4* se han asociado con la epilepsia autosómica dominante nocturna del lóbulo frontal, las familias con deleciones de este gen no manifiestan las características fenotípicas relacionadas con este síndrome. Las deleciones del gen *KCNQ2* han sido reportadas previamente en familias con convulsiones familiares neonatales

benignas, sin embargo la ausencia del inicio de convulsiones neonatales en la mayoría de los pacientes con S(r(20)) indica que estas deleciones no se asocian con la aparición de estas crisis.

Hay varios genes localizados en la región subtelomérica del cromosoma 20 que están involucrados en el desarrollo y función cerebral, incluyendo *SOX12*, *MYT1*, *DNAJC5*, *EEF1A2* y *NTSR1*. Los pacientes con deleciones subteloméricas del cromosoma 20 no siempre se presentan con convulsiones y existen reportes de pacientes con deleciones que involucran estos genes, sin embargo la haploinsuficiencia de estos parece que no juega un papel relevante en esta etiología (Conlin *et al.*, 2011).

Estudios previos en cromosomas en anillo han demostrado que los genes cerca de la fusión de este pueden alterar su expresión, probablemente debido a la pérdida o ganancia de elementos de regulación transcripcional en *cis* (Conlin *et al.*, 2011). El silenciamiento a través de un efecto de posición del telómero ha sido demostrado y se ha sugerido como una hipótesis para varias patologías, por tanto, es posible que los genes cerca el punto de ruptura y fusión del anillo en los pacientes con esta entidad, puedan haber alterado su expresión debido a este efecto (Conlin *et al.*, 2011). Esto puede explicar por qué los pacientes con deleciones que no están asociados con un anillo no se presentan con el mismo fenotipo que los pacientes con S(r(20)). Son necesarios otros estudios sobre la transcripción de genes cercanos a los repetidos teloméricos de los anillos que pueden ayudar a determinar si el efecto de posición en el telómeros juega un papel en esta etiología.

3.4 Casos clínicos en México

INTRODUCCIÓN

Solo hay un caso reportado en la literatura, fue descrito por García y colaboradores en el 2000, se trata de un paciente de 10 años y 8 meses de edad con desarrollo psicomotor normal, dismorfias menores, convulsiones tónico clónicas y problemas de comportamiento. Se le realizó cariotipo en sangre periférica, el análisis citogenético mostró que de 100 células analizadas 95 presentan el cromosoma 20 en anillo, dos presentan monosomía, una representa la línea normal, se observó un anillo doble y un anillo pequeño. Mediante FISH detectaron la perdida de las secuencias teloméricas en el anillo cromosómico.

4. Justificación

El síndrome del cromosoma 20 en anillo es una entidad genética poco estudiada que se asocia a epilepsia resistente a tratamiento, con expresión variable de dismorfias y discapacidad intelectual.

Para llegar al diagnóstico definitivo de esta entidad, es necesario realizar cariotipo, ya que el tipo de epilepsia se comparte con otros síndromes, el estudio detallado de las regiones cromosómicas que se pierden al formarse el anillo podría permitir la correlación de los genes involucrados y el fenotipo clínico.

Con la técnica de citogenética clásica de alta resolución, se observan alteraciones de un tamaño no menor de 5Mb, mientras que con la técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) proporciona una resolución de hasta 0.5Kb lo cual nos permite complementar el análisis de la estructura del anillo y delimitar el material genético que se encuentra presente o ausente que podría estar asociado al fenotipo.

Este trabajo aportará información sobre el S(r(20)) ya que en población mexicana hasta ahora solo existe un reporte en la literatura, además el conocer la etiología de este padecimiento permite realizar un diagnóstico, asesoramiento, tratamiento y seguimiento adecuados.

5. Objetivos

5.1 Objetivo General

Establecer la correlación de las características clínicas de la paciente con lo observado en las técnicas de citogenética clásica y molecular.

5.2 Objetivos Particulares

Utilizar la técnica de FISH como herramienta de diagnóstico como apoyo a las técnicas de citogenética clásica.

Identificar mediante la técnica de FISH el material genético extra o ausente que pueda influir en el fenotipo.

6. Métodos

6.1 Caso clínico

Se estudió una paciente de 7 años de edad que acudió a la consulta del Servicio de Genética, es la segunda hija de padres sanos no consanguíneos, al nacimiento peso 3.12kg y midió 51cm. A la exploración la paciente no presentó dismorfias faciales, ni malformaciones congénitas mayores, presentó desarrollo normal desde el nacimiento hasta los cuatro años de edad, momento en el que inicia con crisis parciales complejas. A los 6 años presenta retraso en el desarrollo psicomotor, en dos ocasiones estatus epiléptico mioclónico generalizado y es llevada a coma barbitúrico, se trató con metilprednisolona, corticotropina, dieta cetogénica, múltiples antiepilépticos y fue refractaria a todos los tratamientos, actualmente utiliza un estimulador del nervio vago.

6.2 Siembra

La muestra de sangre periférica de la paciente y sus padres fue obtenida en tubo con heparina de sodio, se sembró en campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad en tubos de 15ml estériles que contenían 5ml medio de cultivo RPMI 1640 (GIBCO®), se agregaron 100µl de fitohemaglutinina M FORM (GIBCO®) y se agregaron 10 gotas de sangre. Se colocaron en una estufa (NAPCO®) a 37°C por 72 h.

6.3 Cosecha

Después de 72 hrs de incubación se agregaron 25µl de colchicina 0.02% (Sigma®) para detener la división celular en metafase, se homogenizaron los tubos y se incubaron 30 min a 37°C, posterior a este tiempo se centrifugaron los tubos 10 min a 400 g. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en vortex el botón celular. Se agregó a cada tubo 10ml solución hipotónica KCl 0.075M a 37°C, se homogenizaron y se colocaron en la estufa a 37°C por 30 min. Posteriormente se agregó 1ml de fijador Carnoy (metanol y ácido acético 3:1 J.T Baker®) fresco y frío, se homogenizaron los tubos y se centrifugaron 10 min a 400 g. Se decantó el sobrenadante, se resuspendió el botón celular en 10 ml del fijador en agitación constante. A continuación se centrifugó en las mismas condiciones y se resuspendió en fijador tantas veces como fue necesario hasta obtener el sobrenadante transparente el paquete celular blanco.

6.4 Elaboración de láminas

Para realizar las laminillas se resuspendió el paquete celular en 0.5 ml de fijador y se gotearon 30µl de la muestra sobre una laminilla limpia y rotulada con el número de caso. Se observaron las láminas en un microscopio de contraste de fases para su evaluación. Las láminas seleccionadas se maduraron a 37°C por 5 días.

6.5 Técnica de bandas G

En un vaso coplin con 50ml solución amortiguadora de fosfatos ph 7.2 (Gurr) con 0.005g de tripsina (Gibco®) se sumergió la laminilla de 8 a 10 segundos, se transfirió la laminilla a otro coplin con 50ml de solución Gurr ph 7.2 para la posterior tinción. Se tiñó la laminilla en una solución Wright (40ml de solución de fosfatos ph 6.8 (Gibco®) y 10ml de Wright (Merck®)) 1 min y en una Solución Giemsa (40ml de la solución de fosfatos ph 6.8 (Gibco®) y 10ml de colorante Giemsa (Merck®)) 2 min. Posteriormente la laminilla se enjuagó con agua, se dejó secar y se montó con resina (Entellan®). Se analizó en un microscopio de campo claro.

6.6 Obtención de muestra de mucosa bucal

La paciente después de enjuagarse la boca, con un abate lenguas se raspo el interior de la mejilla, los restos celulares se dejaron caer en un tubo de 15ml con solución fisiológica, se etiquetó y el tubo se centrifugó por 5 minutos a 600g. Se retiró el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 3ml de Tripsina/EDTA (Gibco®) y se incubó a 37°C por 30min, transcurrido este tiempo se centrifugó en las mismas condiciones, se retiró el sobrenadante y se resuspendió con 8ml de solución hipotónica KCl 0.075M (J.T Baker®) y se mantuvo a 37°C durante 30 minutos, al cabo de los cuales se centrifugó nuevamente, se deshechó el sobrenadante y se resuspendió en fijador Carnoy (metanol y ácido acético 3:1 J.T Baker®) fresco y frio y se goteó en un portaobjetos limpio.

6.7 Técnica de FISH

Se maduró la laminilla con el material celular en una solución 2X SSC (5ml de 20X SSC (Vysis™) y 45ml de agua bidestilada) a 37°C por 30 minutos. En seguida se

deshidrató en series de etanol 70%, 85% y 100% y se dejó secar. Se seleccionó el área para colocar la sonda al microscopio, se colocaron 5µl en ésta de la mezcla #15 de ToTelVysion™, que contenía las sondas 20PTEL18 (D20S1157) en color verde para la región subtelomérica del brazo corto del cromosoma 20 y 20QTEL14 en color naranja para el subtelómero del brazo q y se puso el cubreobjetos limpio de 22 x 22 mm y se sellaron con cemento plástico (IRIS®). Esta laminilla se colocó en el HyBrite para la codesnaturalización del material celular y la sonda por 2 min a 71°C y se dejó en cámara húmeda protegida de la luz a 37°C por 16 a 20 horas.

6.8 Lavados Post Hibridación

Al día siguiente, se removió con cuidado el sellador y se retiró el cubreobjetos, la laminilla se lavó en 50ml de SSC 0.4X/NP-40 al 0.3% (Vysis Inc™) a 73°C por 2 min y posteriormente en 50ml de SSC 2X/NP-40 al 0.1% a temperatura ambiente en un tiempo no mayor a un 1 min. Se dejó secar la laminilla al aire en la oscuridad y después se agregaron 8µl de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol)/Antifade (VECTOR™), se colocó un cubreobjetos de 22 x 22 mm y se selló con cemento plástico (IRIS®) para su análisis en un microscopio con epifluorescencia (BX60 Olympus™), con los filtros (Chroma™).

6.9 Criterios de Análisis para FISH

Para el análisis de las muestras se siguieron los siguientes lineamientos:

1. Se excluyeron núcleos sobrelapados y con bordes indefinidos.
2. De acuerdo con los criterios de Martín & Rademaker (1995) dos señales de un mismo color separadas por una distancia menor al diámetro de una de las señales fue registrada como una señal, esto indica que la sonda pudo romperse.
3. Se consideraron como dos señales de una misma sonda (disomía) sólo cuando los dominios de las señales eran de igual intensidad y estaban separadas por una distancia mínima igual o mayor al diámetro de la señal.
4. La ausencia de señal de una sonda fue considerada como monosomía para

MÉTODOS

ese cromosoma cuando la sonda control tenía dos señales (diploide).

5. Una célula fue considerada diploide cuando tenía dos señales de cada una de las sondas utilizadas.

7. Resultados

7.1 Clínica

En el siguiente cuadro comparativo se reportan las características clínicas del paciente con el S(r(20)) y las reportadas en la literatura (tabla 4).

Tabla 4. Cuadro comparativo del cuadro clínico del paciente con el cuadro clínico del S(r(20)).

Características fenotípicas reportadas en el S(r(20))*	PACIENTE
Microcefalia	-
Hipotonía muscular	-
Plagiocefalia	-
Oclusiones dentales anormales	-
Micrognatia	-
Orejas en forma de coliflor	-
Anomalías renales	-
Anomalías cardiacas	-
Retraso en el desarrollo	+
Discapacidad intelectual	-
Convulsiones	+
Trastornos conductuales	-
Mioclonías	+
Epilepsia refractaria a tratamientos	+

*(Back *et al.*, 1989; García *et al.*, 2000; Hosain 2009)

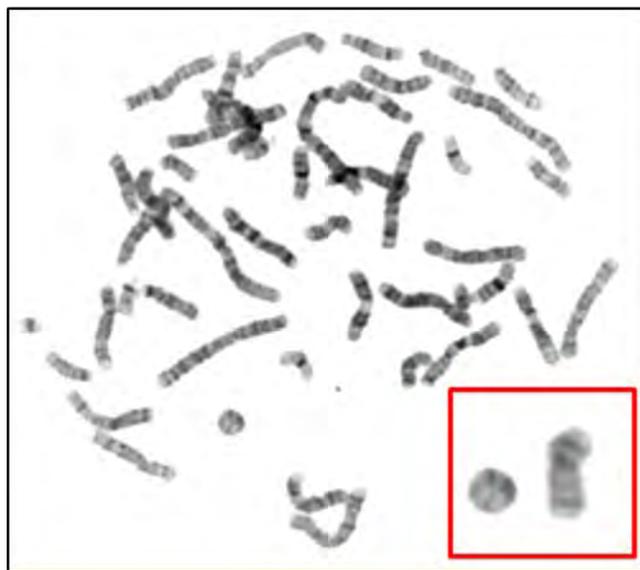
7.2 Citogenética

En las 25 metafases analizadas con bandas G se encontraron 20 (80%) con el cromosoma 20 en anillo, 2 (8%) presentaron monosomía y 3 (12%) fueron normales.

El resultado se reportó de acuerdo a los lineamientos del International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) (Shaffer *et al.*, 2009):

mos 46,XX,r(20)(p13q13.3)[20]/45,XX,-20[2]/46,XX[3]

En la siguiente figura se presenta la imagen de una metafase con un cromosoma 20 en anillo.

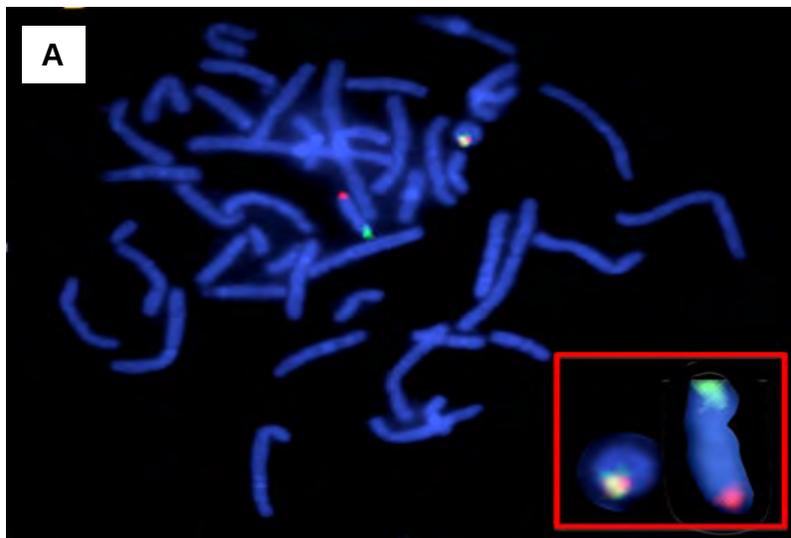


RESULTADOS

Figura 12. Metafase que muestra un cromosoma 20 normal y su homólogo en anillo.

El análisis por FISH en 100 metafases de sangre periférica con las sondas subtelo méricas para el cromosoma 20 reveló que el 81% presenta el cromosoma 20 en anillo, 8% presenta monosomía, 10% representan la línea normal y se observó un anillo doble (fig 13B), estas dos últimas líneas son derivadas de la línea con anillo por mosaicismo dinámico. El doble anillo no fue incluido en el reporte ya que no cumple con los criterios para ser considerado una línea celular (Shaffer *et al.*, 2009). En todas las metafases analizadas se encontraron presentes las secuencias subtelo méricas, incluyendo el anillo como se muestra en las figuras 13 A, B y C.

ish 46,XX,r(20)(D20S1157+,20QTEL14+)[81]/ 45,XX,-20(D20S1157-,20QTEL14-)
[8]/46,XX(D20S1157,20QTEL14)x2[10]



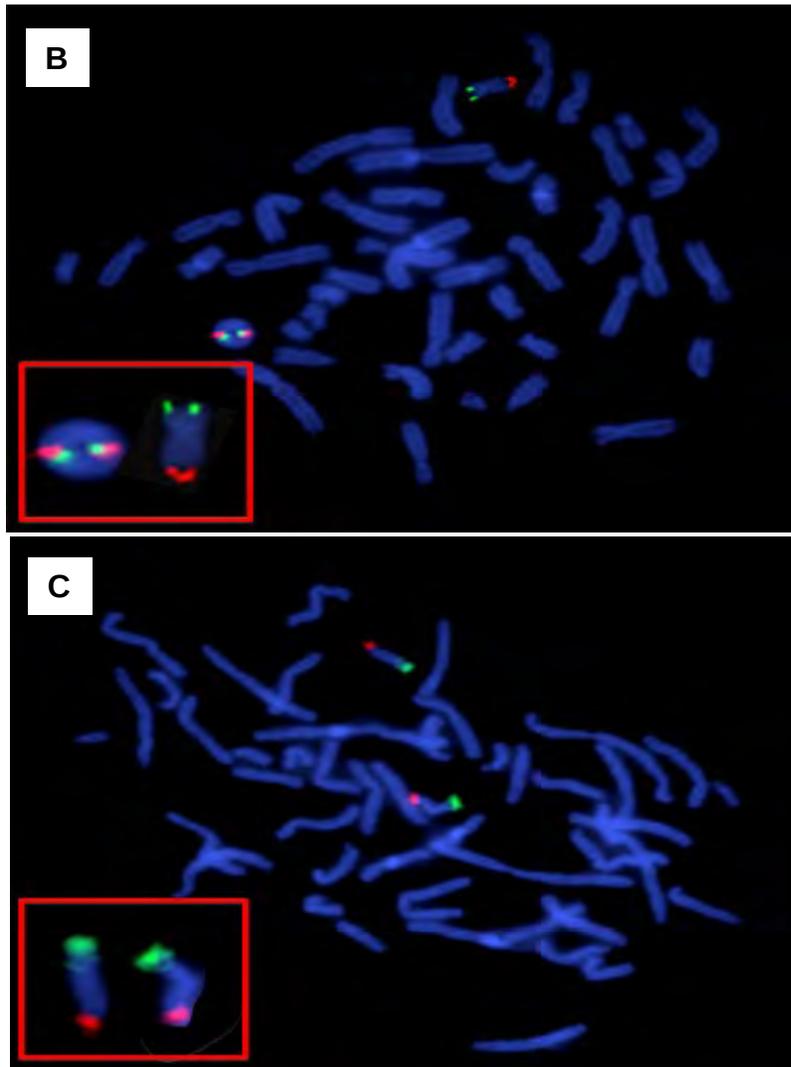


Figura 13. Célula en metafase que muestra en “A” un cromosoma 20 normal y su homólogo en anillo. En “B” un cromosoma 20 normal y un anillo doble del cromosoma 20. En “C” ambos cromosomas 20 normales. Las regiones subteloméricas se presentan en color verde para el brazo “p” y en color rojo para el brazo “q”

RESULTADOS

Con la finalidad de observar el porcentaje de mosaicismo en otro tejido, se utilizó FISH con las mismas sondas en células de mucosa bucal. Se analizaron 200 células en interfase de las cuales 11 (5.5%) presentan monosomía del cromosoma 20, 89 (44.5%) representan la línea normal y 100 presentan el anillo (50%). Las regiones subteloméricas estuvieron presentes se reportó:

nucish(D20S1157,20QTEL14)x2(D20S1157con20QTEL14)x1[100]/

(D20S1157,20QTEL14)x1[11]/(D20S1157,20QTEL14)x2[89]

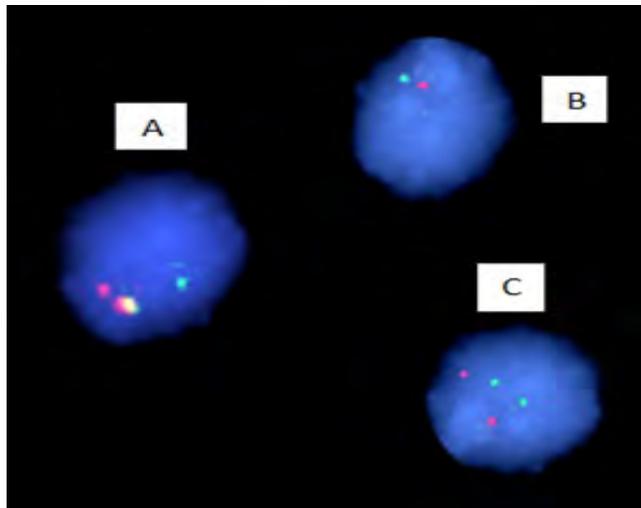


Figura 14. Célula en interfase que muestra en “A” un cromosoma 20 normal y su homólogo en anillo, en “B” monosomía del cromosoma 20 y en “C” ambos cromosomas

RESULTADOS

20 normales, las regiones subteloméricas se presentan en color verde para el brazo "p" y en color rojo para el brazo "q".

Tabla 5. Porcentajes de las líneas celulares observadas en cariotipo y FISH.

Línea Celular	CARIOTIPO	FISH	FISH
	S.P	S.P	M.B
46,XX,r(20)(p13q13.3)	20(80%)	81%	100(50%)
46,XX,dic r(20;20)	-	1%	-
45,XX-20	2(8%)	8%	11(5%)
46,XX	3(12%)	10%	89(45%)
Total	25	100	200

M.B mucosa bucal; S.P sangre periférica.

El cariotipo del padre fue 46,XY,9ph y el de la madre fue 46,XX. El estudio de FISH en sangre periférica en 100 metafases utilizando las sondas subteloméricas para el cromosoma 20 fue normal.

8. Discusión

Los cromosomas en anillo se forman a partir de rupturas teloméricas o subteloméricas que originan una estructura cromosómica circular. Este evento puede producir deleciones terminales en los brazos que implican la pérdida de telómeros y subtelómeros.

Se conocen anillos de todos los cromosomas, sin embargo, los anillos autosómicos comparten un espectro común de rasgos dismórficos, deterioro de habilidades cognitivas y trastornos convulsivos. El síndrome del cromosoma 20 en anillo S(r(20)) se caracteriza por la aparición de crisis parciales complejas frecuentes durante la infancia, con expresión variable de dismorfias y discapacidad intelectual. Las convulsiones son refractarias al tratamiento ocasionando retraso psicomotor y discapacidad intelectual.

La etiología de las convulsiones sigue siendo desconocida. De los casos reportados hasta ahora, la mayoría son esporádicos y presentan mosaicismo para el cromosoma en anillo. Actualmente, sólo tres casos familiares con S(r(20)) han sido reportados. Los tres heredados por vía materna. En el primero una madre clínicamente sana transmitió el anillo a dos hermanos (Back *et al.*, 1989), el segundo donde la madre sí presentó alteraciones fenotípicas y lo heredó a dos hermanos (Herrgard *et al.*, 2006) y el último donde el propósito hereda el anillo y la madre estaba afectada (Canevini *et al.*, 1998). El caso de estudio el anillo se presentó *de novo*.

Existen reportes en la literatura donde el inicio de las convulsiones se correlaciona con la proporción de células con anillo y se considera que con una proporción mayor a 50% de esta línea correlaciona con un fenotipo severo (Gonzalez, *et al.* 2004). En la paciente aquí reportada, la línea celular del anillo se encontró en 80% y la línea normal en 12%, mientras que el FISH reveló en 81% y 10% respectivamente. Los demás hallazgos citogenéticos como la línea con monosomía y el doble anillo encontrados en el análisis por FISH, son derivados del mosaicismo dinámico por la inestabilidad que presentan los anillos. Debido a esta característica que se presenta durante la división celular, nos interesaba analizar otro tejido y por ser un método de obtención de muestra no invasivo fue elegida la mucosa bucal, sin embargo el patrón de señales por FISH reveló que 50% de las células presentaron el anillo y 45% presentan la línea normal, por tanto el porcentaje encontrado en la paciente es de inicio temprano (inició a los 4 años

DISCUSIÓN

de edad) y correlaciona con un fenotipo severo dada la dificultad para el control de las crisis epilépticas. Como ya se mencionó se encontró 80% del anillo en linfocitos y 50% en células de mucosa bucal lo que corrobora que el mosaicismo puede variar entre los tejidos.

Otra de las razones que sustenta la influencia del mosaicismo en el fenotipo es la inestabilidad estructural del anillo durante las divisiones celulares, ya que se producen aneuploidias secundarias que pueden causar falla en el crecimiento principalmente en la embriogénesis donde hay una alta tasa de división celular, las células aneuploides originadas por esta proliferación degeneran y reducen el desarrollo adecuado del embrión, lo que puede resultar en las características fenotípicas de la paciente (Kosztolányi, 2009). Es difícil saber qué proporción se encuentra en el sistema nervioso para poder establecer una correlación de la severidad del fenotipo con la proporción de la línea con anillo en este tejido.

Aunque la paciente no presentó las dismorfias relacionadas con este síndrome como se mostró en la tabla 4, si el hallazgo más frecuente de esta entidad que es la epilepsia refractaria, además de retraso en el desarrollo.

Mediante la técnica de FISH se analizaron las regiones subteloméricas del cromosoma 20, permitió acotar que los genes propuestos que pueden influir en el fenotipo de esta entidad están presentes, debido a que las sondas se localizan hacia la región telomérica donde se encuentran estos *loci*.

Se han propuesto varias hipótesis para esclarecer los mecanismos que originan el desorden convulsivo del S(r(20)). Una de estas propone la microdelección de los genes *CHRNA4* y *KCNQ2* localizados en 20q13.33 estos están relacionados con epilepsia, (Conlin *et al.*, 2011). Sin embargo esto se descarta por que en la paciente estos genes se encuentran presentes fig. 15.

DISCUSIÓN

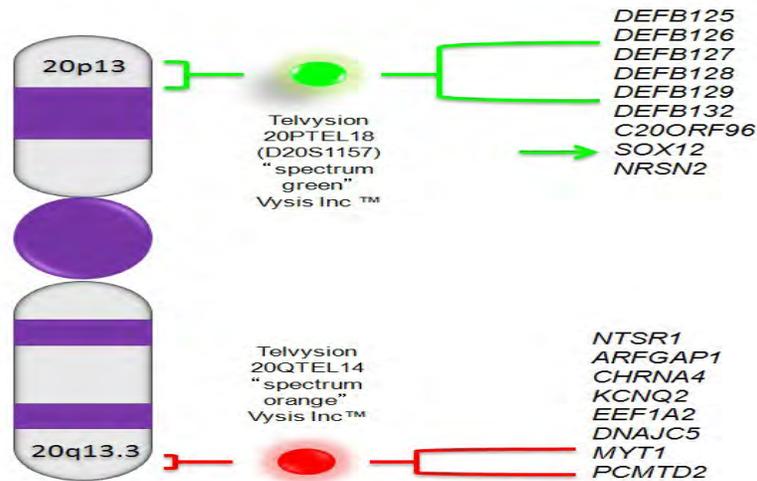


Figura 15. Genes cubiertos por las sondas subteloméricas.

Otra hipótesis es el silenciamiento de estos a través de un efecto de posición del telómero, ya que los genes que se encuentran próximos al punto de fusión del anillo podrían alterar su expresión por la pérdida o ganancia de elementos de regulación transcripcional en cis. En esta paciente es necesario realizar estudios que indiquen si se están expresando o no.

Por lo tanto de las hipótesis antes mencionadas que influyen en el fenotipo de la paciente, la más probable es el porcentaje de la línea con el anillo ya que está presente en 50% de mucosa bucal y en 80 % en las metafases analizadas por FISH.

9. Conclusiones

El análisis citogenético se requiere para el diagnóstico del S(r(20)) ya que hay otras dos encefalopatías que cursan con algunos síntomas similares, lo que permite el diagnóstico diferencial con el síndrome de Lennox-Gastaut (SLG) y el de Landau-Kleffner (SLK).

La técnica de FISH permitió delimitar el tamaño de la deleción con mayor precisión que las bandas GTG, no se detectó en el anillo pérdida de material genético con las sondas subteloméricas utilizadas.

Los genes *CHRNA4* y *KCNQ2* candidatos para epilepsia refractaria están presentes en el anillo de este paciente.

En la base de datos de 2009, existen algunos genes más cercanos al telómero que la sonda y no se pudo detectar la presencia o ausencia de estos. Por tanto no se descarta que fuera una fusión telómero-telómero sin pérdida de estos genes.

La hipótesis más probable para establecer el mecanismo que origina el fenotipo en la paciente es el porcentaje de la línea del anillo.

10. Perspectivas

En este caso para determinar si las características fenotípicas son causadas por algún mecanismo epigenético que altere la expresión de algún gen por efecto de posición son necesarios estudios adicionales.

El realizar la técnica de microarreglos de alta densidad permitirá detectar microdelección de genes que se encuentran después la sonda subtelomérica utilizada en el estudio de FISH hacia el telómero.

Es necesario hibridar con sonda pantelomérica para descartar si las regiones teloméricas están ausentes.

Referencias

1. Ascurra M, Rodrigue S, Herreros M, Torres E, **Cromosoma 20 en anillo en gemelas monocigotas**, *Pediatr* 2008; 35(2): 101-105

2. Atkins Leonard, Miller Walter L, Salam Maria, **A ring 20 Chromosome**, *J Med Genet* 1972; 9: 377-80
3. Back E, Voiculescu I, Briinger M, Wolff G, **Familial ring (20) chromosomal mosaicism**, *Hum Genet* 1989; 83: 148-154
4. Bejjani B A and Shaffer L G, **Clinical Utility of Contemporary Molecular Cytogenetics**, *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2008; 9: 71-86
5. Bickmore Wendy A, **Karyotype analysis and chromosome banding**, *MRC Human Genetics Unit, Edinburgh, Scotland, UK, Encyclopedia of life sciences* 2001, p.1-7
6. Brandt Carsten A, Kierkegaard Ole, Hindkjaer Jhonny, Jensen Peter K A, Pedersen Soren, Therkelsen Aage J, **Ring chromosome 20 with loss of telomeric sequences detected by multicolour PRINS**, *Clin Genet* 1993; 44: 26-31
7. Callen D F, Eyre H J, Ringenbergs M L , Freemantle C J, Woodroffe T P, Haant E A, **Chromosomal origin of small ring marker chromosomes in man: characterization by molecular genetics**, *Am J Hum Genet* 1991; 48: 769-782
8. Canevini Maria Paola, Sgro Vincenzo, Zuffardi Orsetta, Canger Raffaele, Carozzo Romeo, Rossi Elena, Ledbetter Davis, Minicucci Fabio, Vignoli Aglaia, Piazzini Ada, Guidolin Loredana, Saltarelli Amalia, Bernardina Bernardo, **Chromosome 20 ring: a chromosomal disorder associated with a particular electroclinical pattern**, *Epilepsia* 1998; 39(9): 942-951

9. Conlin Laura K, Kramer Whitney, Hutchinson Anne L, Li Xia, Riethman Harold, Hakonarson Hakon, Mulley John C, Scheffer Ingrid E, Berkovic Samuel F, Hosain Syed A, Spinne Nancy B, **Molecular analysis of ring chromosome 20 syndrome reveals two distinct groups of patients**, *J Med Genet* 2011; 48: 1-9

10. de Falco F A, Olivieri P, de Falco A, Concolino D, Battaglia F, Verardi F, Grande G, Stabile M, **Electroclinical evolution in ring chromosome 20 epilepsy syndrome: a case with severe phenotypic features followed for 25 years**, *Seizure* 2006; 15: 449-453

11. Daber R D, Conlin L K, Leonard L D, Canevini M P, Vignoli A, Hosain S, Brown L W, Spinner N B, **Ring chromosome 20**, *Eur J Med Genet*, 2012

12. Elghezal Hatem, Hannachi Hanene, Mougou Soumaya, Kammoun Hassene, Triki Chahnez, Saad Ali, **Ring chromosome 20 syndrome without deletions of the subtelomeric and *CHRNA4-KCNQ2* genes loci**, *Eur J of Med Gen* 2007; 50: 441-445

13. García Cruz Diana, Vásquez Ana Isabel, Pérez Rulfo Daniel, Omayra Dávalos Nory, José Manuel Peñaloza, García Ortiz José Elías, Patiño García Brenda, Sánchez Corona José, **Ring 20 syndrome and loss of telomeric regions**, *Annales de Genetique* 2000; 43: 113-116

14. Giardino Daniela, Vignoli Aglaia, Ballarati Lucia, Recalcati Maria P, Russo Silvia, Camporeale Nicole, Marchi Marguerita, Finelli Palma, Accorsi Patrizia, Giordano Lucio, La Briola Francesca, Chiesa Valentina, Canevini Maria P, Larizza Lida, **Genetic investigations on 8 patients affected by ring 20 chromosome syndrome**, *BMC Medical Genetics* 2010; 11: 146

15. González Delgado M, Salas J, Hernando I, Calleja S, Hernández C, **Cromosoma 20 en anillo: un síndrome identificable por las características electroclínicas**, *Neurología* 2004; 19(4): 214-218
16. Griffiths A J F, Miller J H, Suzuki David T, Lewontin R C, Gelbart W M, (1993), **Genética**, 5a ed, Mc Graw Hill Interamericana, p.2-5
17. Hall Judith G, **Mosaicism**, University of British Columbia, Vancouver, Canada, *Encyclopedia of life sciences* 2005, p.1-5
18. Herrgard Eila, Mononenc Tarja, Mervaalaa Esaa, Kuuselab Liisa, Aikiaa Marja, Stenbackf Ulla, Paakkonenb Leena, Airaksinenc Raija Liisa, Kalviainen Reetta, **More severe epilepsy and cognitive impairment in the offspring of a mother with mosaicism for the ring 20 chromosome**, *Epilepsy Research* 2007; 73: 122-128
19. Hosain Syed A, **Ring chromosome 20 epilepsy syndrome**, *ACRN* 2009; 9(1): 13-16
20. Huret J L, Leonard C, Savage J R K, **Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol**, May 2000. URL: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Educ/PolyMecaSp.html>
21. Inoue Y, Fujiwara T, Matsuda K, Kubota H, Tanaka M, Yagi K, Yamamori K, Takahashi Y, **Ring chromosome 20 and nonconvulsive status epilepticus a new epileptic syndrome**, *Brain* 1997; 120: 939-953
22. Keagle Martha B, Gersen Steven L, (1999), **The Principles of clinical cytogenetics**, Human Press, 1a ed, p.211-212

23. Knijnenburg Jeroen, van Haeringen Arie, Hansson Kerstin B M, Lankester Arjan, Smit Margot J M, Belfroid Rene D M, Bakker Egbert, Rosenberg Carla, Tanke Hans J, Szuhai Karoly, **Ring chromosome formation as a novel escape mechanism in patients with inverted duplication and terminal deletion**, *Eur J of Hum Gen* 2007; 15: 548-555
24. Kosztolanyi G M D, **The genetics and clinical characteristics of constitutional ring chromosomes**, *J Assoc Genet Technol* 2009; 35: 44-8
25. Kroepfl T, Petek E, Schwarzbraun T, Kroisel P M, Plecko B, **Mental retardation in a girl with a subtelomeric deletion on chromosome 20q and complete deletion of the myelin transcription factor 1 gene (MYT1)**, *Clin Genet* 2008; 73: 492-495
26. Levsky Jeffrey M, Singer Robert H, **Fluorescence *in situ* hybridization: past, present and future**, *Journal of Cell Science* 2003; 116: 2833-2838
27. McGinniss M J, Kazazian H H, Stetten G, Petersen M B, Boman H, Engel E, Greenberg F, Hertz J M, Johnson A, Laca Z, MikKelsen M, Patil S R, Schinzel A A, Tranebjaerg, Atonarakis S E, **Mechanism of ring chromosome formation in 11 cases of human ring chromosome 21**, *Am J Hum Gen* 1992; 50: 15-28
28. McKinlag Garner R J, Sutherland Grant R, (2004), **Chromosome abnormalities and genetic counseling**, 3a ed, Oxford University Press, p.178-182
29. McNeil Nicole, Ried Thomas, **Novel molecular cytogenetic techniques for identifying complex chromosomal rearrangements: technology and**

applications in molecular medicine, *Exp Rev Mol Med* 2000, Published by Cambridge University Press, p.1-14

30. Moore Charleen M, Best Robert G, **Chromosome preparation and banding**, *Encyclopedia of sciences* 2001, p.1-7

31. Nishiwaki T, Hirano M, Kumazawa M, Ueno S, **Mosaicism and phenotype in ring chromosome 20 syndrome**, *Acta Neurol Scand* 2005; 111: 205-208

32. Pezzolo Annalisa, Gimelli Giogio, Cohen Amnon, Lavaggetto Antonella, Romano Cesare, Fogu Giuseppina, Zuffardi Orsetta, **Presence of telomeric and subtelomeric sequences at the ring syndrome is caused by ring instability**, *Hum Gen* 1993; 92: 23-27

33. Pierce, (2009), **Genética. Un enfoque conceptual**, 3ª ed, Panamericana, 832p.

34. Pinto M R, Fonseca, Silva M R, Aguiar J, Quelhas I, Lima M R, **Supernumerary ring chromosome 20 in a mother and her child**, *Am J of Med Gen* 2005; 133A: 193-196

35. Rojas M A, Ortiz L R, Delgado E I, **Genética y medicina molecular en cardiología**, *Rev Esp Cardiol* 2001; 54(1): 91-108

36. Rossi E, Riegel M, Messa J, Gimelli S, Maraschio P, Ciccone R, Stroppi M, Riva P, Perrotta C S, Mattina T, Memo L, Baumer A, Kucinkas V, Castellan C, Schinzel A, Zuffardi O, **Duplications in addition to terminal deletions are present in a proportion of ring chromosomes: clues to the mechanisms of formation**, *J Med Genet* 2008; 45: 147-154

37. Shaffer Lisa G, S Marilyn R, C Lynda J, (2009), **ISCN an international system for human cytogenetic nomenclature**, Karger, Switzerland, 135p
38. Shaffer Lisa G, **Karyotype Interpretation**, Washington State University, Spokane, Washington, USA, Encyclopedia of sciences 2005, p.1-7
39. Speicher Michael R, **Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) techniques**, Technical University Munich and GSF Neuherberg, Munich, Germany, Encyclopedia of life sciences 2005, p.1-7
40. Spurbeck Jack L, Adams Sara A, Dewald Gordon W, **Primer on medical genomics part XI: visualizing human chromosomes**, *Clin Proc* 2004; 79: 58-75
41. Stewart Janet M, Cavanagh Nicholas, Hughes David T, **Ring 20 chromosome in a child with seizures, minor anomalies, and retardation**, *Arch Dis Child* 1979; 54(6): 477-9
42. Traylor Ryan N, Bruno Damien L, Burgess Trent, Wildin Robert, Spencer Anne, Devika Ganesamoorthy, Amor David J, Hunter Matthew, Caplan Michael, Rosenfeld Jill A, Theisen Aaron, Torchia Beth S, Shaffer Lisa G, Ballif Blake C, Slater Howard R, **A genotype first approach for the molecular and clinical characterization of uncommon de novo microdeletion of 20q13.33**, *www.plosone.com* 2010; 5(8): 1-9
43. van der Veken Lars T, Dieleman Marianne M J, Douben Hannie , van de Brug Judith C, van de Graaf Raoul, M Hoogeboom A Jeannette, Poddighe Pino J, de Klein Annelies, **Low grade mosaic for a complex supernumerary ring chromosome 18 in an adult patient with multiple congenital anomalies**, *Molecular Cytogenetics* 2010, 3: 13

Páginas de Internet

1. www.genecards.org/ consultado el 13 de Noviembre de 2011
2. ghr.nlm.nih.gov/ consultado el 9 de Enero de 2012
3. www.ncbi.nlm.nih.gov/