



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

**Estudio citogenético de familias
con descendencia aneuploide**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**Licenciada en Bioquímica
Diagnóstica**

P R E S E N T A :

Rodríguez Soto Rebeca

**Asesor:
Dra. Sara Frías**

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México 2014



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.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Estudio citogenético de familias con descendencia aneuploide

Que presenta la pasante: Rebeca Rodríguez Soto

Con número de cuenta: 306213940 para obtener el Título de: Licenciada en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 02 de Abril de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

NOMBRE

FIRMA

PRESIDENTE

Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo

VOCAL

Dra. Sara Frías Vázquez

SECRETARIO

QFB. Rosalba Bonilla Sánchez

1er. SUPLENTE

QFB. Sara Hernández Matilde

2do. SUPLENTE

M. en C. Maritere Domínguez Rojas

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).



El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Citogenética del Departamento de investigación en Genética Humana del Instituto Nacional de Pediatría, parcialmente financiado por el proyecto CONACYT FOSISSS No. 87583 y beca PROBEI.

Contenido

ABREVIATURAS	V
ÍNDICE DE TABLAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1 CARIOTIPO NORMAL	2
2.2 ABERRACIONES CROMOSÓMICAS	4
2.2.1 NUMÉRICAS	4
2.2.1.1 ANEUPLOIDIAS	4
2.2.1.1.1 FACTORES DE RIESGO	6
2.2.1.1.1.1 EDAD MATERNA	7
2.2.1.1.2 IMPORTANCIA DE LAS ANEUPLOIDIAS EN SALUD PÚBLICA	8
2.2.1.2 ESTRUCTURALES	9
2.2.1.2.1 TRANSLOCACIONES CRÍPTICAS	11
2.2.1.2.2 TRANSLOCACIONES CRÍPTICAS EN LOS CROMOSOMAS ACROCÉNTRICOS	12
2.3 ANTECEDENTES DIRECTOS	13
2.3.1 TRANSLOCACIONES CRÍPTICAS DE LOS CROMOSOMAS ACROCÉNTRICOS EN PAREJAS CON ABORTO RECURRENTE	13
2.5.2 ANEUPLOIDIAS Y TRANSLOCACIONES CRÍPTICAS DE LOS CROMOSOMAS ACROCÉNTRICOS	14
3 JUSTIFICACIÓN	15
4 OBJETIVOS	15

4.2	OBJETIVO GENERAL	15
4.3	OBJETIVOS PARTICULARES	15
5	HIPÓTESIS	15
6	MATERIALES Y MÉTODOS	16
6.1	POBLACIÓN DE ESTUDIO	16
6.1.1	CRITERIOS DE INCLUSIÓN	16
6.1.2	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	16
6.1.3	CONSIDERACIONES ÉTICAS	16
6.2	TOMA DE MUESTRA	16
6.3	CULTIVO Y COSECHA DE LINFOCITOS A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA	17
6.4	PREPARACIÓN DE LAMINILLAS	17
6.5	ESTUDIO CITOGÉNÉTICO CONVENCIONAL	18
6.5.1	BANDEO GTG	18
6.5.2	ANÁLISIS CROMOSÓMICO	18
6.6	ESTUDIO CITOGÉNÉTICO MOLECULAR (FISH)	19
6.6.2	ANÁLISIS MICROSCÓPICO	21
6.6.2.1	CRITERIOS DE ANÁLISIS	21
7	RESULTADOS	21
8	DISCUSIÓN	27
9	CONCLUSIONES	31
10	REFERENCIAS	32
11	ANEXOS	35

Abreviaturas

der	Derivativo
dic	Dicéntrico
DNA	Acido Desoxirribonucleico
DNAr	DNA ribosomal
FISH	Hibridación " <i>In situ</i> " Con Fluorescencia
GTG	Bandas G utilizando Tripsina y teñidas con Giemsa
ISCN	Sistema Internacional para la Nomenclatura en Citogenética Humana
LCR's	Repetidos de DNA en un bajo número de copias
M(I)	Meiosis I
M(II)	Meiosis II
mos	Mosaico
NAHR	Recombinación Homóloga No Alélica
NHEJ	Recombinación Con Unión De Extremos no Homólogos
NORs	Regiones Organizadoras Nucleolares
P	Brazo Corto
stk	Tallos
STR	Repetidos cortos en tandem
q	Brazo Largo
h	Heterocromatina Pericentromérica
Rec	Recombinante
s	Satélites
t	Translocación
TCA	Translocaciones Crípticas de los cromosomas Acrocéntricos

Unidades

°C	<i>Grado Celsius</i>
Mm	Milímetros
mM	Milimolar
μM	Micromolar
ml	Mililitro
μL	Microlitro
Min	Minutos
RFC	Fuerza Centrifuga Relativa

Índice de tablas

TABLA I. CLASIFICACIÓN DE LOS CROMOSOMAS EN FUNCIÓN AL GRUPO QUE OCUPAN Y SUS CARACTERÍSTICAS	3
TABLA II. ORIGEN DE LAS TRISOMÍAS HUMANAS.	4
TABLA III. ANEUPLOIDIAS EN HUMANOS: FRECUENCIAS ESTIMADAS EN DIFERENTES ESTADIOS	8
TABLA IV. ANEUPLOIDIAS COMPATIBLES CON LA VIDA, Y SU INCIDENCIA	8
TABLA V. PRINCIPALES REARREGLOS CROMOSÓMICOS, CLASIFICACIÓN, MECANISMOS DE FORMACIÓN Y CONSECUENCIAS EN LOS PORTADORES.	10
TABLA VI. CRITERIOS PARA DETERMINAR LA RESOLUCIÓN DEL CAROTIPO POR BANDAS G.	19
TABLA VII. MEZCLA DE SONDAS CENTROMÉRICAS EMPLEADAS PARA LA DETECCIÓN DE TCA POR MEDIO DE FISH	20
TABLA VIII. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS CRITERIOS DE ANÁLISIS PARA LA DETECCIÓN DE TCA	21
TABLA IX CAROTIPO DE 20 PAREJAS CON HIJOS CLÍNICAMENTE SANOS (PAREJAS CONTROLES)	22
TABLA X CAROTIPO DE 20 PAREJAS CON HIJOS CON ANEUPLOIDIAS DE CROMOSOMAS ACROCÉNTRICOS	23
TABLA XI. POLIMORFISMOS DETECTADOS POR BANDAS G EN LAS 40 PAREJAS ANALIZADAS	25
TABLA XII. DETECCIÓN DE TCA EN LAS PAREJAS CONTROL Y PADRES CON DESCENDENCIA ANEUPLOIDE.	26
TABLA XIII. PRESENCIA DE TCA EN 11 PACIENTES CON TRISOMÍA 21.	27

Índice de Figuras

FIGURA I. CARIOTIPO NORMAL MASCULINO QUE ILUSTRA EL TAMAÑO, POSICIÓN DEL CENTRÓMERO Y PATRÓN DE BANDAS G DE CADA CROMOSOMA HUMANO.	2
FIGURA II. REPRESENTACION ESQUEMÁTICA DE LA NO DISYUNCION EN MEIOSIS I.	5
FIGURA III REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA NO DISYUNCIÓN EN MEIOSIS II.	6
FIGURA IV. PRINCIPIOS DE LA HIBRIDACIÓN "IN SITU" CON FLUORESCENCIA (FISH) EN CROMOSOMAS METAFÁSICOS	11
FIGURA V. MODELO DE LOS BRAZOS CORTOS DE LOS CROMOSOMAS ACROCÉNTRICOS Y LA LOCALIZACIÓN RELATIVA DE LAS SECUENCIAS REPETIDAS EN TANDEM.	12
FIGURA VI. CROMOSOMAS DERIVATIVOS PRESENTES EN CUATRO INDIVIDUOS CON ABORTOS RECURRENTES.	13
FIGURA VII. DUAL FISH USANDO SONDAS CENTROMÉRICAS 13/21 (D13Z1/D21Z1) Y 14/22 (D14Z1/D22Z1). A) EN CROMOSOMAS METAFÁSICOS B) EN FIBRAS CROMATÍNICAS.	14
FIGURA VIII. CULTIVO Y COSECHA DE LINFOCITOS A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA	17

1. Resumen

Las aneuploidias son variaciones en las que existe la ganancia (trisomía) o pérdida (monosomía) de uno o más cromosomas, son la principal causa de aborto espontáneo y de anomalías congénitas en nacidos vivos; ocurren en el 10% de todos los embarazos reconocidos y representan al menos el 35% de las causas de abortos espontáneos de primer trimestre. El principal mecanismo en la producción de gametos aneuploides es la no disyunción meiótica y existe una directa correlación entre la edad materna y la frecuencia con la que las aneuploidias se presentan. Actualmente se ha sugerido que una translocación a nivel pericentromérico entre los cromosomas acrocéntricos podría ser un factor etiológico en la no disyunción. El objetivo del presente trabajo es determinar si existe una asociación entre la presencia de translocaciones crípticas de cromosomas acrocéntricos (TCA) y la generación de aneuploidias. Se estudiaron 20 parejas padres de hijos clínicamente sanos y sin antecedentes de abortos espontáneos y 20 parejas padres de hijos con trisomía 13, 15 y 21. Todas las muestras fueron analizadas por cariotipo con bandas G e hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) con sondas centroméricas para los cromosomas 13/21, 14/22 y 15. El 25% (10/40) de los individuos con descendencia aneuploide presentaron alguna TCA y en el 70% de los casos la madre es la portadora de la translocación. En lo que respecta a las parejas con descendencia clínicamente sana se detectó en el 20% (8/40) de la población la presencia de alguna TCA y solo el 30% de los portadores fueron las madres. La frecuencia de las TCA en las parejas con descendencia aneuploide y las parejas con descendencia clínicamente sana y sin antecedentes de abortos espontáneos no es significativa. No obstante este tipo de rearrreglo estructural en madres de hijos con descendencia aneuploide es 2.3 veces más frecuente que en madres control, lo que apoyaría la hipótesis que las TCA podrían ser un factor etiológico en la no disyunción de los cromosomas acrocéntricos.

2. Introducción

2.1 Cariotipo normal

El cariotipo es el estudio de las características del complemento cromosómico de una célula o individuo. La descripción del cariotipo contiene el número total de cromosomas, el complemento cromosómico sexual, y la descripción detallada de cualquier anomalía cromosómica presente (Slovak, Marylin; Theisen & Shaffer 2013).

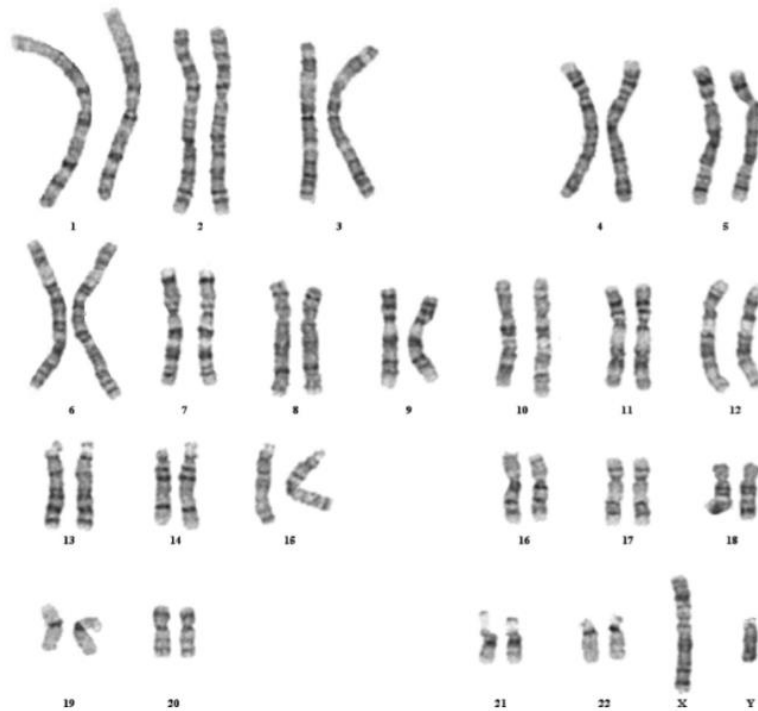


Figura 1. Cariotipo normal masculino que ilustra el tamaño, posición del centrómero y patrón de bandas G de cada cromosoma humano. (Slovak, Marylin; Theisen & Shaffer 2013)

El genoma nuclear humano consiste de 23 pares de cromosomas; 22 autosomas y un par de cromosomas sexuales (Figura I). (Warburton 2005). Cada cromosoma se divide en dos brazos, por una constricción primaria denominada centrómero. El brazo corto es designado como “p” y el brazo largo como “q”. Según la localización del centrómero – en el centro, fuera del centro y cerca de final - los cromosomas pueden ser clasificados en metacéntricos, submetacéntricos o acrocéntricos respectivamente. (Shaffer 2005).

Los cromosomas se disponen en un cariotipo en grupos que se designan con las letras A-G de acuerdo a su tamaño, y posición del centrómero (Tabla I). Los autosomas son numerados del 1 al 22, ordenados por tamaños decrecientes y los cromosomas sexuales, se designan con las letras X e Y, siendo el complemento cromosómico sexual femenino XX y el complemento sexual masculino XY (Shaffer 2005; Blennow 2005).

Tabla I. Clasificación de los cromosomas en función al grupo que ocupan y sus características (Lacadena 1996)

Grupo	Cromosomas	Características
A	1-3	Cromosoma 1 y 3 grandes metacéntricos Cromosoma 2 grande submetacéntrico
B	4-5	Cromosomas grandes submetacéntricos
C	6-12	Cromosomas medianos submetacéntricos Cromosomas 10 y 11 son más cortos que el cromosoma 12
D	13-15	Cromosomas medianos acrocéntricos Cromosoma 13 tiene satélites prominentes en el brazo p Cromosoma 14 tiene satélites pequeños en el brazo p Cromosoma 15 es difícil ver los satélites
E	16-18	Cromosoma 16 pequeño metacéntrico Cromosomas 17 y 18 pequeños submetacéntricos
F	19-20	Cromosomas pequeños metacéntricos
G	21-22	Cromosomas pequeños acrocéntricos El cromosoma 22 es ligeramente mayor que el cromosoma 21
	X e Y	Los cromosomas sexuales no se consideran dentro de ninguno de los siete grupos: Cromosoma X es el mas largo de los cromosomas medianos submetacéntrico Cromosoma Y pequeño acrocéntrico sin NORs

La clasificación de los cromosomas en grupos provee información limitada, resultando necesario emplear técnicas de que faciliten la examinación del cariotipo entero. Las técnicas de bandeo, producen regiones y patrones de bandas dentro de los cromosomas que los distinguen, y permiten la caracterización detallada de rearrreglos estructurales. El bandeo GTG (bandas G utilizando tripsina y teñidas con Giemsa) es la técnica sistemática más usada para el estudio de la morfología cromosómica (Kea}gle & Gersen 2013).

2.2 Aberraciones cromosómicas

Las aberraciones cromosómicas son cambios que modifican el número y/o la estructura de uno o más cromosomas, pueden condicionar cuadros clínicos, que por lo general incluyen retraso mental y de crecimiento y son la principal causa conocida de defectos congénitos (Frías et al. 2012). Las aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales, surgen de errores en meiosis o mitosis, y se presentan de manera constitutiva o en mosaico. (Gardner et al. 2012a). Se estima que el 0.6% de todos los recién nacidos vivos y al menos la mitad de los productos de aborto espontáneo de primer trimestre tendrán una alteración cromosómica detectable por cariotipo (Frías et al. 2012).

2.2.1 Numéricas

Las aberraciones cromosómicas numéricas, corresponden a variaciones en las que existe la ganancia (trisomía) o pérdida (monosomía) de cromosomas individuales (aneuploidias) o bien alteraciones en las que el número normal de cromosomas se duplica en múltiplos exactos del set haploide (euploidias).

2.2.1.1 Aneuploidias

El principal mecanismo en la producción de gametos aneuploides es la no disyunción meiótica. Las diferencias en la arquitectura genómica de los cromosomas proporcionan una visión más completa de la forma en que las aneuploidias se originan, por lo que se han propuesto al menos tres mecanismos diferentes de no disyunción, los que podrían afectar a todos los cromosomas, los que afectan a un grupo específico de cromosomas y los que afectan a un cromosoma en particular (Hassold et al. 2007).

Tabla II. Origen de las trisomías humanas. (Hassold et al. 2007)

Trisomía	N	Materno		Paterno		PZM
		M(I) %	M(II)	M(I)	M(II)	
Acrocéntricos						
13	74	56.6	33.9	2.7	5.4	1.4
14	26	36.5	36.5	0.0	19.2	7.7
15	34	76.3	9.0	0.0	14.7	0.0
21	782	69.6	23.6	1.7	2.3	2.7
22	130	86.4	10.0	1.8	0.0	1.8
No acrocéntricos						
2	18	53.3	13.3	27.8	0.0	5.6
7	14	17.2	25.7	0.0	0.0	57.1
8	12	50.0	50.0	0.0	0.0	50.0
16	104	100	0.0	0.0	0.0	0.0
18	150	33.3	58.7	0.0	0.0	8.0
XXX	46	63.0	17.4	0.0	0.0	19.6
XXY	224	25.4	15.2	50.9	0.0	8.5

M(I), meiosis I, M(II) meiosis II, PZM, Mitosis poscigótica

La no disyunción puede ocurrir en meiosis I (MI), o meiosis II (MII). En MI los cromosomas homólogos ($2n4C$) sinaptan para dar lugar a 23 pares de estructuras lineales, llamadas bivalentes, errores en la segregación de estas tétradas pueden ocurrir de dos maneras diferentes, una en la que ambos cromosomas homólogos migran hacia el mismo polo, o por separación prematura de cromátides hermanas (Figura II) (Nagaoka et al. 2012; Hassold et al. 2007).

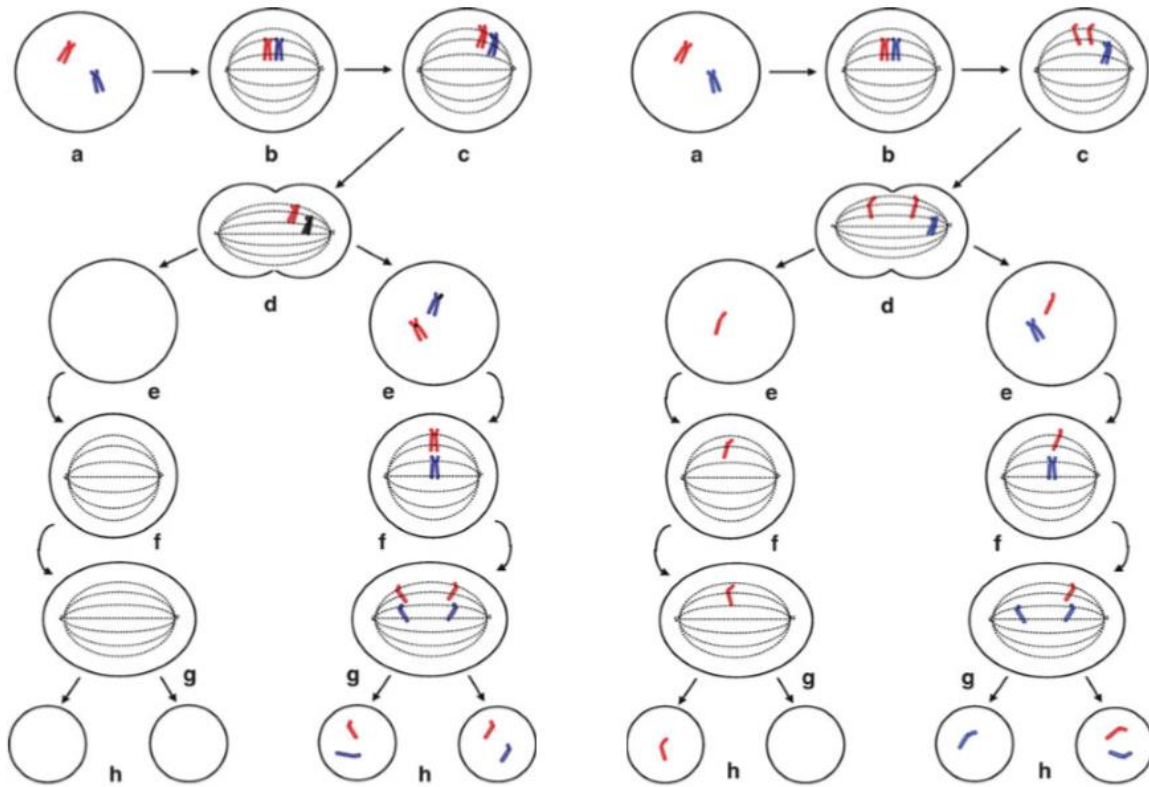


Figura II. Representación esquemática de la no disyunción en meiosis I.

a) Profase I, b) Metafase I, c) Anafase I, d) Telofase I: ambos cromosomas homólogos segregan juntos, e) Productos de la MI, f) Metafase II, g) Anafase II: Ambas cromátides segregan juntas, h) Gametos producidos: dos gametos nulisómicos y dos gametos disómicos. (Wang 2013)

Por separación prematura de cromátides hermanas.

a) Profase I, b) Metafase I, c) Anafase I: separación prematura de cromátides en uno de los cromosomas homólogos, d) Telofase I, e) Productos de la MI, f) Metafase II, g) Anafase II, h) Gametos producidos: dos gametos con complementos cromosómicos normales, un gameto nulisómico, un gameto disómico.

Mientras que errores en MII, originan que ambas cromátides hermanas migren hacia el mismo polo (Figura III).

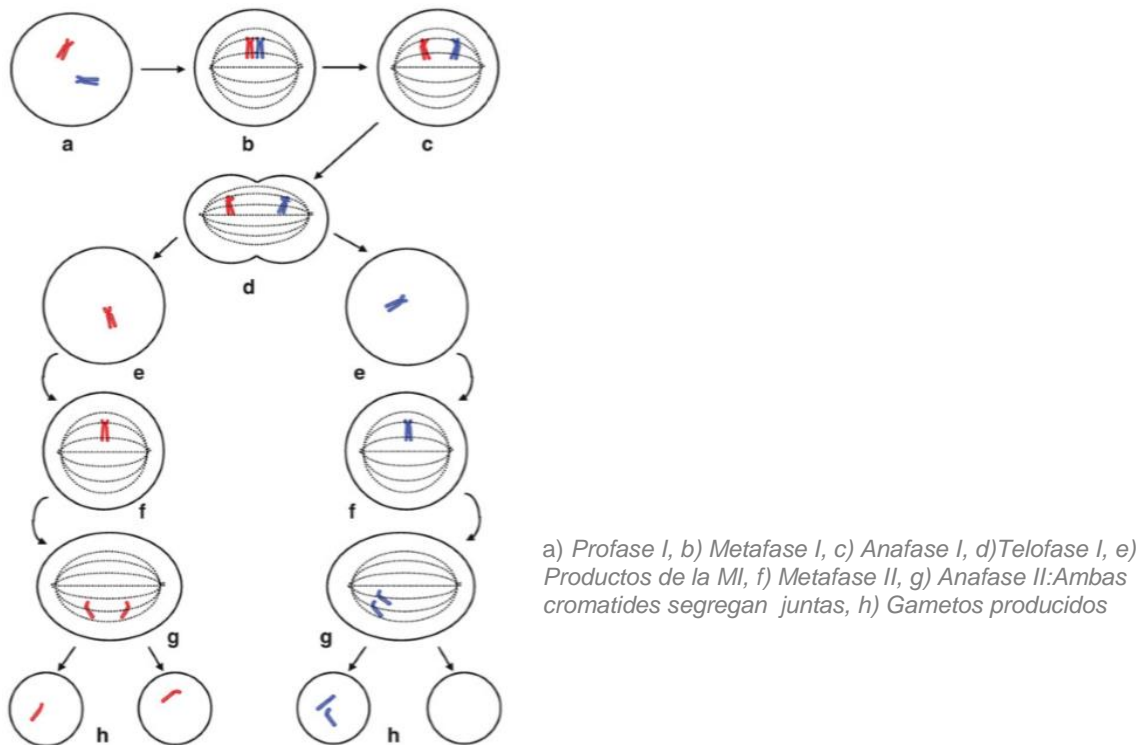


Figura III. Representación esquemática de la no disyunción en meiosis II. (Wang, 2013).

El mecanismo más común en la generación de casi todas las aneuploidias es la separación prematura de cromátides hermanos y los errores en la segregación cromosómica en MI son más frecuentes que los ocurridos en MII (Nagaoka et al. 2012; Wang 2013).

2.2.1.1.1 Factores de riesgo

La mayoría de las aneuploidias surgen por errores durante la ovogénesis, y existe una directa correlación entre la edad materna y la frecuencia con la que estas se presentan. Las diferencias sexo-específicas en el ciclo celular de los gametocitos, podrían explicar el incremento en el riesgo de una segregación cromosómica errónea en los ovocitos (Nagaoka et al. 2012; Wang 2013).

2.2.1.1.1.1 Edad materna

Se ha demostrado que los patrones de recombinación meiótica que determinan el número y posición de los quiasmas presentan diferencias sexo específicas que influyen en la generación de gametos aneuploides, y que existe una compleja asociación entre la recombinación homóloga, la no disyunción y cambios en la edad materna. En las aneuploidias de origen materno en MI, eventos de recombinación de las regiones teloméricas son un importante factor en la generación de trisomías en mujeres jóvenes, mientras que eventos de recombinación de regiones pericentroméricas en trisomías de origen materno por errores en la segregación cromosómica en MII, parecen ser más comunes en mujeres de edad avanzada, no obstante la falta de recombinación representa el 50% de los errores en MI, independientemente de la edad materna. Estas tres modificaciones en los patrones de recombinación -falta de recombinación, o recombinación demasiado cerca o lejos de los centrómeros- podrían explicar algunos de los diferentes mecanismos implicados en la no disyunción. (Hassold et al. 2007).

La pérdida de la cohesión de cromátides hermanas y centrómeros durante la transición de metafase/anafase es otro importante mecanismo en la generación de aneuploidias, se ha sugerido que la relación entre la pérdida de cohesión y la edad materna se debe a una degradación en la cantidad y calidad de las proteínas implicadas en la cohesión, basados en el hecho de que ésta, se establece durante la fase S del ciclo celular en el ovario fetal y la segregación cromosómica ocurre hasta 50 años después. El mecanismo celular que asegura la correcta cohesión cromosómica en las células hijas está compuesto por 4 proteínas (SMC1, SMC3, SCC1/RAD21, SCC3/SA) que juntas forman una estructura de anillo conocida como complejo de cohesión. Sin embargo, aún no se conoce la relación entre la pérdida de la cohesión y la edad materna ya que se ha detectado que cohesinas meiosis específicas se transcriben en ovocitos en crecimiento, lo que sugeriría que estas proteínas podrían tener constantes recambios durante la ovogénesis. (Nagaoka et al. 2012; Wang 2013).

La incapacidad para mantener las asociaciones entre los cromosomas homólogos ya sea, por a falta de recombinación o pérdida de cohesión de las cromátides hermanas, resulta en la presencia de univalentes no apareados en la primera división meiótica deberían activar al punto de control de ensamblaje del huso meiótico (SAC) y retrasar la aparición de la anafase durante la gametogénesis. Sin embargo, parece haber diferencias sexo-específicas, que permiten que ovocitos aneuploides se desarrollen a óvulos maduros, mientras que errores en la segregación cromosómica durante la espermatogénesis, casi siempre resultan en la muerte del espermatocito aneuploide (Nagaoka et al. 2012).

2.2.1.1.2 Importancia de las aneuploidias en salud pública

Las aneuploidias son la anomalía cromosómica más común en los seres humanos y es la principal causa genética de defectos congénitos y abortos. (Hassold et al. 2007).

Tabla III. Aneuploidias en humanos: Frecuencias estimadas en diferentes estadios (Nagaoka et al. 2012)

Población	Metodología	Incidencia de las aneuploidias	Aneuploidias más comunes
Nacidos vivos	Cariotipo	0.3%	+13; +18; +21;XXX; XXY; XYY.
Óbitos	Cariotipo	4%	45,X; +13; +18; +21;XXX; XXY;
Abortos espontáneos	Cariotipo	>35%	45,X; +15; +16, +21; +22
Embriones preimplantación	CGH	30-60%	+15; +16, +21; +22
	SNP array CGH array		
Óvulos/cuerpos polares	CGH	30-70%	+15; +16, +21; +22
	SNP array CGH array		
Espermatozoides	FISH	1-3%	Disomía XY; +13; +21; +22

CGH: Hibridación genómica comparada, FISH: Hibridación "in situ" con fluorescencia

Basados en estudios de cariotipificación en gametos, se estima que del 30-70% de todas las posibles concepciones se espera que sean aneuploides y menos de la mitad se implantarán en útero. (Vorsanova et al. 2005). Las aneuploidias ocurren en el 10% de todos los embarazos reconocidos y representan al menos el 35% de las causas de abortos espontáneos de primer trimestre. Cerca del 50% de las aneuploidias son trisomías autosómicas dentro de las cuales, las detectadas con mayor frecuencia son las trisomías de los cromosomas 16, 22, 21 y 15, pocas aneuploidias son las aneuploidias constitutivas compatibles con la vida (Tabla III).

Las trisomías de los cromosomas acrocéntricos (cromosomas 13,14,15,21,22) representan un grupo de particular interés no sólo por su relación con las pérdidas gestacionales ya que además, una parte de los fetos aneuploides nacen con consecuencias clínicas devastadoras, que por lo general incluyen retraso mental y de crecimiento. (Vorsanova et al. 2005)

Tabla IV. Aneuploidias compatibles con la vida, y su incidencia (Wang 2013; Powell 2013)

Cromosoma involucrado	Síndrome	Incidencia
Trisomías		
21	Down	1/700
18	Edwards	1/6000 1/8000
13	Patau	1/12,000
XXX	Jacobs	1/1000
XYY	Klinefeter	1/575 1/1000
Monosomias		
X	Turner	1/2500

2.2.1.2 Estructurales

Las anomalías cromosómicas estructurales resultan de intercambios entre regiones cromosómicas no alélicas. La presencia de sitios frágiles, estructuras secundarias del DNA (de tipo no B-DNA) y secuencias de homología, repetidas en un bajo número de copias (LCR's), parecen ser las principales regiones involucradas (Kato et al. 2011; Kurahashi et al. 2010).

Los rearrreglos cromosómicos estructurales son resultado de un mecanismo de recombinación homóloga no alélica (NAHR) y se sugiere que los puntos de rotura involucrados en estos reordenamientos se encuentran en directa cercanía a LCRs que proveen las secuencias de homología requeridas en la NAHR, sin embargo, este mecanismo no parece explicar la forma por la que ocurren los rearrreglos cromosómicos complejos en los que los puntos de rotura no son recurrentes; se ha propuesto que mecanismos de recombinación por unión de extremos no homólogos (NHEJ), podrían estar implicados en la formación de este tipo de rearrreglos cromosómicos. (Hastings et al. 2009)

Las aberraciones cromosómicas estructurales son frecuentemente divididas en dos categorías, rearrreglos balanceados y desbalanceados. En los reordenamientos balanceados las células no presentan ninguna pérdida o ganancia neta de la información genética y los individuos que portan dichos reordenamientos son fenotípicamente normales, exceptuando aquellos casos en los que los puntos de rotura se encuentren dentro de un gen o afectan su expresión por "efecto de posición"; en contraste la pérdida o ganancia de material genético, está presente en individuos que portan rearrreglos cromosómicos desbalanceados, dichos reordenamientos modifican la "dosis génica" por la presencia de aneuploidias segmentarias que provocan casi invariablemente abortos y/o múltiples anomalías fenotípicas. (Gardner et al. 2012b).

Aproximadamente el 75% de las aberraciones cromosómicas estructurales son de origen paterno, se ha sugerido que las continuas divisiones mitóticas en las espermatogonias, podrían tener un efecto acumulativo en la mutagénesis de secuencias de homología que son particularmente susceptibles a roturas de doble cadena. Sólo reordenamientos recurrentes, como las translocaciones robertsonianas, y las deleciones terminales del brazo corto del cromosoma 1 se han asociado a un origen materno. (Kaiser-Rogers & W. Rao 2013).

Los reordenamientos cromosómicos pueden ocurrir durante meiosis o mitosis, y existe una directa correlación entre la edad paterna y errores en mitosis que resultan en rearrreglos cromosómicos de *novo* balanceados. En cambio, la edad paterna no parece influir en la generación de rearrreglos estructurales de *novo* no balanceados como resultado de errores en la meiosis paterna o materna. (Gardner et al. 2012b).

En la tabla V se resumen las principales aberraciones cromosómicas estructurales, su clasificación, sus mecanismos de formación y las consecuencias genotípicas en los portadores:

Tabla V. Principales rearrreglos cromosómicos, clasificación, mecanismos de formación y consecuencias en los portadores (Frias et al., 2012; Kaiser-Rogers & W. Rao, 2013)

Aberración	Clasificación		Mecanismo de formación		Consecuencias
Rearreglos cromosómicos balanceados					
Translocaciones (t)	Recíprocas		Roturas en dos cromosomas no homólogos seguidas de un intercambio de material		No generan desbalances genómicos
	Cripticas	Segmento < 5Mb			
	Robertsonianas	Translocación entre los brazos largos de dos cromosomas acrocéntricos	Homóloga Dicéntrica	Fusión de "p" por dos puntos de rotura	Cariotipo 45,XX,der(D;G) 45,XY,der(D;G)
			No homóloga Monocéntrica	Rotura en "q" y fusión de centrómero	No generan desbalances genómicos
Salterinas	Un segmento cromosómico es translocado a dos o más diferentes sitios receptores	Los puntos de rotura involucran regiones de alta homología como telómeros, centrómeros, y NORs		Posibilidad de disrupción génica o desbalance cromosómico	
Inserciones (ins)	Intra-Cromosómica	Dentro del mismo cromosoma	Tres puntos de rotura, dos involucrados en la formación de un segmento cromosómico que posteriormente es insertado en otro sitio		No generan desbalances genómicos
	Inter-cromosómica	Entre cromosomas diferentes			
	Directa	Invertida			
Inversiones (inv)	Pericéntrica	Involucra al centrómero	Dos puntos de rotura uno en "p" y otro en "q" que genera un segmento que gira 180°		No generan desbalances genómicos
	Paracéntrica	No involucra al centrómero	Dos puntos de rotura dentro del mismo brazo		
Rearreglos cromosómicos desbalanceados					
Isocromosomas (i)	Cromosoma anormal con dos brazos idénticos	Monocéntricos	División horizontal anormal del centrómero		Tetrasomía del brazo cromosómico involucrado y monosomía del brazo faltante
		Isodicéntricos	rotura y unión de las cromátidas hermanas de un cromosoma duplicado		
Duplicaciones (dup)	Copia extra de un segmento genómico		Recombinación desigual		Trisomía parcial
	Micro-duplicaciones	Segmento < 5Mb			
Deleciones (del)	Pérdida de un segmento cromosómico	Terminal	Un punto de rotura y regeneración telomérica		Monosomía parcial
		Intersticial	Dos puntos de rotura en un cromosoma, y la pérdida del segmento intermedio.		
	Micro- deleciones	Segmento < 5Mb	Recombinación desigual		
Cromosomas en anillo (r)	Céntricos		Pérdida de los extremos terminales de ambos brazos y la reunión de los segmentos o por fusión de telómeros		Trisomías parciales cuando se presentan como súper numerarios
	Acéntricos		Dos puntos de rotura en el mismo brazo del cromosoma		

"D" y "G" son cualquier cromosoma acrocéntrico involucrado en la translocación

Los portadores de rearrreglos cromosómicos estructurales balanceados (heterocigotos) tienen un mayor riesgo de generar gametos con aneuploidías segmentarias, como consecuencia de una segregación cromosómica de tipo adyacente 1, adyacente 2 o 3:1. En algunos reordenamientos, la recombinación presenta un riesgo mayor. Inversiones e inserciones pueden generar nuevos cromosomas recombinantes (rec), con grandes desbalances, no obstante, es posible que se lleven apareamientos heterosinapticos entre los cromosomas derivados y sus homólogos, si los segmentos involucrados en el rearrreglo estructural son de tamaños muy pequeños; consecuentemente esto no modifica la segregación normal de los cromosomas involucrados. (Gardner et al. 2012b)

2.2.1.2.1 Translocaciones crípticas

Son rearrreglos estructurales, que se generan tras el intercambio de dos segmentos cromosómicos entre dos cromosomas no homólogos, los cromosomas originados tras el rearrreglo reciben el nombre de derivados (der) y se identifican según el centrómero que posean (Frías et al. 2012).

Detección de las Translocaciones crípticas

Debido a su localización o tamaño este tipo de translocaciones no son detectables por un cariotipo rutinario con bandas G. Los segmentos involucrados pueden ser de tamaños menores a los 5 millones de pares de bases y por lo tanto no representan por si mismos, cambios en el tamaño o patrones de bandeo de los cromosomas derivados, o bien, pueden ocurrir en regiones cromosómicas morfológicamente muy similares, que no permitan su identificación. (Warburton 2005).

La técnica de Hibridación “*in situ*” con fluorescencia en cromosomas metafásicos, es la técnica más empleada en el estudio de las translocaciones crípticas, se basa en la desnaturalización y posterior hibridación de una secuencia específica en el DNA con una sonda marcada con moléculas fluorescentes, de esta manera es posible aumentar la resolución con la que se pueden identificar reordenamientos cromosómicos. (Speicher & Carter 2005)

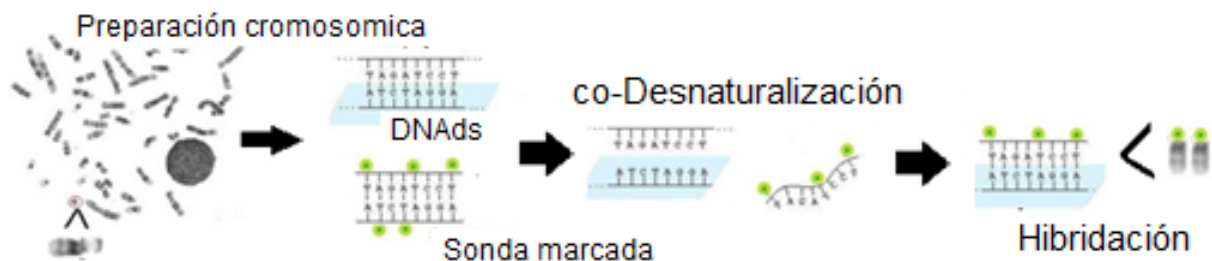


Figura IV. Principios de la Hibridación “*in situ*” con fluorescencia (FISH) en cromosomas metafásicos

2.2.1.2.2 Translocaciones crípticas en los cromosomas acrocéntricos

Son translocaciones que involucran el intercambio de dos segmentos cromosómicos entre dos cromosomas acrocéntricos no homólogos y que no son detectables por un cariotipo rutinario con bandas G. Dependiendo del segmento involucrado en la translocación, los cromosomas derivados originados pueden ser clasificados en monocéntricos o dicéntricos.

Stergianou et al. (1993) demostró que los segmentos translocados se localizan sólo en los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos y se ha sugerido que secuencias repetidas en tándem en el DNA como DNAr, satélites, y secuencias satélite III dentro de los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos facilitan la recombinación homóloga no alélica (NHAR) y por lo consiguiente podrían predisponer a la formación de las TCA (Kaiser-Rogers & W. Rao 2013; Ledbetter 1992).

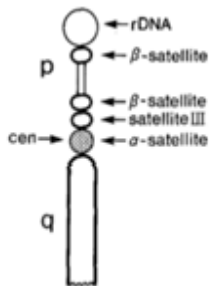


Figura V. Modelo de los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos y la localización relativa las secuencias repetidas en tandem. (Gravholt et al. 1992)

Existe la posibilidad de que las regiones organizadoras nucleolares (NORs) en los cromosomas derivados originados, sean silenciadas, sin embargo, los portadores de las TCA no tienen efectos deletéreos en el fenotipo, aun con desbalances en las regiones pericentroméricas o de brazo “p”, debido a que las secuencias contenidas en los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos no son transcripcionalmente activas, a excepción de repetidos en tándem de los genes de DNAr que se encuentran altamente conservados en los cinco pares de cromosomas acrocéntricos (13,14,15,21 y 22) (Sakai et al. 1995; Gravholt et al. 1992).

2.3 Antecedentes directos

2.3.1 Translocaciones críticas de los cromosomas acrocéntricos en parejas con aborto recurrente

Cockwell *et al* sugirió que individuos portadores de translocaciones crípticas de los cromosomas acrocéntricos (TCA), tienen un mayor riesgo de presentar abortos recurrentes, infertilidad o de tener hijos aneuploides, como consecuencia de una segregación cromosómica deficiente de los cromosomas involucrados en la translocación. Explica que la presencia de estos rearrreglos estructurales, en las regiones pericentroméricas de los cromosomas acrocéntricos podría condicionar a apareamientos cromosómicos anormales entre los cromosomas derivados y los cromosomas homólogos normales, que den lugar a una no disyunción. Cockwell *et al.* (2003), Publico por primera vez la presencia de dos diferentes TCA en individuos con abortos recurrentes, un cromosoma derivativo 13, con una región centromérica derivada de los brazos cortos, centrómero y región proximal del brazo largo del cromosoma 15 [der(15)t(13;15)], y un cromosoma derivativo 22 en el que el centrómero había sido sustituido, por dos centrómeros diferentes, uno del cromosoma 14 y otro del cromosoma 13 o 21. (Figura VI).

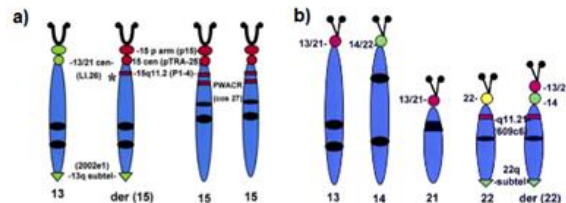


Figura VI. Cromosomas derivados presentes en cuatro individuos con abortos recurrentes.
a) *der(15)t(13;15)* b) *der(22)dic(14;13)* o *der(22)dic(14;21)*. (Cockwell et al. 2003)

2.5.2 Aneuploidias y translocaciones crípticas de los cromosomas acrocéntricos

En el 2008 Ramos et al. Reportaron el primer caso en el que una translocación críptica pericentromérica entre los cromosomas acrocéntricos está asociada con la generación de un producto aneuploide. En este estudio se determinó la presencia de un cromosoma der(22)dic(21;22) en un sujeto fenotípicamente normal, con cariotipo 46,XY, padre de un paciente con síndrome de Down 47,XY,+21, y portador del mismo rearreglo estructural.

El análisis de segregación STR de microsatélites confirmó el origen paterno del cromosoma 21 adicional y aunado a esto se determinó mediante un ensayo de Hibridación “*in situ*” con fluorescencia (FISH) con sondas para la región crítica 21q, que la disomia del cromosoma 21 es significativamente más frecuente en los espermatozoides de padre portador de la translocación (12/10,000) en comparación con sujetos controles (3.5/10,000).

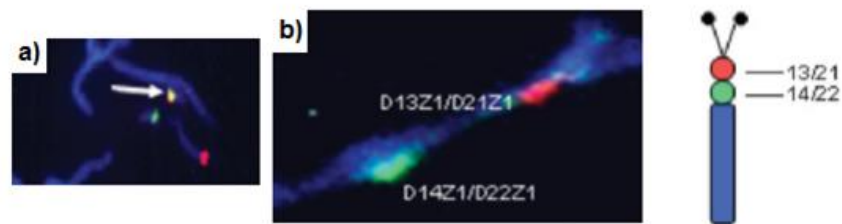


Figura VII. Dual FISH usando sondas centroméricas 13/21 (D13Z1/D21Z1) y 14/22 (D14Z1/D22Z1). a) en cromosomas metafásicos b) en fibras cromatinicas. (Ramos et al. 2008)

3 Justificación

Las aneuploidias son la principal causa genética de muerte perinatal, abortos y retraso mental congénito, se ha sugerido que translocaciones cripticas en regiones pericentroméricas en los cromosomas acrocéntricos, podrían promover, la generación de gametos aneuploides, sin embargo actualmente existe poca información acerca de la asociación entre las translocaciones cripticas de cromosomas acrocéntricos (TCA) y la frecuencia de aneuploidias en su descendencia.

4 Objetivos

4.2 Objetivo general

Determinar si existe una asociación entre la presencia de translocaciones cripticas de cromosomas acrocéntricos y la generación de aneuploidias.

4.3 Objetivos particulares

Estudiar la condición citogenética por bandas G de padres de hijos clínicamente sanos y padres de hijos con aneuploidias de los cromosomas acrocéntricos.

Determinar la frecuencia de las translocaciones cripticas de cromosomas acrocéntricos en ambas poblaciones.

Establecer si existe una asociación entre las translocaciones cripticas de cromosomas acrocéntricos con la no disyunción de los cromosomas acrocéntricos.

5 Hipótesis

Sí, la frecuencia de las translocaciones cripticas de cromosomas acrocéntricos en padres de individuos con aneuploidias es mayor que la frecuencia de las translocaciones cripticas de cromosomas acrocéntricos en la población en general, entonces existirá una asociación entre la presencia de translocaciones cripticas en los cromosomas acrocéntricos (TCA) y la generación de descendencia aneuploide.

6 Materiales y métodos

6.1 Población de estudio

Se estudiaron 20 familias con descendencia aneuploide, con diagnóstico confirmado de una trisomía regular de cualquiera de los cromosomas acrocéntricos por bandejo G y 20 parejas sin antecedentes de abortos y por lo menos un hijo clínicamente sano.

6.1.1 Criterios de inclusión

Familias con hijos con diagnóstico confirmado o posible de trisomía de cualquiera de los cromosomas acrocéntricos y parejas sin antecedentes de abortos y con por lo menos un hijo clínicamente sano, que acepten firmar una carta de consentimiento informado.

6.1.2 Criterios de exclusión

Se excluyeron aquellas familias en las que se diagnosticó a los hijos portadores de translocaciones robertsonianas

6.1.3 Consideraciones Éticas

Todas las parejas y familias que participaron en el presente estudio, accedieron voluntariamente a firmar una carta de consentimiento informado (Anexo 1) en la que se describía el tipo de estudio en el que participarían, los métodos para la obtención de muestra y los posibles riesgos.

6.2 Toma de muestra

Se obtuvieron 4ml de sangre periférica, por medio de una venopunción con un sistema de extracción al vacío, en un tubo BD Vacutainer® de plástico con Heparina

6.3 Cultivo y cosecha de linfocitos a partir de sangre periférica

Este procedimiento se realizó por duplicado por cada individuo.

En una campana de flujo laminar se adicionaron en tubo tipo Falcón estéril de 15ml:

5 ml de medio Gibco® RPMI 1640

20 µl de fitohemaglutinina Gibco®

10 µl de L-Glutamina 200 mM

0.5 ml de sangre completa heparinizada.

El contenido de cada tubo se mezcló e incubó a 37 °C por 72 horas.

A las 72 horas, se adicionó 100 µl de colchicina 125 µM a cada tubo y se incubaron por 20 minutos a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, los tubos se centrifugaron durante 10 minutos 400 FCR.

El botón se resuspendió en 8 ml de KCl 0.075 M (solución hipotónica) y los tubos se incubaron por 20 minutos a 37°C. Concluido este tiempo las muestras se prefijaron con 2 ml de solución fijadora (ácido acético /metanol 1:3), los tubos se homogenizaron por inmersión y se centrifugaron 10 min 400 FCR. El sobrenadante se eliminó y el botón se resuspendió en 8 ml de solución fijadora recién preparada y fría 2 veces más.

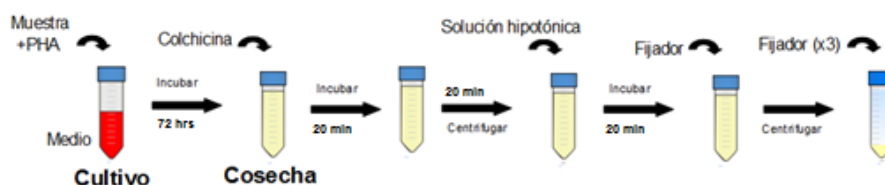


Figura VIII. Cultivo y cosecha de linfocitos a partir de sangre periférica

6.4 Preparación de laminillas

Los botones obtenidos tras la cosecha de linfocitos, se resuspendieron en función a su tamaño en volúmenes variables de solución fijadora (0.2-1 ml), con la finalidad de hacer una suspensión celular adecuada. Las preparaciones cromosómicas se realizaron por goteo sobre un porta objetos lavado frío y desengrasado.

Las laminillas fueron expuestas a vapor de agua y secadas al aire.

6.5 Estudio citogenético convencional

6.5.1 Bando GTG

El patrón de bando producido por tripsina y teñidas con Giemsa, permite la identificación precisa de cada cromosoma y responde a un empaquetamiento diferencial de las regiones cromosómicas, este patrón se relaciona con la composición predominante de las bases en el DNA. Las bandas oscuras (bandas G⁺) representan regiones con DNA rico en A-T, y pobres en genes por lo que desde el punto de vista funcional son regiones que tienden a represión génica, mientras que las bandas G claras (bandas G⁻) son regiones ricas en genes, funcionalmente activas.(Solari 2007)

Las preparaciones cromosómicas se maduraron por 8 días a 37°C para posteriormente ser tratadas con una solución de tripsina por un tiempo comprendido entre 30 segundos y 3 minutos, posteriormente las laminillas se enjuagaron y se sumergieron en Buffer Gurr (Gibco®) por un tiempo variable de 15 segundos a 8 minutos. El tiempo de exposición de cada laminilla a la digestión enzimática y el buffer está en función de la calidad de los cromosomas. Finalmente las laminillas se sumergieron por 15 y 30 segundos en los colorantes Wrigth y Giemsa, ambos colorantes se prepararon empleando buffer Sörensen como diluyente a proporciones 1:1 y 1:3 respectivamente.

6.5.2 Análisis cromosómico

Se analizaron un mínimo de 15 metafases por individuo, exceptuando todos los casos en los que fue necesario descartar mosaicos celulares. Las metafases se analizaron con un objetivo de inmersión 100x, seleccionando las metafases de mayor calidad mediante un patrón fijo de barrido del portaobjetos con un objetivo 10x, el análisis consistió en la determinación numérica de los cromosomas, y su identificación en función a su tamaño, posición del centrómero y patrones de bando.

Los cariotipos fueron reportados según lo establecido por el ISCN 2013 (International System for Human Cytogenetic Nomenclature), y el nivel de resolución se estableció en base a los criterios para determinar la resolución del cariotipo por bandas G expuestos en la Tabla VI

Tabla VI. Criterios para determinar la resolución del cariotipo por bandas G. (Anon 2007)

Nivel de resolución	Características
300	2 bandas en 8p (8p12 y 8p22) 3 bandas en 10q (10q21, 10q23, 10q25) 20p12 visible 22q12 visible
400	3 bandas a la mitad de 4q(q22-q28) 3 bandas a la mitad de 5q 2 bandas en 9p (9p21 y 9p23) 13q33 visible
500	7q33 y 7q25 visible 3 bandas en 11p (11p12, 11p14, 11p15.4) 14q32.2 visible 4 bandas en 18q (18q12.1, 18q12.3, 18q21.2, 18q 22)
550	5q31.2 visible 8p21.2 visible 2 bandas en 11pter (11p15.2, 11p15.4) 22q13.2 visible
700	2p25.2 2q37.2 10q21.1 y 10q21.3 17q22-q24 dentro de 3 bandas

Se deben cumplir por lo menos tres de los criterios para determinar la resolución del cariotipo por bandas G

6.6 Estudio citogenético molecular (FISH)

Se utilizaron los kits comerciales:

Vysis® CEP® Chromosome Enumeration DNA FISH (CEPD15Z1), y Kreatech® SE® Satellite Enumeration Probes (SE13/21, SE14/22), y la metodología se dividió en 7 etapas:

I. Selección de la zona de hibridación

Las laminillas se evaluaron con un objetivo plano de 10x y se delimito una zona de hibridación de 22 mm x 22 mm, con un lápiz punta diamante. Las características de selección incluyeron: la distribución homogénea de las metafases y la menor cantidad de citoplasma visible

II. Pre-tratamiento

Se pre-trataron los portaobjetos con la muestra seca en ácido acético/metanol 70% v/v, durante 20 min. Una vez transcurrido el tiempo, las laminillas se incuban en 2 x SSC, pH 7.0 a 37°C durante 30 min y fueron deshidratadas en concentraciones graduales de etanol (70 % 80 % y 100 % v/v) durante 2 min cada uno, las laminillas se secaron al aire a temperatura ambiente. Los porta objetos se incubaron durante

5-10 min dependiendo de la cantidad de restos citoplasmáticos en la muestra en una solución 0.005% pepsina en 0.01M HCl, las laminillas se lavaron durante 3 min en 1X PBS a temperatura ambiente y fueron fijadas en formaldehído tamponado al 1% en 1XPBS/20mM MgCl₂ durante 10 min a temperatura ambiente.

III. Preparación de las sondas

La mezcla de sondas centroméricas, se realizó como se muestra en la Tabla IV:

Tabla VII. Mezcla de sondas centroméricas empleadas para la detección de TCA por medio de FISH

Sonda	Fluorescencia	µl laminilla
13/21	Verde	1
14/22	Rojo	1.5
15	Aqua	0.5
DNA Herring		1
Buffer		6
Total de reacción		10

IV. Co-Desnaturalización

Se colocaron los 10 µl totales de la mezcla de sondas sobre la zona de hibridación. Se cubrió con un cubreobjetos de 22x22mm y se selló con adhesivo de caucho. La muestra y la sonda se desnaturalizaron en una Thermobrite™ a 73 °C durante 1 minuto 30 segundos.

V. Hibridación

Las laminillas se incubaron por 24 hrs a 37°C en una cámara humidificada

VI. Lavado post-hibridación

El adhesivo de caucho se quitó junto con los cubreobjetos. Las laminillas se lavaron en 0.4x SSC/0.3% NP-40 durante 2 minutos a 73 °C+ 1°C, y en 2x SSC / 0.1% NP durante 1 min a temperatura ambiente sin agitación.

Las muestras se deshidrataron en etanol al 70%, 85% y 100% durante 2 min cada uno. Las laminillas se secaron al aire a temperatura ambiente.

VII. Contratinción

Se aplicaron 10 µl de DAPI 1:200 en VECTASHIELD® se colocó un cubreobjetos y se procedió al análisis en el microscópico de fluorescencia.

6.6.2 Análisis microscópico

Se analizaron 20 metafases por cada individuo en estudio, en un microscopio Zeiss para fluorescencia con los filtros FICT, espectro rojo y aqua, acoplado a una unidad central de procesamiento (CPU) con el software ISIS®.

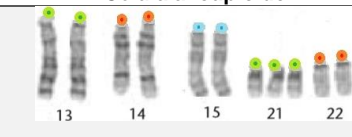
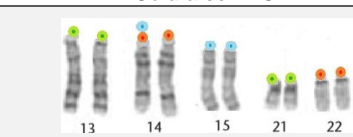
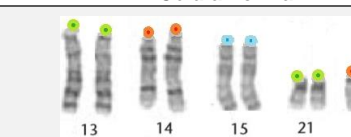
6.6.2.1 Criterios de análisis:

Se consideraron células normales aquellas que presentaron 4 señales rojas, 4 señales verdes y 2 señales aqua por metafase.

Células aneuploides aquellas que presentaran una señal y cromosoma acrocéntrico extra.

Células con TCA aquellas metafases que presentaran dos señales de diferente cromosoma en el centrómero de uno o más cromosomas acrocéntricos.

Tabla VIII. Representación gráfica de los criterios de análisis para la detección de TCA

Célula aneuploide	Célula con TCA	Célula normal
 <p>Trisomía regular 21. 4 señales rojas 5 señales verdes 2 señales aqua.</p>	 <p>der(14)t(14;15) 4 señales rojas 4 señales verdes 3 señales aqua</p>	 <p>4 señales rojas, 4 señales verdes 2 señales aqua</p>
<p><i>No se podrán identificar aquellas translocaciones que ocurran entre los cromosomas 13 con 21 ni 14 con 22.</i></p>		

7 Resultados

El 92.5% (37/40) de la población control presentaron cariotipos con bandas G normales a una resolución comprendida entre 400 y 500 bandas. Se diagnosticaron 3 individuos fenotípicamente sanos, portadores de una línea celular aneuploide, 45,X (madre TCA 72, madre TCA74, y padre TCA86) con cariotipos mos45,X[3]/46,XX,[27], mos45,X[3]/46,XX,[24], y mos45,X[3]/46,XY,[31], (ver tabla IX). Un nivel de mosaísmo bajo reduce la posibilidad de anomalías fenotípicas asociadas a un cariotipo 45,X

Tabla IX Cariotipo de 20 parejas con hijos clínicamente sanos (parejas controles)

Parejas control		Cariotipo	Observaciones
TCA 61	Madre	46,XX,9qh ⁺	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 500-550 bandas. Polimorfismo con mayor cantidad de heterocromatina pericentromérica de 9q.
	Padre	46,XY,9qh ⁻	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-500 bandas. Polimorfismo con menor cantidad de heterocromatina pericentromérica de 9q.
TCA 62	Madre	46,XX	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-500 bandas.
	Padre	46,XYqh ⁺ ,14pstk ⁻	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-500 bandas. Polimorfismo con mayor cantidad de heterocromatina pericentromérica de Y, polimorfismo con menor cantidad de cromatina en los tallos del cromosoma 14
TCA 65	Madre	46, XX,9qh ⁺	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 500-550 bandas. Polimorfismo con mayor cantidad de heterocromatina pericentromérica de 9q.
	Padre	46,XY,13pstk ⁺	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-500 bandas. Polimorfismo con mayor cantidad de cromatina en los tallos en la región 13p
TCA 66	Madre	46,XX	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 450-500 bandas
	Padre	46,XY,9qh ⁺	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 500-550 bandas. Polimorfismo con mayor cantidad de heterocromatina pericentromérica de 9q.
TCA 68	Madre	46,XX	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 450-500 bandas
	Padre	46,XY,16qh ⁺	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 500-550 bandas. Polimorfismo con mayor cantidad de heterocromatina pericentromérica de 16q.
TCA 69	Madre	46,XX	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 450-500 bandas
	Padre	46,XY	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 450-500 bandas
TCA 70	Madre	46,XX	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 450-500 bandas
	Padre	46,XY	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 450-500 bandas
TAC 71	Madre	46,XX,16qh ⁺	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 500-550 bandas. Polimorfismo con mayor cantidad de heterocromatina pericentromérica de 16q.
	Padre	46,XY,16qh ⁺	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-550 bandas. Polimorfismo con mayor cantidad de heterocromatina pericentromérica de 16q.
TCA 72	Madre	mos 45,X[3]/46,XX[27]	Mosaico portador de una línea celular baja 45,X
	Padre	46,XY	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-550
TCA 74	Madre	mos45,X[3]/46,XX[24]	Mosaico portador de una línea celular baja 45,X
	Padre	46,XY,16qh ⁺	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-550 bandas. Polimorfismo con mayor cantidad de heterocromatina pericentromérica de 16q.
TCA 75	Madre	46,XX	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-550 bandas.
	Padre	46,XY	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-550 bandas.
TCA 76	Madre	46,XX	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-550 bandas.
	Padre	46,XY	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-550 bandas.
TCA 77	Madre	46,XX,16qh ⁻	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-550 bandas. Polimorfismo con menor cantidad de heterocromatina pericentromérica de 16q.
	Padre	46,XY	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-550 bandas.
TCA 79	Madre	46,XX	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-550 bandas.
	Padre	46, XY	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-550 bandas.

TCA 80	Madre	46,XX	Bandas G normales en 50 metafases con una resolución de 400-550 bandas.
	Padre	45,XY	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-550 bandas.
TCA 81	Madre	46,XX	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-550 bandas.
	Padre	46,XY,9qh-,22pstk+	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-500 bandas. Polimorfismo con menor cantidad de heterocromatina pericentromérica de 9q, un polimorfismo con mayor cantidad de tallos en 22p
TCA 83	Madre	46,XX	Bandas G normales en 25 metafases con una resolución de 400-550 bandas.
	Padre	46,XY	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-550 bandas.
TCA 84	Madre	46,XX	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-550 bandas.
	Padre	46,XY	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-550 bandas.
TCA 85	Madre	46,XX	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-550 bandas.
	Padre	mos 46,XY[31]/45,X[4]	Mosaico portador de una línea celular baja 45,X
TCA 86	Madre	46,XX	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-550 bandas.
	Padre	46,XY	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-550 bandas.

En la Tabla X se muestran los cariotipos de 9 parejas padres de hijos con trisomías 13, 15, y 21, y 11 familias con hijos descendencia aneuploide. El 97.2% (39/40) de los padres tienen un cariotipo con bandas G normales a niveles de resolución de 400-500 bandas. Uno de los padres fenotípicamente normal (Tol 5), se diagnosticó como mosaico para una línea celular 47,XY,+21.

Tabla X Cariotipo de 20 parejas con hijos con aneuploidias de cromosomas acrocéntricos

	Cariotipo		Observaciones
Trisomía 13			
TCAT13	Madre	46,XX,16qh+	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-450 bandas. Polimorfismo con mayor cantidad de heterocromatina pericentromérica de 16q.
	Padre	46,XY	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-550 bandas
Trisomía 15			
TCAT15	Madre	46,XX	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-550 bandas
	Padre	46,XY	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-550 bandas
TCAT15	Madre	46,XX	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-550 bandas
	Padre	46,XY	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-550 bandas
Trisomía 21			
NV100T21	Madre	46,XX	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-550 bandas
	Padre	46,XY,9qh+,16qh+	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-450 bandas. Polimorfismo con mayor cantidad de heterocromatina pericentromérica de 9q y 16q
Nv15T21	Madre	46,XX	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-550 bandas
	Padre	46,XY	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-500 bandas
32-13	Madre	46,XX	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-500 bandas
	Padre	46,XY,22pstk+	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-550 bandas. Polimorfismo con mayor cantidad de tallos en 22p
	Hijo	mos 47,XY,+21[30]/46,XY[3]	Mosaico portador de una línea celular baja 46,XY

201-13	Madre	46,XX	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-500 bandas
	Padre	46,XY,21sptk+	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-500 bandas. Polimorfismo con mayor cantidad de tallos en 22p
	Hijo	47,XX,+21	Trisomía 21 regular en 45 metafases con una resolución de 450-500 bandas
204-13	Madre	46,XX,9qh+	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-450 bandas. Polimorfismo de la heterocromatina pericentromérica de 9q.
	Padre	46,XY	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-500 bandas
	Hijo	47,XX,+21	Trisomía 21 regular en 50 metafases con una resolución de 450-500 bandas
232-13	Madre	46,XX	Bandas G normales en 25 metafases con una resolución de 400-550 bandas
	Padre	46,XY	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-500 bandas
	Hijo	47,XX,+21	Trisomía 21 regular en 15 metafases con una resolución de 450-500 bandas
351-13	Madre	46,XX	Bandas G normales en 25 metafases con una resolución de 400-500 bandas
	Padre	46,XY	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 450-500 bandas
	Hijo	47,XX,+21	Trisomía 21 regular en 15 metafases con una resolución de 450-500 bandas
Tol 5	Madre	46,XX,9qh-	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-450 bandas. Polimorfismo de la heterocromatina pericentromérica de 9q.
	Padre	mos47,XY,+21[3]/46,XY[62]	Mosaico portador de una línea celular baja 47,XY,+21
	Hijo	47,XX,+21	Trisomía 21 regular en 15 metafases con una resolución de 500 bandas
Tol 6	Madre	46,XX	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 450-500 bandas
	Padre	46,XY	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-500 bandas
	Hijo	47,XX,+21	Trisomía 21 regular en 15 metafases con una resolución de 450-500 bandas
Tol 7	Madre	46,XX	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 450-500 bandas
	Padre	46,XY,16qh+	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-500 bandas. Polimorfismo de la heterocromatina pericentromérica de 16q
	Hijo	47,XX,+21	Trisomía 21 regular en 15 metafases con una resolución de 450-500 bandas
CD1	Madre	46,XX	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-450 bandas
	Padre	46,XYqh ⁺ ,22ps ⁺	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 450 bandas. Polimorfismo de la heterocromatina pericentromérica de Yq y un polimorfismo del satélite 22p
	Hijo	47,XX,+21	Trisomía 21 regular en 15 metafases con una resolución de 450 bandas
CD2	Madre	46,XX	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-450 bandas
	Padre	46,XY	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-450 bandas
CD3	Madre	46,XX	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-450 bandas
	Padre	46,XY	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-450 bandas
CD4	Madre	46,XX	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 450-550 bandas
	Padre	46,XY	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 450-500 bandas
	Hijo	47,XY,+21	Trisomía 21 regular en 15 metafases con una resolución de 450-500 bandas
CD5	Madre	46,XX	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 450-550 bandas

	Padre	46,XY	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 450-500 bandas
	Hijo	47,XY,+21	Trisomía 21 regular en 15 metafases con una resolución de 450-500 bandas
CD6	Madre	46,XX,9qh ⁺	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-450 bandas. Polimorfismo con una mayor cantidad de heterocromatina pericentromérica de 9q.
	Padre	46,XY	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-450 bandas
CD7	Madre	46,XX	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 400-500 bandas
	Padre	46,XY	Bandas G normales en 15 metafases con una resolución de 450-500 bandas

El 30% de las 40 parejas analizadas por bandas G presentaron variantes polimórficas normales de las regiones de heterocromatina pericentromérica en los cromosomas 9q, 16q, e Yq, y polimorfismos en tallos y satélites de los cromosomas 13q, 14q, 21q y 22q. Las frecuencias con las que estas variantes fueron detectadas en la población se encuentran indicados en la Tabla XI.

Tabla XI. Polimorfismos detectados por bandas G en las 40 parejas analizadas

Tipo de polimorfismo	Heterocromatina pericentromérica		
	Cromosomas	9q	16q
Frecuencia	9/80	8/80	1/40
Tipo de polimorfismo	Tallos y/o Satélites		
	Cromosomas	13q	13q
Frecuencia	1/80	1/80	1/80

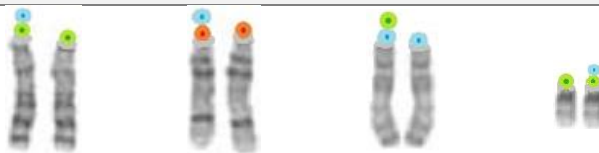
Se determinaron 4 variantes polimórficas, derivadas de la translocación entre los brazos cortos del cromosoma 15 y los brazos cortos de los cromosomas 13,14 y 22. (Tabla XII). El 83.3% (15/18) de todas las translocaciones observadas fueron entre los cromosomas del grupo D t(D;D). Las TCA más comunes, son el der(14)t(14;15) y el der(13)t(13;15), mientras que el der(15)t(13;15) es la variación polimórfica menos común en ambas poblaciones. Solo en la población con descendencia aneuploide se identificó a dos madres y un padre portador de un t(D;G), el der(21)dic(15;21) (familias CD5 y CD6).

No hay diferencia entre la frecuencia de las TCA en parejas con descendencia aneuploide y la población control ($p > 0.05\%$). Es probable que la frecuencia de las TCA en las poblaciones este subestimada debido a que en el presente estudio no se caracterizaron las translocaciones que pudieran ocurrir entre los cromosomas 13 con 21 ni 14 con 22.

Como se observa en la tabla XII. En las parejas con descendencia aneuploide la frecuencia de madres portadoras de TCA es 2.3 veces más (7/20) que la frecuencia con la que las TCA se presentan en las madres control (3/20).

Tabla XII. Detección de TCA en las parejas control y padres con descendencia aneuploide.

Controles			Padres con descendencia aneuploide		
Caso		TCA	Caso		TCA
TCA 61	Madre	sin TCA	NV100T21	Trisomía 21	
	Padre	der(13),t(13;15)		Madre	sin TCA
TCA 62	Madre	sin TCA	Padre	sin TCA	
	Padre	sin TCA	Nv15T21	Madre	der(13)t(13;15)
TCA 65	Madre	sin TCA		Padre	sin TCA
	Padre	sin TCA	32-13	Madre	sin TCA
TCA 66	Madre	sin TCA		Padre	sin TCA
	Padre	sin TCA	201-13	Madre	sin TCA
TCA 68	Madre	sin TCA		Padre	sin TCA
	Padre	sin TCA	204-13	Madre	der(14)t(14;15)
TCA 69	Madre	sin TCA		Padre	sin TCA
	Padre	sin TCA	232-13	Madre	sin TCA
TCA 70	Madre	sin TCA		Padre	sin TCA
	Padre	sin TCA	351-13	Madre	sin TCA
TAC 71	Madre	sin TCA		Padre	sin TCA
	Padre	sin TCA	Tol 5	Madre	sin TCA
TCA 72	Madre	sin TCA		Padre	sin TCA
	Padre	der(14)t(14;15)	Tol 6	Madre	sin TCA
TCA 74	Madre	sin TCA		Padre	sin TCA
	Padre	sin TCA	Tol 7	Madre	sin TCA
TCA 75	Madre	sin TCA		Padre	der(14)t(14;15)
	Padre	sin TCA	CD1	Madre	sin TCA
TCA 76	Madre	der(14)t(14;15)		Padre	sin TCA
	Padre	sin TCA	CD2	Madre	sin TCA
TCA 77	Madre	der(14)t(14;15)		Padre	sin TCA
	Padre	sin TCA	CD3	Madre	sin TCA
TCA 79	Madre	sin TCA		Padre	sin TCA
	Padre	sin TCA	CD4	Madre	der(13)t(13;15)
TCA 80	Madre	sin TCA		Padre	der(13)t(13;15)
	Padre	der(15) t(13;15)	CD5	Madre	der(21)t(15;21)
TCA 81	Madre	sin TCA		Padre	sin TCA
	Padre	der(13)t(13;15)	CD6	Madre	der(21)t(15;21)
TCA 83	Madre	der(14)t(14;15)		Padre	der(21)t(15;21)
	Padre	sin TCA	CD7	Madre	sin TCA
TCA 84	Madre	sin TCA		Padre	sin TCA
	Padre	sin TCA	Trisomía 15		
TCA 85	Madre	sin TCA	TCAT15	Madre	der(15)t(13;15)
	Padre	sin TCA	TCAT15	Padre	sin TCA
TCA 86	Madre	sin TCA	TCAT15	Madre	der(14)t(14;15)
	Padre	der(13)t(13;15)	TCAT15	Padre	sin TCA
Trisomía 13					
TCAT13					
Madre N					
Padre N					



		der(13)t(13;15)	der(14)t(14;15)	der(15), t(13;15)	der(21)t(15;21)	Frecuencia
Controles	Madres	3	4	1	-	8/40
	Padres	-	3	-	-	3/8
Padres con ACA		3	1	1	-	5/8
	Madres	3	3	1	3	10/40
	Padres	2	2	1	2	7/10
	Padres	1	1	-	1	3/10

Frecuencia de los diferentes TCA encontradas en ambas poblaciones.

En cuatro de las once familias analizadas un progenitor es portador de una TCA (3 madres y 2 padres). Solo en una familia (CD5) el cromosoma der(21)t(15;21) fue identificado en una madre e hijo con trisomía 21. Además se identificó una TCA de novo, der(13)t(13;15) en un paciente con trisomía 21 (familia 232-13) ver tabla XIII.

Tabla XIII. Presencia de TCA en 11 pacientes con trisomía 21.

Caso	Padres		Hijo
	Madre	Padre	
32-13	Sin TCA	Sin TCA	Sin TCA
201-13	Sin TCA	Sin TCA	Sin TCA
204-13	der(14)t(14;15)	Sin TCA	Sin TCA
232-13	Sin TCA	Sin TCA	der(13)t(13;15)
351-13	Sin TCA	Sin TCA	N
Tol 5	Sin TCA	Sin TCA	N
Tol 6	Sin TCA	Sin TCA	N
Tol 7	Sin TCA	der(14)t(14;15)	N
CD5	der(21)t(15;21)	N	der(21)t(15;21)
CD4	der(13)t(13;15)	der(13)t(13;15)	N
CD1	Sin TCA	N	N
Frecuencia			2/11

8 Discusión

TCA en la población control

Los brazos cortos de los cinco pares de cromosomas acrocéntricos están compuestos por secuencias repetidas de DNA en tándem, estas secuencias de homología hacen de estas regiones cromosómicas el lugar más común de heteropolimorfismos cromosómicos (Robinson et al. 1994).

Las TCA son translocaciones que involucran a los brazos cortos de dos cromosomas acrocéntricos. En el presente estudio el 20% (8/40) de la población control es portadora de alguna translocación entre el cromosoma 15 y otro cromosoma del grupo D t(D;15). La frecuencia y la variabilidad de estos rearrreglos cromosómicos estructurales no habían sido descritas en poblaciones clínicamente sanas y sin antecedentes de aborto.

El cromosoma der(14)t(14;15) que se presentó en 4/8 TCA en la población control fue descrito por Stergianou (1993), en 12/100 pacientes con retraso mental, retraso en el desarrollo, y en pacientes que habían sufrido abortos recurrentes o eran padres de niños con anomalías cromosómicas conocidas. Stergianou caracterizó dicho plolimorfismo cromosómico 14p mediante un ensayo de hibridación *in situ* con fluorescencia utilizando una sonda centromérica p-TRA25 (alfoide) y una sonda D15Z1 (satélite III), específicas para el cromosoma 15 (Stergianou et al. 1993). Otro tipo de variantes estructurales que involucran a los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos han sido descritas, sin embargo el significado clínico de estos polimorfismos cromosómicos es poco clara.

Origen de las TCA

Haciendo uso del ensayo de hibridación “in situ” con fluorescencia pudimos identificar 4 variantes polimórficas entre el cromosoma 15 y otro cromosoma del grupo D o G. En todas las muestras analizadas los patrones de hibridación de las sondas centroméricas para los cromosomas 13/21 y 14/22 fueron normales, esto nos permite inferir que los puntos de rotura en los cromosomas 13,14, 21 y 22 se localizan contiguos a las secuencias centroméricas alfoides, mientras que los puntos de rotura en el cromosoma 15 podrían localizarse entre 15q11.1 y 15p11.1, donde se localizan además de secuencias de DNA alfoide, secuencias de DNA satélite III.

Las secuencias satélite III están compuestas por motivos GGAGT/ GGAAT, y se ha sugerido que estos repetidos ricos en guanina podrían adoptar estructuras tetradúplex que faciliten eventos de recombinación entre cromosomas no homólogos favorecidos a su vez por la proximidad entre secuencias de homología de las regiones heterocromáticas en los cromosomas acrocéntricos y/o regiones organizadoras nucleolares (NORs) durante la profase de la meiosis y la interfase en células somáticas (Gravholt et al. 1992; Bandyopadhyay et al. 2001b). Las TCA también podrían ser consecuencia de un evento de recombinación anormal mediado por una verdadera sinapsis entre cromosomas no homólogos. (Daniel & Lampotang 1976). No existe evidencia directa sobre el origen de las TCA, no obstante en los 18 pacientes a los que se identificó como portadores de una TCA, presentaron este tipo de rearrreglo cromosómico de manera constitutiva, lo que podría suponer un origen precigótico. Sin embargo únicamente fueron analizadas mediante FISH 20 metafases por individuo lo que no descarta la posibilidad de mosaicismo celular, el cual sugeriría que las translocaciones crípticas entre dos cromosomas acrocéntricos no homólogos son de origen mitótico (Robinson et al. 1994).

Los cromosomas acrocéntricos comparten patrones complejos de homología inter cromosómica y no hay evidencia que explique por qué el 83.3% (15/18) de todas las translocaciones observadas fueron entre los cromosomas del grupo D t(D;D), si la distribución cromosómica de las diferentes subfamilias de DNA (α -DNA y SATIII) no varía entre los cromosomas 13 con 21 o 14 con 22 (Bandyopadhyay et al. 2001a; Fisher et al. 1997). No obstante se ha demostrado mediante ensayos de hibridación “in situ” con fluorescencia en condiciones de alta astringencia, que la sonda D15Z1 hibrida con los brazos cortos de otros cromosomas del grupo D (Stergianou et al. 1993). Por lo tanto los cromosomas 13 y 14 contienen secuencias relacionadas a D15Z1 en un bajo número de copias. Si se demuestra que los puntos de rotura implicados en las translocaciones crípticas en los cromosomas acrocéntricos se localizan en estas regiones de hibridación de la sonda D15Z1, entonces esto explicaría por qué las t(D;D) son más frecuentes que las t(D;G).

El hecho de que la sonda D15Z1 hibride con los brazos cortos de otros cromosomas del grupo D, nos obliga a considerar que los polimorfismos observados podrían ser resultado de eventos de amplificación intercromosómica y no de una translocación entre los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos, el mecanismo de ruptura inducido mediado por microhomología (MMBIR) es un modelo molecular que podría explicar la amplificación intercromosómica de secuencias homólogas de la sonda D15Z1 en los cromosomas 13 y 14 (Stergianou et al. 1993; Hastings et al. 2009).

Asociación entre las TCA y la generación de descendencia aneuploide

Estudios recientes han demostrado que las secuencias repetitivas pericentroméricas contribuyen en el reconocimiento de los cromosomas homólogos durante la meiosis y tienen una posible participación en la función del centrómero, (Bandyopadhyay et al. 2001b) por lo que se ha propuesto que los cromosomas derivados y sus cromosomas homólogos normales involucrados en una translocación criptica sinaptan para dar lugar a una sola estructura meiótica compleja, en la que la orientación misma de los cromosomas modifican la asociación de estos con las fibras del huso meiótico, lo que compromete el éxito de la segregación de los cromosomas homólogos a polos opuestos, resultando en la producción de gametos aneuploides. (Cockwell et al. 2003).

Este mecanismo supone que solo los cromosomas involucrados en la translocación presentarán un mayor riesgo de no disyunción. La evidencia de que portadores de variantes polimórficas del cromosoma 21, der(21)t(15;21) solo fueron descritos en dos familias con hijos con trisomía 21 y no en la población control, apoyan esta suposición. Al respecto Ramos et al. (2008) determinaron mediante un ensayo de Hibridación *“in situ”* con fluorescencia (FISH) con sondas para la región crítica 21q, que la disomía del cromosoma 21 es significativamente más frecuente en los espermatozoides de un padre portador de un cromosoma der(21)dic(21;22) en comparación con sujetos controles.

Se ha demostrado que los patrones en la no disyunción son similares para las trisomías 13, 14, 15, 21, y 22. (Hassold et al. 2007). Sin embargo, parecería que solo ciertas variantes estructurales podrían estar implicadas directamente en la generación de las diferentes aneuploidias de los cromosomas acrocéntricos. Los cromosomas der(14)t(14;15) y der(15)t(13;15) son los rearrreglos estructurales más comunes tanto en parejas control como parejas con descendencia aneuploide por lo que es posible que la presencia de estas variantes polimórficas no tengan una influencia directa en la generación de trisomías, aunque 2 de las 2 madres con hijos con trisomía 15 analizadas, fueron portadoras de estos cromosomas derivados.

Con el presente estudio no es posible determinar la presencia de aquellas translocaciones ocurridas entre los cromosomas 13/21 o 14/22, no obstante podríamos sugerir que las TCA ocurridas entre estos cromosomas podrían no

implicar un riesgo en la generación de aneuploidias, debido a que los cromosomas 13 con 21 o 14 con 22 comparten secuencias alfoides (α -DNA) y presentan altos grados de homología entre las diferentes subfamilias de DNA satélite III, lo que podría minimizar el riesgo de apareamientos heterosinápticos entre los cromosomas derivativos con sus homólogos normales y así se garantizaría una segregación cromosómica normal de los cromosomas involucrados en la translocación (Bandyopadhyay et al. 2001b; Fisher et al. 1997)

La frecuencia con la que los plimorfismos cromosómicos se presentan en madres de individuos con aneuploidía, sin importar los cromosomas involucrados en la translocación, es 2.3 veces más frecuente que en las madres control, esto abre la posibilidad de que la presencia de una TCA podría afectar la segregación cromosómica normal de otros cromosomas acrocéntricos aunque estos no se encuentren implicados en la translocación.

No existe diferencia significativa entre las frecuencias de las TCA en padres de hijos con descendencia aneuploide (10/40) y la población control (8/40), sin embargo se ha demostrado que las regiones de heterocromatina pericentromérica tienen un rol esencial en la correcta disyunción de los cromosomas homólogos durante meiosis I (Bandyopadhyay et al. 2001a) y se sabe que la mayoría de las aneuploidias en humanos ocurren por errores durante la meiosis materna y que los errores en la segregación cromosómica en MI son más frecuentes que los ocurridos en MII (Nagaoka et al. 2012). Por esta razón el estudio de las frecuencias de las TCA en madres de hijos con aneuploidía y madres de hijos clínicamente sanos podrían ser un mejor indicador para determinar si existe una asociación entre la presencia de translocaciones cripticas de cromosomas acrocéntricos (TCA) y la generación de aneuploidias.

9 Conclusiones

Los polimorfismos cromosómicos mas frecuentes son los que involucran a los brazos cortos del cromosoma 15

Existe diferencia entre la frecuencia con la que se presentan las TCA en madres de hijos con aneuploidias de los cromosomas acrocéntricos en comparación a las madres en la población control, por lo que estos polimorfismos cromosómicos podrían ser un factor etiológico en la no disyunción de los cromosomas acrocéntricos.

Es necesario realizar un estudio de detección de TCA en una muestra poblacional más grande para establecer la frecuencia de las translocaciones cripticas en hombres y mujeres en la población en general y con descendencia aneuploide .

10 Referencias

- Bandyopadhyay, R., Mcquillan, C., et al., (2001) Identification and characterization of satellite III subfamilies to the acrocentric chromosomes. *Chromosome Research*, 9, pp.223–233.
- Bandyopadhyay, R., Berend, S.A., et al., (2001). Satellite III sequences on 14p and their relevance to Robertsonian translocation formation. *Chromosome Research*, 9, pp.235–242.
- Blennow, E., (2005). Banding Techniques. *Encyclopedia of life sciences*, pp.1–5.
- Cockwell, A.E. et al., (2003). A study of cryptic terminal chromosome rearrangements in recurrent miscarriage couples detects unsuspected acrocentric pericentromeric abnormalities. *Human genetics*, 112(3), pp.298–302.
- Daniel, A. & Lampotang, P., (1976). Structure and inheritance of some heterozygous Robertsonian translocations in man. *Medical Genetics*, 13, pp.381–388.
- Fisher, C. et al., (1997). Human centromeric DNAs. *Human genetics*, 100, pp.291–304.
- Frías, S. et al., (2012). Cromosomas y patología cromosómica. In *Genética clínica*. Mexico: Manual Moderno, pp. 101–122.
- Gardner, Mk.R., Sutherland, G.R. & Shaffer, L.G., (2012)a. Elements of medical cytogenetics. In *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling*. pp. 3–20.
- Gardner, Mk.R., Sutherland, G.R. & Shaffer, L.G., (2012)b. The origin and consequences of chromosome pathology. In *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling*. pp. 27–58.
- Gravholt, C.H. et al., (1992). Breakpoints in Robertsonian Translocations Are Localized to Satellite III DNA by Fluorescence in Situ Hybridization. *Genomics*, 14, pp.924–930.
- Hassold, T., Hall, H. & Hunt, P., (2007). The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Human molecular genetics*, 16, pp.203–208.
- Hastings, P., Ira, G. & Lupski, J., (2009). A Microhomology-Mediated Break-Induced Replication Model for the Origin of Human Copy Number Variation. *Plos genetics*, 5(1).

- Kaiser-Rogers, K. & W. Rao, K., (2013). Structural Chromosome Rearrangements. In *The Principles of Clinical Cytogenetics*. Springer, pp. 139–174.
- Kato, T. et al., (2011). DNA secondary structure is influenced by genetic variation and alters susceptibility to de novo translocation. *Molecular cytogenetics*, 4(1), p.18.
- Keagle, M. & Gersen, S., (2013). Basic Cytogenetics Laboratory Procedures. In *The Principles of Clinical Cytogenetics*. Springer, p. 53.
- Kurahashi, H. et al., (2010). Cuciform DNA Structure Underlies the Etiology for Palindrome-mediated Human Chromosomal Translocations. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(34), pp.35377–35383.
- Lacadena, J.R., (1996). *Citogenética* 1era ed., Madrid: Complutense.
- Ledbetter, D.H., (1992). Minireview: cryptic translocations and telomere integrity. *American journal of human genetics*, 51(3), pp.451–456.
- Nagaoka, I., Hassold, T. & Hunt, P., (2012). Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nature*, 13(7), pp.493–504.
- Powell, C., (2013). Sex chromosomes disorders. In *The Principles of Clinical Cytogenetics*. Springer, pp. 178–185.
- Ramos, S. et al., (2008). Acrocentric Cryptic Translocation Associated With Nondisjunction of Chromosome 21. *American journal of medical genetics*, 102, pp.97–102.
- Robinson, W.P. et al., (1994). A Somatic Origin of Homologous Robertsonian Translocations and Isochromosomes. *American journal of human genetics*, 14, pp.290–302.
- Sakai, K. et al., (1995). Human Ribosomal RNA Gene Cluster: Identification of the Proximal End Containing a Novel Tandem Repeat Sequence. *Genomics*, 526, pp.521–526.
- Shaffer, L.G., (2005). Karyotype Interpretation. *Encyclopedia of life sciences*, pp.1–7.
- Slovak, Marylin; Theisen, A. & Shaffer, L., (2013). Human Chromosome Nomenclature: An Overview and Definition of Terms. In *The Principles of Clinical Cytogenetics*. Springer, pp. 23–47.
- Solari, J.A., (2007). Cariotipo humano y cromosomopatías. In *Genética humana: fundamentos y aplicaciones en medicina*. panamericana, p. 337.

- Speicher, M.R. & Carter, N.P., (2005). The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nature*, 6(10), pp.782–92.
- Stergianou, K. et al., (1993). A DA/DAPI positive human 14p heteromorphism defined by fluorescence in-situ hybridisation using chromosome 15-specific probes D15Z1 (satellite III) and p-TRA-25 (alphoid). *Hereditas*, 119(2), pp.105–10.
- Vorsanova, S.G. et al., (2005). Evidence for high frequency of chromosomal mosaicism in spontaneous abortions revealed by interphase FISH analysis. *Histochemistry and cytochemistry*, 53(3), pp.375–80.
- Wang, J., (2013). Autosomal Aneuploidy. In *The Principles of Clinical Cytogenetics*. Springer, pp. 113–137.
- Warburton, D., (2005). Chromosome Analysis and Identification. *Encyclopedia of life sciences*, pp.1–8.

11 Anexos

Anexo I: Carta de consentimiento informado.

Proyecto: Detección de translocaciones cripticas de los cromosomas acrocéntricos en familias con descendencia aneuploide.

Esta usted invitado a participar en el proyecto de investigación cuyo responsable es la Dra. Sara Frías Vázquez. El propósito de la investigación es la búsqueda de un tipo de alteraciones cromosómicas llamadas “translocaciones cripticas de cromosomas acrocéntricos” o TCA, en parejas con hijos sanos y en parejas que hayan tenido uno o más descendientes con alteraciones cromosómicas del tipo ganancia o pérdida. Este estudio servirá para determinar la frecuencia de estas variantes cromosómicas en las dos poblaciones antes mencionadas. A futuro, esta información podría utilizarse para conocer si existe asociación entre estas variantes cromosómicas y los mecanismos que intervienen en la ganancia o pérdida de cromosomas en el genoma humano.

Los procedimientos a realizar serán: se tomara con aguja y jeringas nuevas, una muestra de sangre de 10 mililitros de una vena del brazo, en dos tubos. El procedimiento puede causar dolor leve o molestia al pinchar con la aguja durante la extracción de sangre y pueden presentarse complicaciones mínimas como la formación de un “moretón” o infección en el sitio de punción, pero el riesgo es muy bajo y se reduce al tener durante el procedimiento condiciones de comodidad, limpieza y personal capacitado. Con la muestra de sangre, se hará un cultivo de células de las cuales se obtendrán cromosomas y se les realizara un tratamiento llamado hibridación “in situ” con fluorescencia que permite detectar las translocaciones cripticas de los cromosomas acrocéntricos. Es probable que el único beneficio directo por su participación sea el que se pueda recibir un asesoramiento genético sobre el pronóstico reproductivo de la pareja, o que el beneficio sea para otros pacientes con el mismo problema.

En todo momento se guardara la confidencialidad de la procedencia de las muestras, ya que en todos los procedimientos no se manejan nombres sino códigos de pacientes. Todos los resultados obtenidos de este estudio serán absolutamente confidenciales y solo le serán proporcionados a quien usted lo decida.

Su participación es completamente voluntaria, pueden decidir no participar sin que esto repercuta en su relación con el grupo medico ni en la atención que se les brinde. No habrá un costo extra por los estudios y consultas derivadas de este protocolo de investigación

Cualquier duda podrá, resolverla con la investigadora responsable Dra. Sara Frías al teléfono 01845533, Instituto Nacional de Pediatría

Consentimiento:

He leído este documento, se me han resuelto las dudas que eh tenido y acepto participar en el estudio y recibo copia de este documento

Nombre y Firma: _____

Anexo 2: Preparación de reactivos

Cosecha de linfocitos a partir de sangre periférica

- **Colchicina**
Solución stock: Se pesan 0.02g de colchicina (C₂₂H₂₅NO₆) y se disuelven en 20 ml de solución salina de "Hank's"
Solución de trabajo: Se hace una dilución 1:20 de la solución stock: 0.1ml solución stock en 2 ml de solución isotónica
- **Solución hipotónica:** Se pesan 5.600 g de KCL y se disuelven en 1L de H₂O (pH 7.0)

Bandas G utilizando Tripsina y teñidas con Giemsa

- **Tripsina**
Solución stock: Se pesan 0.015 g tripsina y 0.01g EDTA en 1ml de H₂O destilada por cada alícuota.
Solución de trabajo: En un vaso Coplín se agregan 50 ml de buffer Gurr y una alícuota de la solución stock el pH se ajusta a 7 con NaHCO₃
- **Buffer Sörensen:** Se pesan 6.64g de KH₂PO₄ (SIGMA® 99.8% pureza) y 2.56 g de Na₂HPO₄ (Grado CP). Solubilizar en 1L H₂O destilada (pH 7)
- **Buffer Gurr:** Diluir una tableta de buffer Gurr® en 1 L de solución fisiológica.
- **Wright:** En un vaso Coplín se filtran 25 ml de Eosina azul de metileno en solución según Wright (MERCK ®) una vez filtrado el colorante se diluye con 25 ml de buffer Sörensen (proporciones 1:1)
- **Giemsa:** En un vaso Coplín se filtran 12 ml de Azur-eosina Azul de metileno según Giemsa en solución (MERCK®) una vez filtrado el colorante se diluye en 38 ml de buffer Sörensen (proporciones 1:3)

Hibridación "in situ" con fluorescencia (FISH)

- **Solución 20X SSC:** Se mezclan 132g 20X SSC en 400ml de H₂O purificada. Se ajusta el pH a 5.3 con HCL. Se afora a 500ml con H₂O purificada.
- **Solución de lavado 2X SSC/ 0.1% NP-40:** Se mezclan 100 ml de 20X SSC (pH 5.3) con 850 ml de H₂O purificada. Se adiciona 1 ml NP-40, y se mezcla hasta que el NP-40 está completamente disuelto. Se ajusta el pH a 7.0+-0.2 con NaOH, y se afora a 1L con H₂O purificada.
- **Solución 2X SSC/ 0.3% NP-40:** Se mezclan 100 ml de 20X SSC (pH 5.3) con 850 ml de H₂O purificada. Se adiciona 3 ml NP-40, se mezcla hasta que el NP-40 está completamente disuelto. Se ajusta el pH a 7.0+-0.2 con NaOH, y se afora a 1L con H₂O purificada.

- **Solución 0.4X SSC/ 0.3% NP-40:** Se mezclan 20 ml de solución 20X SSC (pH 5.3) con 950 ml de H₂O purificada. Se adiciona 3 ml NP-40, y se mezcla hasta que el NP-40 está completamente disuelto. Se ajusta el pH a 7.0-7.05 con NaOH, y se afora a 1L con H₂O purificada.

Nota: Es recomendable medir y ajustar los pH a temperatura ambiente haciendo uso de un pH-metro con electrodo de vidrio.

Estas soluciones se almacenan a temperatura ambiente, por un tiempo máximo de 6 meses y no deberán ser utilizadas si la solución aparenta estar contaminada.

- **Soluciones de Etanol (75%,85% y 100%):** Preparar diluciones v/v de Etanol al 100% con H₂O destilada para hacer soluciones al 75%, y 85%.