



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

Descripción clínica y citogenética de
alteraciones del cromosoma 9 en el
Hospital Infantil de México Federico
Gómez

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN :

GENÉTICA MÉDICA

P R E S E N T A :

Dr. Omar Spencer Aguilar Reyes



TUTOR:
DR. H. Rodrigo Moreno Salgado



CIUDAD DE MÉXICO

FEBRERO 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

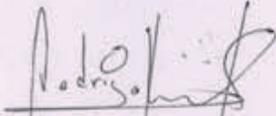


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.



Dr. Herbey Rodrigo Moreno Salgado
Jefe de Departamento Genética
Hospital Infantil de México Federico Gómez



Dra. Constanza García Delgado
Médico adscrito al Departamento de Genética
Hospital Infantil de México Federico Gómez



Dra. América Villaseñor Domínguez
Médico adscrito al Departamento de Genética
Hospital Infantil de México Federico Gómez

Dr. Sarbelio Moreno Espinosa
Director de enseñanza y Desarrollo Académico
Hospital Infantil de México Federico Gómez

DEDICATORIAS

ÍNDICE

1. Introducción.....	6
2. Marco teórico.....	7
2.1 Bases moleculares de la herencia.....	7
2.1.1 Organización del DNA y estructura cromosómica.....	7
2.1.2 Ciclo celular.....	15
2.1.3 Alteraciones cromosómicas.....	20
2.2 Técnicas citogenéticas.....	27
2.2.1 Cariotipo.....	27
2.2.2 Hibridación in situ con fluorescencia.....	30
2.2.3 Hibridación comparativa en plataforma de microarregos.....	30
2.3 Estructura del cromosoma 9.....	33
2.3.1 Alteraciones numéricas.....	34
2.3.2 Alteraciones estructurales.....	35
3. Planteamiento del Problema.....	38
4. Pregunta de investigación.....	39
5. Justificación.....	40
6. Hipótesis.....	41
7. Objetivos.....	42
7.1 Objetivo General.....	42
7.2 Objetivos específicos.....	42
8. Métodos.....	43
9. Resultados.....	47
9.1 Frecuencia de alteraciones del cromosoma 9 en el HIMFG.....	47
9.2 Caso clínico representativo.....	52
9.2.1 Resultados de la evaluación clínica.....	52
9.2.2 Resultados del estudio citogenético.....	54
9.2.3 Resultados del estudio de microarreglos SNPs.....	56

10. Discusión.....	59
10.1 Discusión de los resultados del estudio de frecuencia de alteraciones.....	59
10.2 Discusión del caso clínico presentado.....	61
11. Conclusiones.....	67
12. Cronograma de actividades.....	68
13. Referencias bibliográficas.....	69
14. Limitación del estudio.....	79
15. Anexos.....	80
Anexo 1: Técnica de Cariotipo con Bandas GTG.....	80
Anexo 2: Técnica de Hibridación In Situ con Fluorescencia (FISH).....	87
Anexo 3: Técnica de Hibridación Genómica Comparativa (aCGH)	93
Anexo 4: Consentimiento informado para toma de fotografías clínicas.	95
Anexo 5: Consentimiento para toma de muestra de sangre periférica para estudio de cariotipo con bandas GTG.....	96

1. INTRODUCCIÓN

Las cromosomopatías son padecimientos que resultan de una cantidad mayor o menor de material hereditario o de alteraciones en la que no se pierde ni se gana material genético pero se afecta la estructura de los cromosomas. Son la causa de anomalías congénitas entre el 0.7 y 1.5% de recién nacidos vivos (Warren et al., 2009). Estas anomalías contribuyen significativamente a la incidencia de pérdida gestacional, infertilidad, muerte fetal, anomalías congénitas múltiples, desarrollo sexual anormal y discapacidad intelectual. Están presentes en al menos el 50% de los abortos espontáneos, el 6% de los mortinatos, 5% de las parejas con dos o más abortos involuntarios y aproximadamente el 0,5% de los recién nacidos (Gersen & Keagle, 2013; Loane et al, 2013).

Las anomalías específicas de los cromosomas se han asociado con más de 100 síndromes identificables (Reddy et al., 2012). Las alteraciones del cromosoma 9 contribuyen de forma importante a malformaciones congénitas múltiples, por lo que es necesario conocer las características distintivas de estas anomalías según las alteraciones observadas en los estudios citogenéticos. En esta tesis, se realizó una descripción clínica y citogenética de las alteraciones en el cromosoma 9 identificadas en el Hospital Infantil de México Federico Gómez, durante el periodo de 2010 al 2019.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 BASES MOLECULARES DE LA HERENCIA.

El genoma nuclear humano está compuesto por 3000 millones de pares de bases (3×10^9) las cuales codifican para aproximadamente 44,438 genes. Sólo el 1.6-2% del genoma (20,438 genes) es codificante para una proteína, el resto consiste en secuencias repetidas y secuencias cuya función aún no se conoce, pero se asume que es regulatoria (Elkon & Agami, 2017). Toda esta información se encuentra en las 24 moléculas llamadas cromosomas, 22 autosomas y dos cromosomas sexuales (X ,Y) (Kass & Batzer, 2004). Los niveles de organización genética indican la forma en la cual se compacta el DNA junto con las histonas y otras proteínas hasta su nivel máximo, el cromosoma, durante la división celular (Kass & Batzer, 2004).

2.1.1 ORGANIZACIÓN DEL DNA Y ESTRUCTURA CROMOSÓMICA.

El DNA o ácido desoxirribonucleico es una macromolécula biológica en forma de doble hélice compuesta por dos cadenas antiparalelas, cada una constituida por varias unidades llamadas nucleótidos. Cada nucleótido está formado por tres componentes químicos: un grupo fosfato (PO_4^{3-}), un azúcar (2'-desoxirribosa) y una base nitrogenada. La base nitrogenada puede ser una purina, adenina (A) o guanina (G); o bien una pirimidina, timina (T) o citosina (C). Las bases nitrogenadas se enlazan a la desoxirribosa para formar un nucleósido a través de un enlace N-glucosídico, en el cual el nitrógeno 1 de una pirimidina o el nitrógeno 9 de una purina, se unen al carbono 1' de la 2'-desoxirribosa. El grupo fosfato se une al carbono 5' de la 2'-desoxirribosa de un nucleósido para formar un nucleótido mediante un enlace fosfoéster. Los nucleótidos se unen para formar cada cadena de polinucleótidos mediante un enlace fosfodiéster, en el cual el grupo 3'-hidroxilo de la 2'-desoxirribosa de un nucleótido se une a el grupo 5'-fosfato de otro nucleótido. En el inicio de cada cadena, el grupo 5'-fosfato se encuentra libre, sin formar enlaces, por lo que a esta región de la secuencia se le denomina **extremo 5'**; así mismo, en el final de cada cadena, el grupo 3'-hidroxilo libre se encuentra sin

formar enlaces por lo que a esta región de la secuencia se le conoce como **extremo 3'** (Watson, 2008).

Los grupos fosfato y los azúcares, quedan hacia el exterior de la molécula y las bases nitrogenadas se encuentran en el centro de la doble hélice (Stratchan & Read, 2006). Las bases nitrogenadas forman puentes de hidrógeno en un código de apareamiento definido por Erwin Chargaff en 1948, en el que una G sólo puede unirse a una C mediante tres puentes de hidrógeno, mientras que una A sólo puede unirse a T con dos puentes de hidrógeno. Estos enlaces son los que mantienen unidas a las dos cadenas y dan estabilidad a la estructura helicoidal (Krebs, Goldstein & Kilpatrick, 2014).

Las dos cadenas de nucleótidos que conforman una molécula de DNA están dispuestas en forma antiparalela y se encuentran trenzadas formando una hélice dextrógira que tiene casi diez pares de bases por vuelta (3.4 nm) (Weil, 2013). La conformación de la hélice da lugar a la formación de dos surcos: el mayor (2.2 nm) y el menor (1.2 nm) (Figura 1). La información genética se encuentra organizada y empaquetada en complejos de DNA y proteína conocida como **cromatina** (Kass & Batzer, 2004). La cromatina se puede compactar en estructuras de diferentes niveles como son el nucleosoma, solenoide, roseta, eucromatina, heterocromatina, hasta llegar al máximo nivel de empaquetamiento que es un cromosoma.

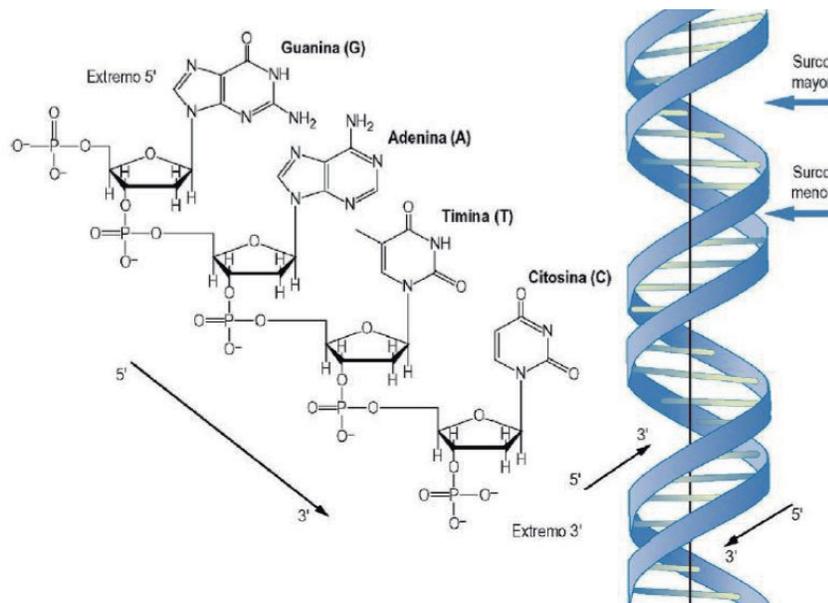


Figura 1. Estructura del DNA. Modificado de *Bioquímica Médica*. Baynes & Dominiczak, 2019.

NIVELES DE ORGANIZACIÓN DEL DNA

NUCLEOSOMA (FIBRA DE 10nm).

Existen niveles de empaquetamiento de la cromatina; el primer nivel de empaquetamiento se llama **nucleosoma**, el cual está formado por 146 nucleótidos de la doble hélice que se enrollan alrededor de un núcleo proteico de ocho histonas (dos H2A, dos H2B, dos H3 y dos H4), formando un ovillo de 1.7 vueltas (Luger & Hansen, 2005). Los extremos N-terminal de las histonas son los sitios en los que se realizan modificaciones químicas como la metilación, la acetilación o la fosforilación, las cuales contribuyen a la modulación de la expresión génica permitiendo o bloqueando el acceso de la maquinaria de transcripción a la cromatina. Cada nucleosoma tiene unida una novena histona, la H1 o de enlace, la cual previene que el nucleosoma se deslice o gire sobre el DNA.

Mientras que la cantidad de pares de bases por nucleosoma es fija, entre cada nucleosoma hay una cantidad variable de pares de base que oscila entre 15 y 55, dando un total de 200 pares de bases aproximadamente (Rando & Chang, 2009). La estructura de una cadena extendida de nucleosomas se asemeja a un collar de perlas con un diámetro de 10 nm, a esta conformación de la cromatina también se le conoce como la “fibra de 10 nm” (Woodcock, 2006). Un esquema de la estructura del nucleosoma se muestra en la Figura 2.

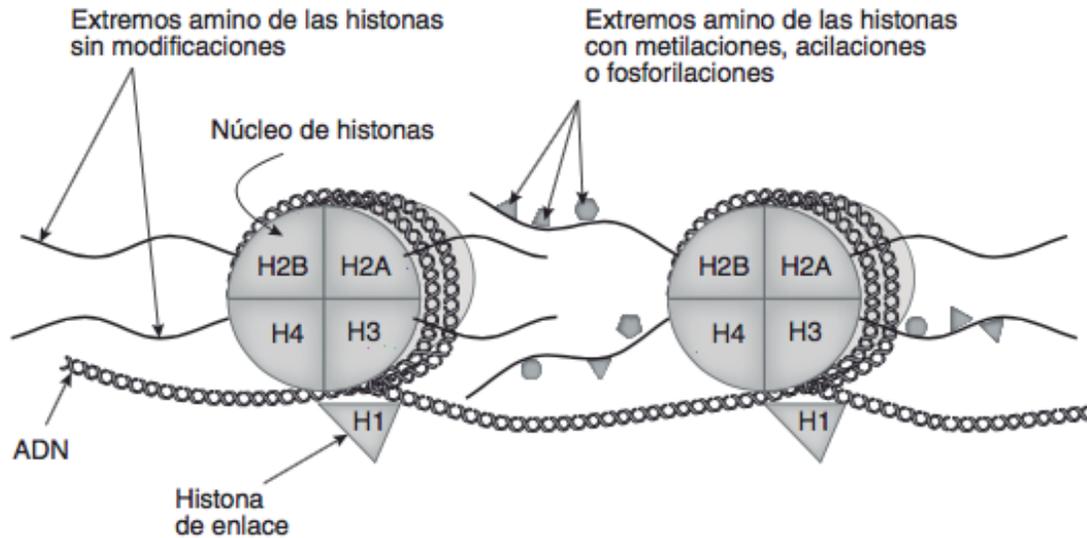


Figura 2. Estructura del nucleosoma. Se muestran dos nucleosomas con su núcleo de histonas, rodeados por 1.7 vueltas de DNA y mantenidos en posición por la histona H1. Se esquematizan los extremos amino de las histonas, donde se presenta una variedad de modificaciones representadas por diferentes figuras geométricas. Modificado de *Bioquímica Médica. Baynes & Dominiczak, 2019.*

SOLENOIDE (FIBRA DE 30nm).

La cromatina es aún más compleja y se compacta en un segundo nivel, en el cual seis nucleosomas se ordenan en forma helicoidal para dar origen a una fibra de 30 nm de diámetro, también denominada **solenoides**. Los seis nucleosomas presentan una variedad de conformaciones que pueden variar de un estado relajado a uno compacto (Woodcock, 2006). La conformación “relajada” o “abierta” permite que las proteínas reguladoras y la RNA polimerasa tengan acceso al DNA y por tanto representa a la cromatina con actividad transcripcional; la conformación “condensada” o “cerrada” dificulta el acceso de las proteínas reguladoras al DNA y por tanto hay represión en la transcripción (Robinson & Rodes, 2006) (Figura 3).

ROSETA O (FIBRA DE 840 nm)

Las fibras de 30 nm forman grandes asas que contienen entre 50 y 100 vueltas de seis nucleosomas. En su base, estas asas se mantienen unidas a una matriz proteica por

regiones denominadas MARs (por sus siglas en inglés, *matrix attachment regions*), que interaccionan con un grupo de proteínas denominadas MARBPs (por sus siglas en inglés, *MAR binding proteins*) (Robinson & Rhodes, 2006). A la matriz proteica están asociadas muchas otras proteínas, como topoisomerasas, proteínas del grupo HMGs (por sus siglas en inglés, *high mobility group proteins*), nucleoplasmina, cohesinas y motores moleculares. Las asas de la fibra de 30 nm están adosadas en sus bases al andamiaje de la matriz proteica y forman a su vez una estructura de 840 nm de diámetro llamadas rosetas e integradas por 18 asas aproximadamente (Figura 3) (Rando & Chang, 2009).

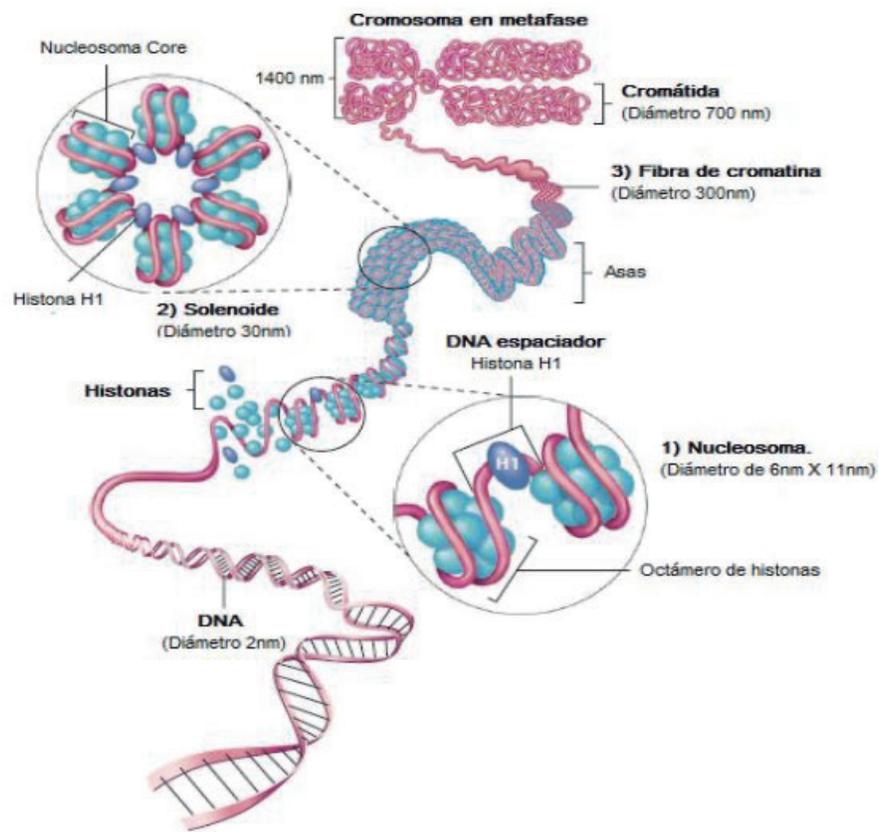


Figura 3. Diferentes niveles de estructuración del DNA. Se muestra la doble hélice con sus dos cadenas antiparalelas, la fibra de nucleosomas de 10 nm, la fibra de 30 nm con seis nucleosomas por vuelta, las asas que forman la fibra de 30 nm unidas en su base a una matriz proteica, las rosetas de 840 nm y un cromosoma condensado. Modificado de *Concepts of Genetics*, W. S. Klung, 2013.

CROMOSOMA.

La palabra cromosoma se deriva del griego *chroma* (color) y *soma* (cuerpo). Esta estructura es el grado máximo de compactación del DNA (Figura 3). Los cromosomas se visualizan como estructuras individuales durante la mitosis, específicamente durante la profase tardía o en la metafase. En los humanos el DNA está empaquetado en 23 pares de cromosomas, 22 pares de autosomas (cromosomas no sexuales) y un par de cromosomas sexuales (XX en mujeres y XY en hombres) (Rando & Chang, 2009).

ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN DE LOS CROMOSOMAS.

Cada cromosoma está formado por dos cromátides unidas por un centrómero o constricción primaria, tiene un brazo corto (p), un brazo largo (q) y a sus extremos se les denomina telómeros (Stratchan & Read, 2006). De acuerdo a la localización del centrómero los cromosomas se clasifican en (Figura 4):

- a. Metacéntrico: el centrómero está en la parte media y los brazos son iguales en longitud.
- b. Submetacéntrico: el centrómero está situado hacia uno de los extremos, quedando un brazo corto y uno más largo.
- c. Acrocéntrico: El centrómero está desplazado hacia uno de los extremos, quedando un brazo corto reducido.

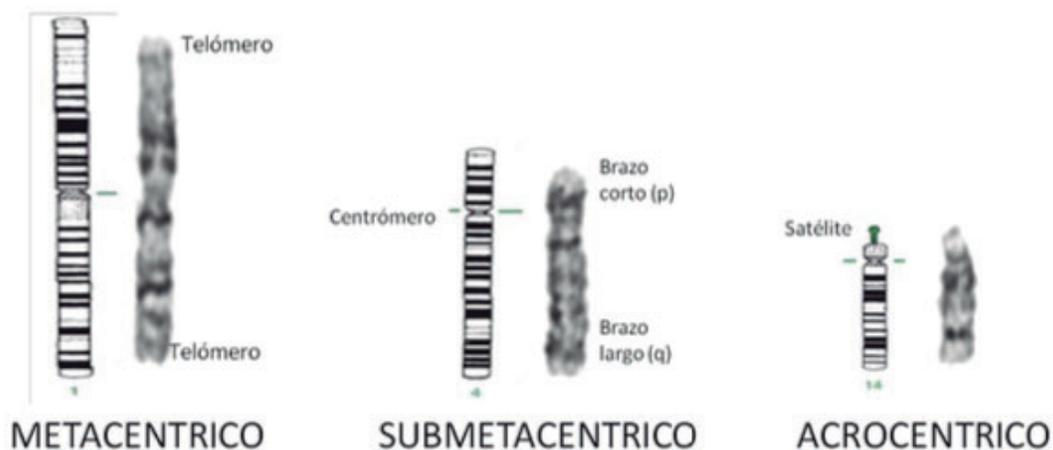


Figura 4. Clasificación de los cromosomas por la localización del centrómero. De izquierda a derecha están: cromosoma metacéntrico, cromosoma submetacéntrico y cromosoma acrocéntrico. Imagen modificada de Gardner, 2012, con imágenes del Laboratorio de Citogenética, HIMFG.

CENTRÓMERO.

Como parte importante de los cromosomas está el centrómero que es el sitio de ensamblaje para el cinetocoro. Éste coordina el movimiento cromosómico en mitosis y meiosis mediante la unión de los cromosomas al huso; sincroniza la formación de heterocromatina, la cohesión de cromátidas hermanas así como la condensación cromosómica. En el centrómero se encuentra DNA repetido de tipo α satélite, en el que se encuentran sitios de unión para proteínas específicas del centrómero (Grewal & Jia, 2007). Las proteínas CENP-A, CENP-B Y CENP-C son componentes del centrómero que forman un complejo precinetocoro. La proteína CENP-A, una histona H3 modificada, es la que inicia el ensamblaje del cinetocoro y es requerida para reclutar otras proteínas del complejo pericentromérico. El resto de las proteínas CENP-B, y CENP-D hasta CENP-W se encargan de la estructura tridimensional del cinetocoro durante la división celular (Przewloka & Glover, 2009; Ogiyama & Ishi 2012). Una visión esquemática del cinetocoro se muestra en la Figura 5.

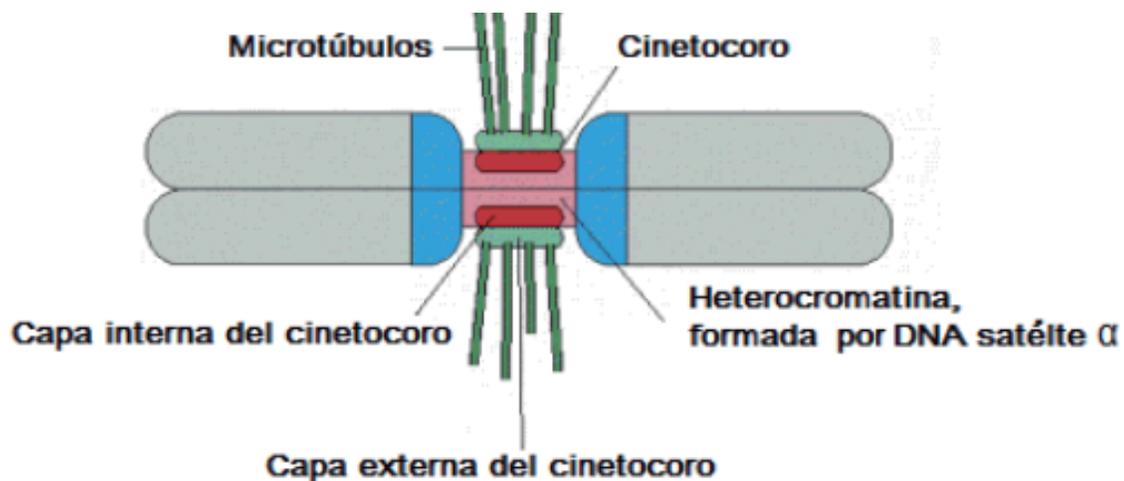


Figura 5. Estructura del cinetocoro. Modificada de *Bioquímica Médica*. Baynes & Dominiczak, 2019.

TELÓMERO.

Los telómeros son los extremos cromosómicos y están formados por secuencias repetitivas en tándem ricas en G. Tienen como función proteger al cromosoma del acortamiento que se realiza durante cada división celular y llevan a cabo actividades de reparación del DNA (Hansen et al., 2005). Reciben su nombre del griego *telos* (terminal)

y *meros* (parte). La longitud de los telómeros es crucial para la supervivencia de las células y su extensión activa se ha descrito en células con transformación neoplásica, permitiendo su escape a la senescencia celular. El telómero está constituido por una secuencia de aproximadamente 10 kb que consiste en arreglos de repetidos 5'-(TTAGGG)-3'. En el extremo 3' termina con una cadena de DNA que sobresale unos 50-400 nucleótidos, y este extremo se enrolla en un asa en forma de T (Galati et al., 2013). El complejo proteico que protege al telómero se conoce como Complejo de la Shelterina (de *shelter*, refugio en inglés) y está compuesto por los polipéptidos TRF1, TRF2, TIN2, POT1, TPP1 y RAP1. La telomerasa es una enzima que se encarga de la replicación del DNA en los telómeros, está compuesta por un complejo enzimático (TERT) que tiene una función de transcriptasa reversa y un componente de RNA no codificante (TERC) que sirve como molde para la síntesis de novo, como se observa en la Figura 6 (Heidenreich & Kumar, 2017).

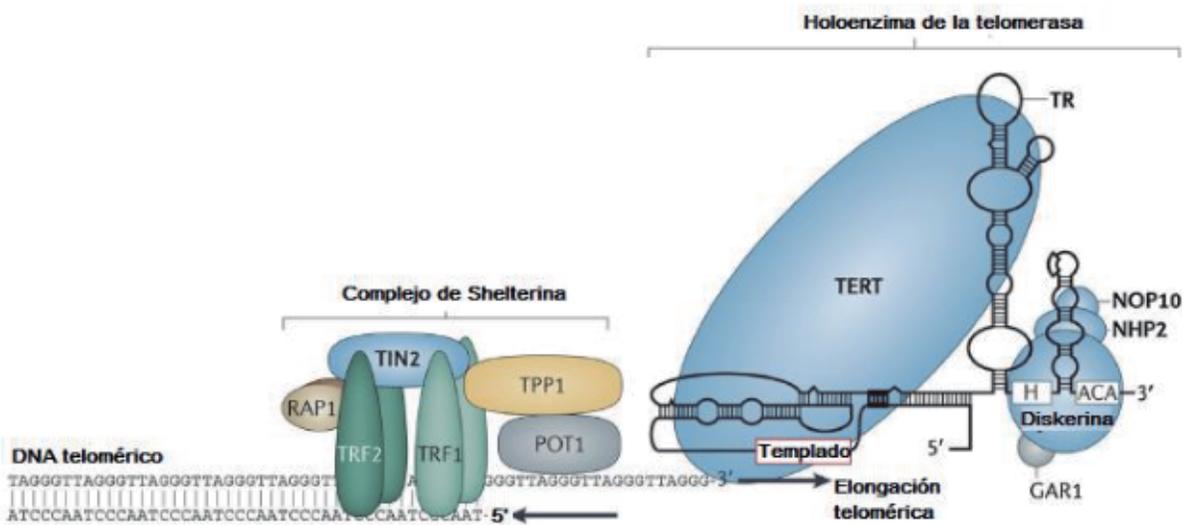


Figura 6. Estructura del telómero. Se observa el complejo proteico de la Shelterina que protege los telómeros y participa en la regulación de su alargamiento. El complejo enzimático de la telomerasa incluye a una transcriptasa reversa codificada por el gen *TERT* y el componente de RNA molde (*TERC*). *TERC* tiene un motivo que permite su unión con el complejo de *Diskarina*. Modificado de Heindreich & Kumar, 2017.

2.1.2 CICLO CELULAR.

La forma en la que la información genética puede transmitirse de una generación a la siguiente se realiza a través de dos tipos de división celular llamados mitosis y meiosis, los cuales se realizan en las células somáticas y en los gametos, respectivamente. En la mitosis se asegura que cada célula hija contenga un complemento genético similar al de la célula que le dio origen y en la meiosis que cada gameto o célula reproductora (óvulo y espermatozoide) tenga un solo juego del complemento genético (Nurse, 2000). Los gametos tienen el número haploide (23 cromosomas) y las células somáticas número diploide (46 cromosomas) (Trask, 2002).

LA DIVISIÓN CELULAR.

El ciclo celular es el proceso mediante el cual una célula se reproduce y hereda su material genético, algunas de sus funciones principales son el copiado y la división del material genético. El ciclo celular tiene distintas fases: G1 (*Gap 1*), S (*Synthesis*), G2 (*Gap 2*) y Fase M (*Mitosis or Meiosis*) (Nurse, 2000) (Figura 7).

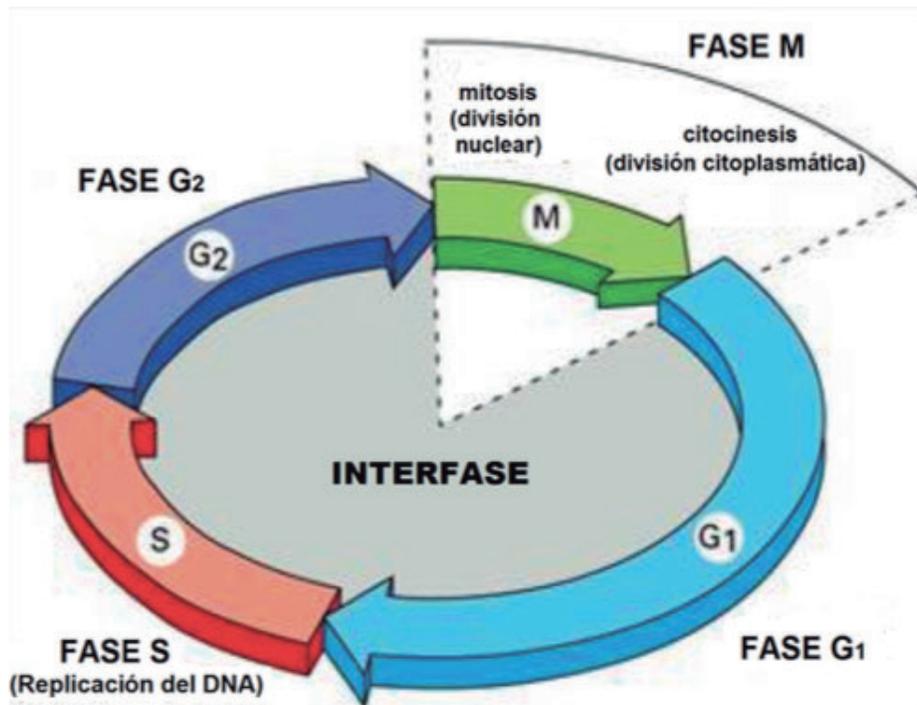


Figura 7. Fases del ciclo celular. Modificado de, *Concepts of Genetics*, W. S. Klung, 2013.

MITOSIS.

La mitosis es el proceso por el cual, una célula da origen a dos células hijas con igual número de cromosomas, de forma previa, la célula debe duplicar su material genético para poder heredarlo a sus células hijas. En cada división celular se asegura que se mantenga el número cromosómico. Se divide en 4 fases sucesivas descritas a continuación (Karp, 2013) (Stratchan & Read, 2006) (Figura 8).

Profase: Es la etapa en la que inicia la condensación de la cromatina para formar a los cromosomas, en esta fase se pierde la envoltura nuclear y los centriolos comienzan su migración hacia cada polo de la célula. En los estudios de cariotipo de alta resolución se detiene el ciclo celular al final de la profase.

Metafase: En esta fase los cromosomas se agrupan en la placa ecuatorial y los microtúbulos de los husos mitóticos que se forman desde cada centriolo empiezan a migrar hacia los cinetocoros. En el estudio de cariotipo convencional, el ciclo celular es detenido en esta etapa gracias al uso de la colchicina que impide la polimerización de las tubulinas.

Anafase: Los husos mitóticos una vez unidos a los cinetocoros comienzan a acortarse y a “arrastrar” a las cromátidas hacia el centriolo de donde surgen. El último punto de control del ciclo celular ocurre justo antes de iniciar la anafase y se le conoce como APC (*anaphase promoting complex*, por sus siglas en ingles). Si alguna de las cromátidas no está unida al huso mitótico, se detiene la mitosis y ocurre un proceso similar a la apoptosis conocido como “catástrofe mitótica”.

Telofase: Durante la telofase los husos mitóticos desaparecen y se comienzan a reensamblar las membranas nucleares. Posterior a la telofase puede o no ocurrir la citocinesis, que es el proceso de división del citoplasma.

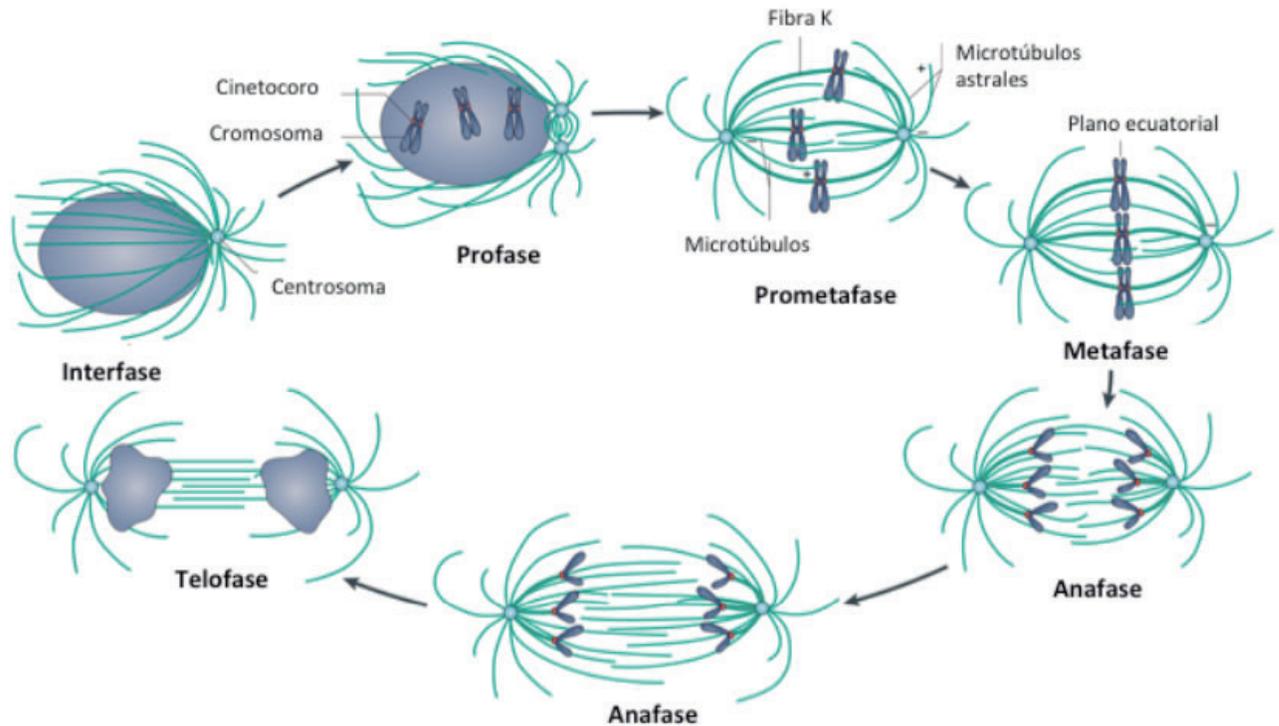


Figura 8. Fases de la Mitosis. Modificada de *Biología Celular y Molecular*, Karp, 2013.

MEIOSIS.

La meiosis es el proceso de división celular en el cual una célula diploide ($2n$) que tiene 46 cromosomas, experimenta dos divisiones sucesivas, para generar células haploides ($1n$) con 23 cromosomas (Gersen, 2013). La función normal de la meiosis es esencial para la procreación, mantener la integridad del genoma y asegurar el desarrollo normal de la descendencia. El evento de mayor importancia en la meiosis es la recombinación homóloga, que da origen a la variabilidad en los gametos (Cha & Hartsuiker, 2014).

Antes de la meiosis, la replicación del DNA en la fase S premeiótica, permite a las células tener un complemento cromosómico con 46 cromosomas dobles los cuales pasarán por dos divisiones celulares que son: meiosis I o fase reduccional en la que hay una separación de los cromosomas homólogos, y meiosis II o segregación ecuacional, en la que hay una separación de las cromátidas hermanas (Baillet & Mandon-Pappin, 2012).

Profase I: esta fase se divide a su vez en cinco fases (Figura 9):

- **Leptoteno:** en esta fase los cromosomas homólogos no apareados se alínean y se observan como cintas gruesas que corresponden a las cromátidas hermanas.

- Cigoteno: fase en la que los homólogos paternos y maternos inician el proceso de sinapsis para formar los bivalentes.
- Paquiteno: etapa en la que se completa la sinapsis y termina la recombinación.
- Diploteno: en esta etapa comienza la separación de los bivalentes. Los cromosomas homólogos están unidos por quiasmas, que son estructuras que resultan del entrecruzamiento. En los humanos, el proceso de meiosis femenina comienza en la vida intrauterina y es precisamente en esta etapa de la profase I que se detiene hasta la adolescencia.
- Diacinesis: durante este proceso, se continúa la condensación cromosómica, los bivalentes son compactos.

Al igual que en la profase de la mitosis, en la profase meiótica desaparece la membrana nuclear y deja de ser distinguible el nucléolo (Miller, Amon & Ünal, 2013).

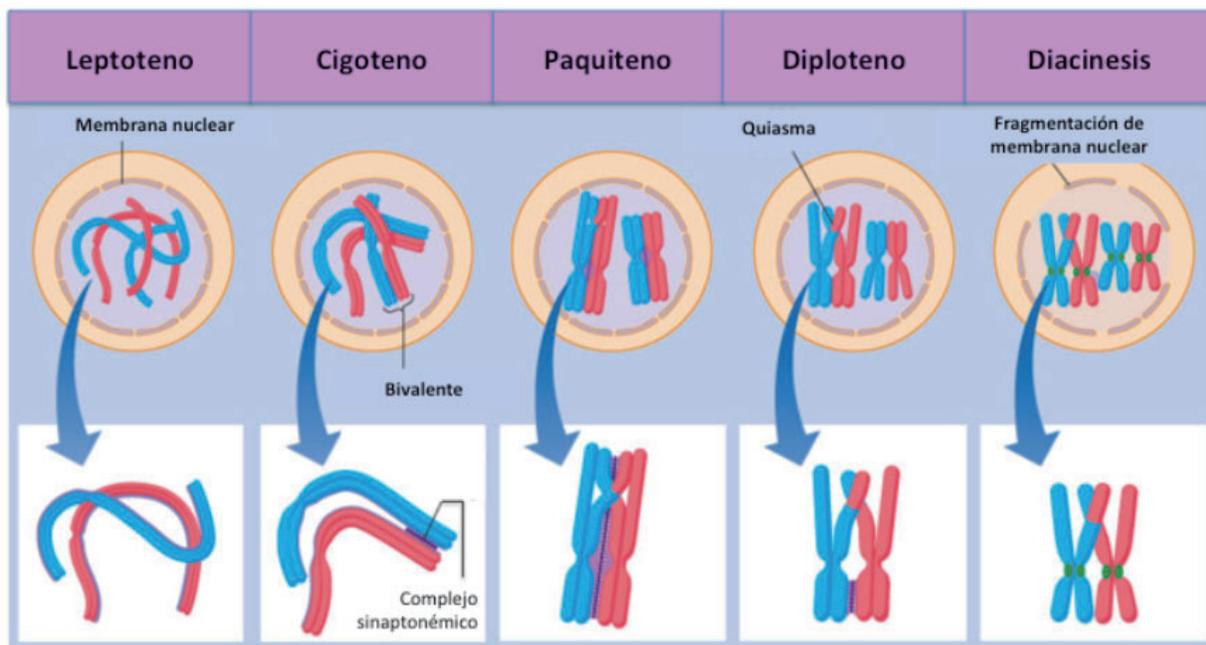


Figura 9. Subfases de la Profase I. Modificada de Baillet & Mandon-Pepin, 2011

Metafase I: los cromosomas se agrupan en la placa ecuatorial del mismo modo en que ocurre en la mitosis para su adecuada segregación durante la anafase I.

Anafase I: se lleva a cabo la separación de los homólogos, lo que resulta en dos gametocitos secundarios; cada uno tiene un contenido cromosómico haploide, pero cada cromosoma está formado de dos cromátides.

Telofase I: durante la telofase I se forma nuevamente la membrana nuclear en los nuevos gametocitos secundarios e inmediatamente sigue la profase II, no existe una segunda fase S, motivo por el cual la meiosis también es conocida como “división de reducción”.

En la segunda división meiótica o de segregación ecuacional se realiza un proceso similar a la mitosis, en la que se lleva a cabo la separación de las cromátides hermanas para dar origen a cuatro gametos de contenido haploide (Moore & Best, 2007). Después de generarse el número haploide de cada gameto, éstos se uniran en la fecundación, generando así el número cromosómico normal de 46 cromosomas por cada cigoto, lo que originará un nuevo organismo.

Las alteraciones o anomalías cromosómicas que se originan durante la mitosis o la meiosis, resultan en el complemento anormal de una célula (Baillet & Mandon-Peppin, 2012).

2.1.3 ALTERACIONES CROMOSÓMICAS.

Son una causa importante de malformaciones congénitas y alteraciones del desarrollo, se presentan en aproximadamente el 0.8% de todos los recién nacidos vivos, y pueden clasificarse en numéricas y estructurales e involucrar uno o más cromosomas. La clasificación de las mismas se esquematiza en la Tabla 1 (Spinner, Saitta & Emanuel, 2007).

Tabla 1. Clasificación de las alteraciones cromosómicas. Modificada de Moore & Best 2001.

Numéricas	Estructurales
<ul style="list-style-type: none"> • Euploidías <ul style="list-style-type: none"> Triploidía Tetraploidía Pentaploidía • Aneuploidías <ul style="list-style-type: none"> Monosomía Trisomía 	<ul style="list-style-type: none"> • Inserciones • Deleciones • Duplicaciones • Anillos • Isocromosomas • Inversiones • Translocaciones <ul style="list-style-type: none"> • Robertsonianas • Recíprocas <ul style="list-style-type: none"> Balanceadas No balanceadas

ALTERACIONES NUMÉRICAS

Las anomalías numéricas a su vez, se clasifican en aneuploidías y poliploidías (Robinson & McFadden, 2002):

- **Aneuploidía:** se refiere a la presencia de un cromosoma extra (trisomía), o bien a la ausencia de uno (monosomía) en células diploides; se asocia frecuentemente a la edad materna avanzada y constituye una porción significativa de las anomalías cromosómicas observadas en abortos espontáneos.
- **Poliploidía:** se llama poliploide al complemento cromosómico que corresponde a un múltiplo exacto del número haploide. Ejemplos de poliploidías son la triploidía

(69 cromosomas) y la tetraploidía (92 cromosomas) que son cromosopatías letales.

ALTERACIONES ESTRUCTURALES

Las anomalías estructurales involucran puntos de unión y ruptura dentro de un solo cromosoma o entre dos o más cromosomas diferentes, que resultan en cariotipos con rearrreglos desbalanceados o balanceados (Luthardt & Keitges, 2001).

Las alteraciones estructurales se presentan en el 0.6% de todos los recién nacidos vivos, en el 50% de los abortos del primer trimestre, y en el 25% de los abortos y óbitos que ocurren después del primer trimestre. Se generan por diversos mecanismos pero los dos más estudiados son la recombinación homóloga no alélica (por sus siglas en inglés, NAHR Non-allelic homologous recombination) y la unión de extremos no-homólogos (por sus siglas en inglés, NHEJ Non homologous end joining) (Shaw & Lupski, 2004).

REARRREGLOS DESBALANCEADOS

Los *rearrreglos desbalanceados* son aquellos en los que existe ganancia de material genético (trisomía parcial de un cromosoma), o pérdida del mismo (monosomía parcial de un cromosoma) (Luthardt & Keitges, 2001). Se clasifican en:

- **Deleciones:** resultan en la pérdida de material cromosómico de un solo cromosoma. Las deleciones terminales resultan de una sola ruptura dentro de un brazo del cromosoma, con pérdida de material distal a la ruptura. Las intersticiales, involucran dos rupturas dentro del mismo brazo del cromosoma con pérdida de material entre estos dos puntos de ruptura (Figura 10) (Moore & Best, 2001).

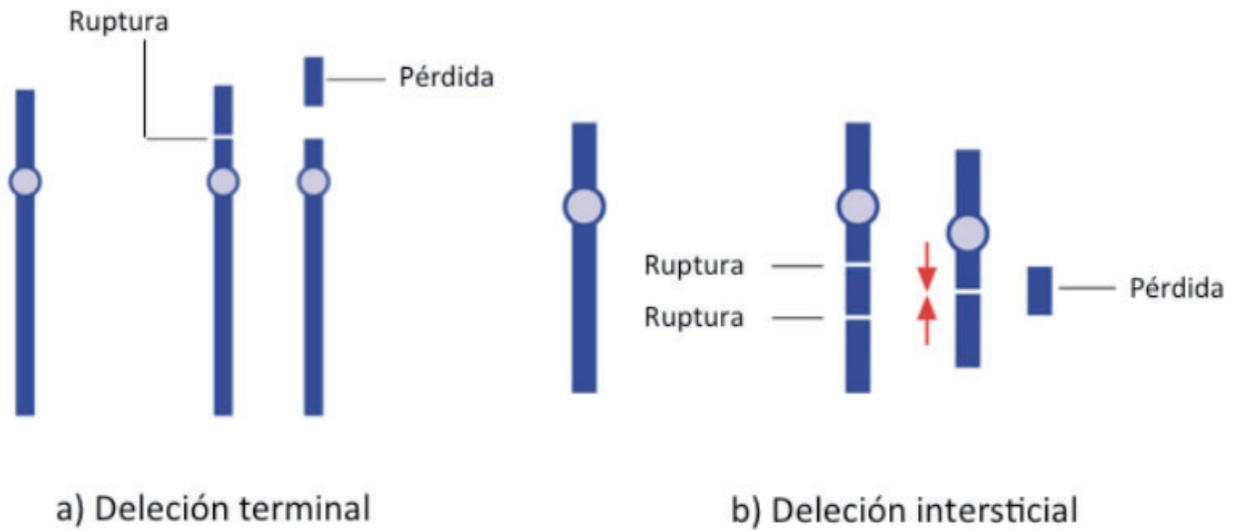


Figura 10. Deleciones cromosómicas. a) Las deleciones terminales involucran la pérdida de uno de los telómeros. b) En las deleciones intersticiales ambos telómeros se conservan. Modificado de Moore & Best, 2001

- **Anillos cromosómicos:** son formados debido a la ruptura en cada brazo de un cromosoma, con pérdida de material distal a las rupturas y la subsecuente unión de los extremos terminales. Usualmente varían en tamaño, dependiendo de cuánto material se ha perdido. Suelen ser inestables durante la división celular, y raramente, pueden ser transmitidos de los padres a su descendencia (Moore & Best, 2001) (Figura 11).

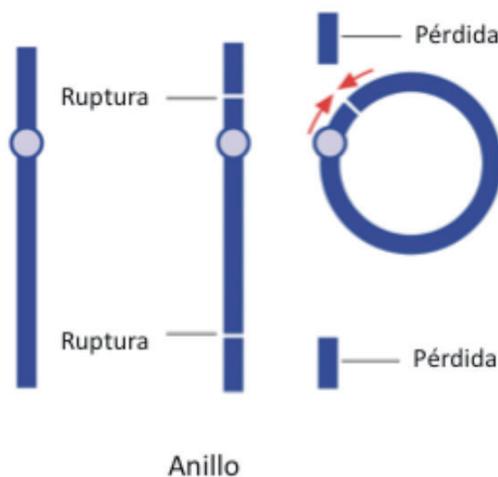


Figura 11. Anillo cromosómico. Modificado de Moore & Best, 2001

- **Duplicación:** ocurre usualmente por una recombinación homóloga no alélica (Por sus siglas en inglés, NAHR, Non allelic homologous durante la meiosis. En la mayoría de los gametos en los que se genera una duplicación en algún cromosoma, también puede haber una deleción recíproca del segmento duplicado (Figura 12). En general, las duplicaciones son menos dañinas que las deleciones, pero también se han asociado con anomalías clínicas (Moore & Best, 2001).

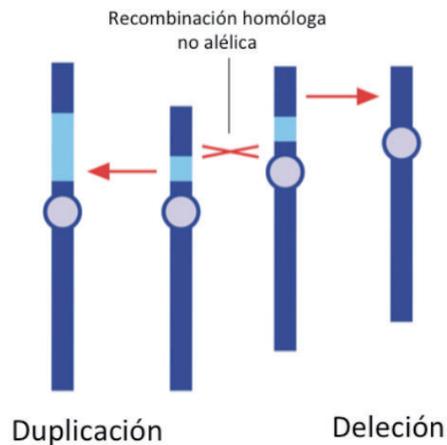


Figura 12. Mecanismo de generación de deleciones y duplicaciones.

Modificado de Moore & Best, 2001

- **Isocromosoma:** se refiere a un cromosoma que contiene dos copias idénticas de un brazo de algún cromosoma, más la ausencia del otro brazo. Probablemente resultan de la ruptura y la unión de las cromátides hermanas cerca del centrómero de un cromosoma duplicado. También se considera que puede ser producto de la división horizontal del centrómero en cualquier división celular (Moore & Best) (Figura 13).

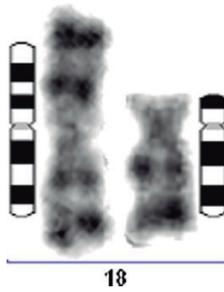


Figura 13. Isocromosoma. En la imagen se observa del lado derecho un cromosoma 18 normal. Del lado izquierdo un isocromosoma del brazo largo del cromosoma [i(18)(q10)]. Modificado de Moore & Best, 2007.

REARREGLOS BALANCEADOS.

Los *rearreglos balanceados* son aquellos en los que no hay cambio en la cantidad de material cromosómico, e incluyen a las siguientes alteraciones:

- **Inversiones:** son rearreglos dentro de un solo cromosoma que resultan de dos rupturas que flanquean o delimitan el segmento involucrado que se rotará 180° antes de reincorporarse. Se clasifican en pericéntricas y paracéntricas (Luthardt & Keitges, 2001). Las inversiones pericéntricas, provocadas por una ruptura en cada brazo cromosómico (p y q), frecuentemente producen un cambio en la longitud y posición del centrómero. Las inversiones paracéntricas, producidas por dos rupturas en un solo brazo, no producen un cambio en la longitud ni en la posición del centrómero, pero pueden ser identificadas en el cariotipo mediante los cambios en el patrón de bandeo del cromosoma afectado (Moore & Best, 2001) (Figura 14).

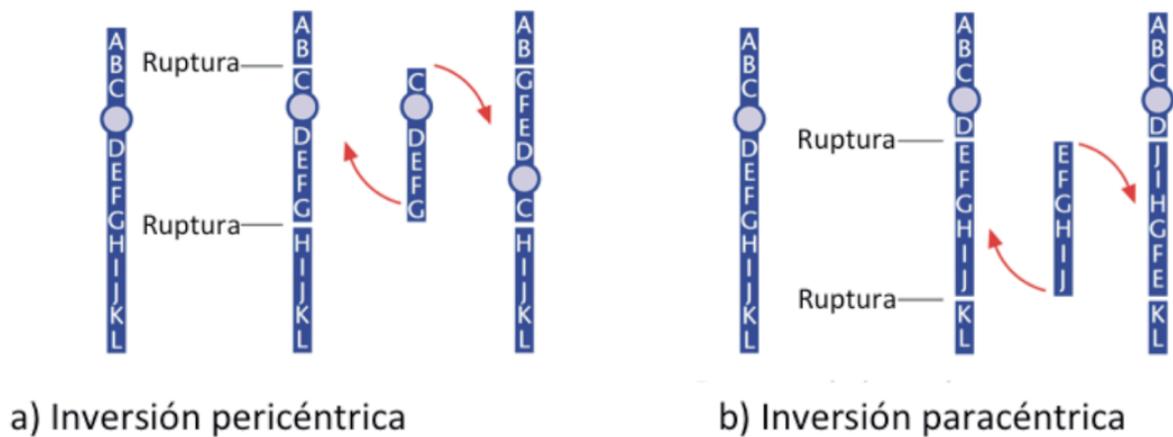


Figura 14. Inversiones pericéntrica y paracéntrica.

Modificado de Moore & Best, 2001.

- **Translocaciones:** resultan del intercambio de segmentos cromosómicos entre dos o más cromosomas no homólogos. Existen tres tipos: recíprocas (producidas por el intercambio de segmentos desprendidos de dos cromosomas diferentes), robertsonianas (involucran dos cromosomas acrocéntricos que se unen cerca de sus centrómeros para formar un solo cromosoma) e insercionales (resultan de tres rupturas, tales que el cambio no recíproco ocurre cuando el segmento de uno de los cromosomas se inserta en otro cromosoma). En la Figura 15 se esquematizan las dos primeras (Moore & Best, 2001).

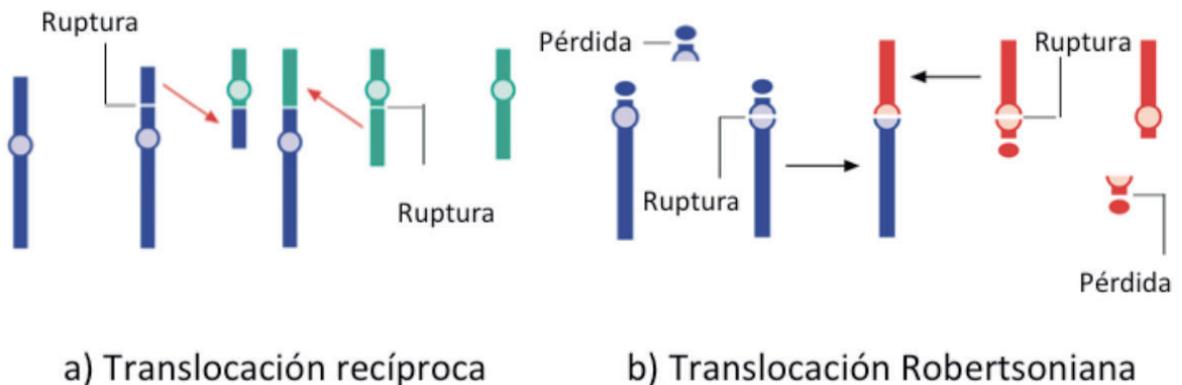


Figura 15. Translocaciones recíproca y robertsoniana.

Modificado de Moore & Best, 2001

Los portadores de rearrreglos cromosómicos balanceados usualmente son asintomáticos siempre y cuando no se dañen genes mediante el proceso de ruptura y unión. Lo importante es que pueden producir gametos desbalanceados y tienen un riesgo aumentado para tener descendencia con anomalías cromosómicas.

2.2 TÉCNICAS CITOGENÉTICAS

La caracterización cromosómica mediante métodos simples, rápidos y confiables, es uno de los principales intereses en la citogenética humana. Dentro de las técnicas principales en la citogenética están el cariotipo, la la hibridacion *in situ* con fluorescencia, los microarreglos basados en hibridación genómica comparativa y los microarreglos de SNPs; estos últimos se consideran un estudio molecular más que citogenético.

2.2.1 CARIOTIPO

El cariotipo es el análisis organizado del contenido cromosómico de una célula específica, en el que los cromosomas son ordenados y numerados de acuerdo a su tamaño (de mayor al menor) y a la posición del centrómero (Hsieh, 2011). La figura 16 ilustra un cariotipo humano normal.

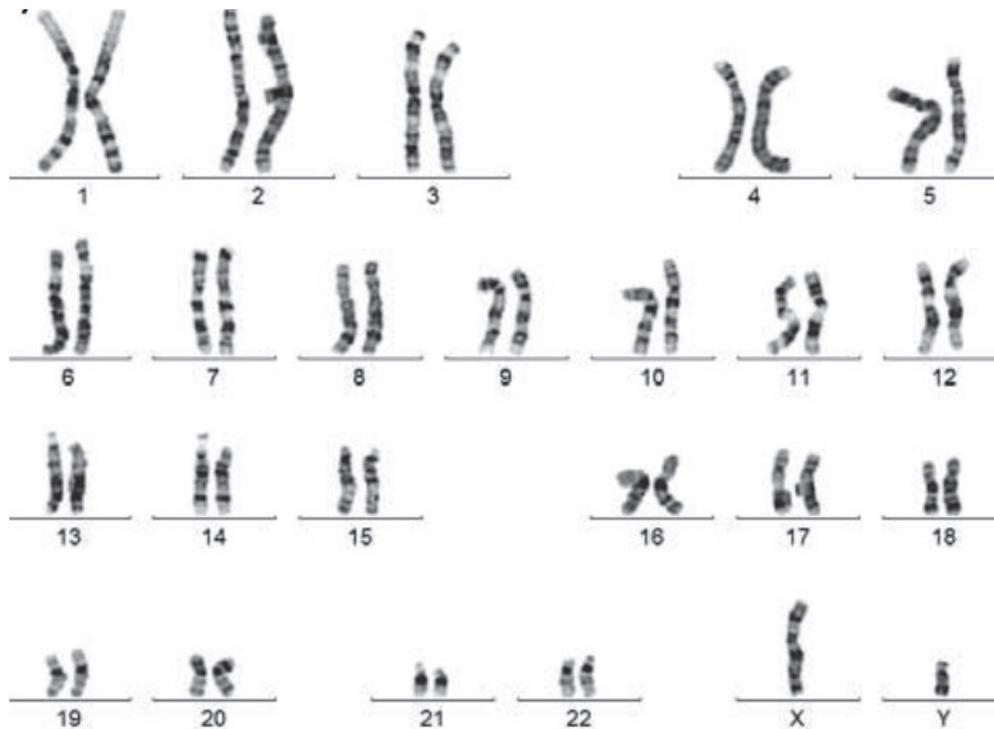


Figura 16. Cariotipo normal con bandas GTG, Modificado de Hsieh, 2011.

Es utilizado de forma rutinaria para la determinación de alteraciones en el número o la estructura cromosómica. Las indicaciones clínicas para realizar un estudio de cariotipo se enlistan en la tabla 2.

Tabla 2. Indicaciones para realizar estudio citogenético

1. Neonatos y niños con malformaciones congénitas y/o retraso mental. El análisis revela una alteración cromosómica como etiología de hasta un 10 a 15% de estos pacientes.
2. Dismorfias craneofaciales.
3. Patrones anormales en los dermatoglifos (pliegues digitales y palmares) o en los tricoglifos (implantación y trayectoria del crecimiento del cabello).
4. Fenotipos inusuales de comportamiento; frecuentemente del espectro autista.
5. Patrón de crecimiento anormal de inicio prenatal.
6. Síndromes cromosómicos ya reconocidos.
7. Individuos con trastornos de la diferenciación sexual o en su función; tales como genitales ambiguos al nacimiento, falta de desarrollo puberal o infertilidad.
8. Diagnóstico prenatal para detectar alteraciones cromosómicas.
9. Parejas que hayan pasado por múltiples abortos, óbitos o muertes neonatales. Aproximadamente en 4%, uno de los miembros de la pareja es portador de un rearreglo balanceado; el cual puede dar lugar a concepciones no balanceadas cromosómicamente.
10. Historia familiar de malformaciones y dificultad en el aprendizaje.
11. Tejido obtenido de fetos que hayan terminado en aborto.
12. Muestras tumorales.
13. Cuando se sospeche el diagnóstico de un síndrome de inestabilidad cromosómica

Modificado de Sharkey, Maher & FitzPatrick, 2005.

Se cuenta con una nomenclatura estandarizada para la descripción del complemento cromosómico normal o alterado (Sharkey, Maher & FitzPatrick, 2005). Se puede identificar cada cromosoma utilizando diferentes técnicas de tinción, con base en la presentación de franjas claras u oscuras (bandas) o la presencia, ausencia o la anomalía de algunas estructuras cromosómicas (centrómero, satélites, etc.) (Sharkey, Maher & FitzPatrick, 2005).

Las principales técnicas de bandeo se observan en la Tabla 3.

Tabla 3. Técnicas para Tinción para Cariotipo	
BANDAS G o GTG	Los cromosomas se tratan con tripsina para desnaturalizar las proteínas cromosómicas, esto genera el patrón de bandeo que posteriormente será visible con el colorante de Giemsa.
BANDAS Q	Los cromosomas se tiñen con quinacrina y se examinan por microscopía de fluorescencia. Los cromosomas se tiñen en patrones específicos de bandas brillantes y opacas. Las bandas brillantes corresponden a las bandas G oscuras.
BANDAS R	Los cromosomas se calientan antes de colorearlos con Giemsa, también se producen bandas claras y oscuras. El patrón de bandas claras y oscuras es opuesto o reverso al observado con bandas GTG.
BANDAS C	Se tiñe específicamente la región centromérica y otras regiones que contienen heterocromatina constitutiva. Implica un tratamiento secuencial con ácido y álcali.
BANDAS NOR	Se utiliza nitrato de plata, definiéndose los tallos de los satélites de los cromosomas acrocéntricos, al teñir complejos de ribonucleoproteína.
BANDAS T	En esta técnica se utiliza naranja de acridina, tiñéndose la región telomérica.
ALTA RESOLUCIÓN	La técnica consiste en hacer bandas G o R en preparaciones cromosómicas en prometafase, cuando los cromosomas no están tan condensados. El bandeo en profase solo se utiliza cuando se sospecha una anomalía estructural. Esta técnica utiliza el mismo proceso de tripsinización seguido de coloración con Giemsa

La técnica convencional de bandeo GTG (Bandas G con tripsina y tinción por Giemsa) continúa siendo la regla o referencia de oro para el resto de técnicas citogenéticas, ya que se encuentra adecuadamente estandarizada, es fácil de realizar y su costo es bajo. Sin embargo presenta importantes limitaciones, el análisis se realiza observando directamente los patrones de tinción y la morfología de los cromosomas; el origen del material adicional en un cromosoma a menudo se desconoce; la capacidad de análisis depende de la adecuada dispersión de la metafase; su nivel de resolución permite identificar alteraciones estructurales de entre 5 a 10 millones de pares de bases o megabases (Mb) (Holmquist, 2005).

2.2.2 HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH)

En esta técnica se utilizan **sondas** que son secuencias de DNA creadas artificialmente y son específicas para ciertas regiones. A estas sondas se les añade un marcador que sólo fluoresce si la sonda hibrida con su región correspondiente. Se han desarrollado varios tipos de sondas como las sondas *locus* específico, las cuales hibridan con una secuencia única de DNA, y se les conoce como sondas LSI (*locus specific identifier*). Otras son las sondas centroméricas, las sondas subteloméricas y de pintado cromosómico. Mediante esta técnica se pueden identificar anomalías estructurales submicroscópicas; tales como microdeleciones y microduplicaciones (Bejjani & Shaffer, 2008).

2.2.3 MICROARREGLOS BASADOS EN LA HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARATIVA (aCGH) Y SNPs.

MICROARREGLOS aCGH

La técnica citogenética molecular de hibridación genómica comparativa en plataforma de microarreglos (aCGH) combina los principios del hibridación en que se basa el FISH para la detección de pérdidas o ganancias de material genético a lo largo de todo el genoma (Patel, 2019). El estudio de aCGH tiene ventajas técnicas como la nula necesidad de cultivo celular y que se puede realizar con cantidades pequeñas de DNA. Los microarreglos pueden detectar variaciones de la arquitectura del genoma conocidas

como **variantes del número de copias o CNV** (*Copy Number Variations*), por sus siglas en inglés. Las CNV son una causa importante de morbilidad y muchas veces no son detectables por cariotipo convencional ni de alta resolución. Las desventajas incluyen su incapacidad de detectar poliploidías y rearrreglos balanceados (Speicher & Carter, 2005). El costo es también una limitación en nuestro medio, pero desde el año 2010, la Asociación Estadounidense de Genética Médica emitió la recomendación del uso de microarreglos cromosómicos como estudio de primera línea para el estudio de pacientes con malformaciones congénitas y/o discapacidad intelectual de origen desconocido (Miller et al., 2010).

MICROARREGLOS DE SNPs (SNP-ARRAY)

Los microarreglos de polimorfismos de nucleótido único son estudios en los que solamente se usa la muestra del paciente y se hibrida con sondas que representan dos alelos posibles en cada región que se conocen como alelo A y alelo B. En general, las muestras de los pacientes muestran una combinación de alelos AA o BB en regiones con homocigosis; y AB representan las regiones en heterocigosis. Esto crea una gráfica con 3 líneas de puntos que se conoce como Gráfica de Diferencia Alélica (GDA). La GDA es útil ya que nos permite conocer la ploidía de la muestra. Asimismo, los SNP-array pueden determinar regiones con pérdida de heterocigosidad (LOH) que se refieren a regiones donde los alelos son similares y pueden ser un marcador de consanguinidad si aparecen en más de un cromosoma (Kamath, 2009). Un ejemplo de un estudio de SNP-array se observa en la Figura 17.

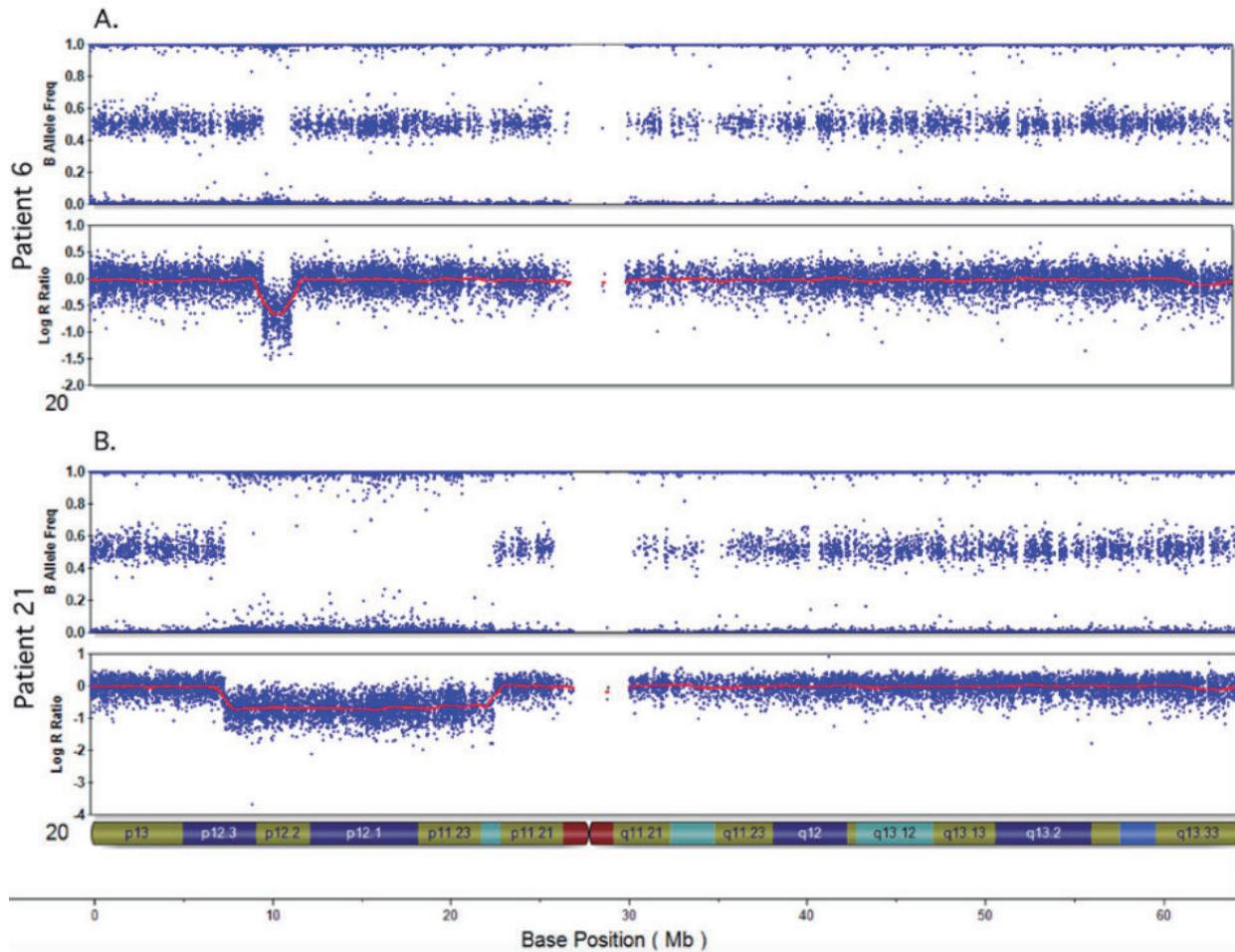


Figura 17. Ejemplo de estudio de SNP. Illumina BeadStudio de 2 pacientes con deleciones de 20p. El Gráfico superior muestra al paciente 6, que presenta una deleción de 2.4 Mb puede verse como una pérdida de heterocigosidad con respecto del alelo B y una disminución de la relación Log2Ratio en la línea inferior. El grafico inferior muestra una deleción mayor en el paciente 21 (3,987 SNP, 14,6Mb), que también se puede ver tanto en la frecuencia del alelo B como en las relaciones Log2R. Modificado de Kamath 2009.

2.3 ESTRUCTURA DEL CROMOSOMA 9

El tamaño del cromosoma 9 es altamente polimórfico es de 109 Mb. Representa alrededor del 4.5% del genoma humano total. La longitud del brazo corto es de 41 Mb y la longitud del brazo largo es de 99 Mb. Contiene 1149 genes, muchos de estos genes están implicados en el desarrollo sexual del hombre y la mujer, el cáncer y la enfermedad neurodegenerativa, y 426 pseudogenes. Hasta el momento, se ha informado de al menos 3,700 personas con diferentes defectos estructurales del cromosoma 9 (Genetics Home Reference of National Library of Medicine, GNH 2020) Figura 18.

En cuanto a las alteraciones cromosómicas, existen tanto numéricas como estructurales se sabe que las inversiones pericéntricas representan cerca del 1% de las alteraciones en los humanos, seguidas por las deleciones y las translocaciones, así como hay una gran cantidad de personas en el mundo con heteromorfismos que hasta el momento no hay evidencia que causen enfermedad (Humphray, 2004). De las alteraciones numéricas del cromosoma 9, se han descrito trisomias 9 y tetrasomías 9 en mosaico compatibles para la vida. De las alteraciones estructurales se han encontrado deleciones de diferentes tamaños tanto del brazo largo como del brazo corto, translocaciones, inversiones y cromosomas en anillo.

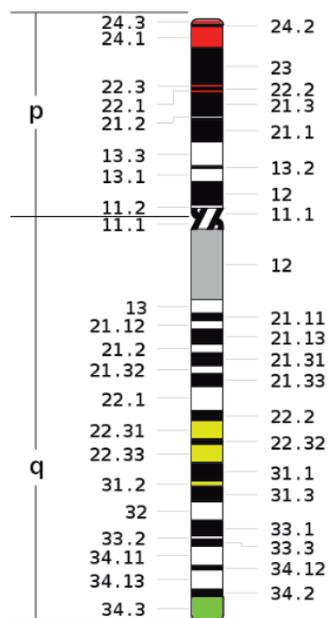


Figura 18. Ideograma del cromosoma 9.

2.3.1 ALTERACIONES NUMÉRICAS DEL CROMOSOMA 9.

TRISOMÍA Y TETRASOMÍA DEL CROMOSOMA 9.

La trisomía 9 es la trisomía autosómica más común después de las trisomías completas de los cromosomas 21, 18 y 13. Se ha propuesto como una región crítica para el fenotipo de la trisomía 9 a la región 9p22-9p24. En la mayoría de los casos, la trisomía 9 se origina de una translocación recíproca entre el cromosoma 9 y otro autosoma, en alguno de los padres (Guilherme et al, 2014).

Los fetos con trisomía 9 se abortan antes de la semana 10 de gestación, un gran porcentaje de los recién nacidos vivos fallecen en los primeros minutos de vida extrauterina. Se conocen cerca de 100 casos de recién nacidos vivos, la mayoría en mosaico. La incidencia hasta el momento es desconocida. La relación de recién nacidos vivos hombre-mujer es cercana a 1:1. Se ha sugerido que la presentación de esta trisomía puede estar asociada a edad materna avanzada, y hasta el momento se desconoce el riesgo de recurrencia.

Se han observado características clínicas como alteraciones estructurales del cerebro, anomalías craneofaciales (frente alta, fisuras palpebrales inclinadas hacia abajo, ojos hundidos, microftalmia, anoftalmía, coloboma, ectopia lentis, miopía, hipoacusia, pabellones auriculares de baja implantación, labio superior prominente, micrognatia, labio y paladar hendido), las alteraciones cardiológicas se presentan hasta en el 60% de los casos, con mayor frecuencia defectos septales ventriculares, estenosis de la arteria pulmonar, conducto arterioso persistente, foramen oval permeable, coartación o aorta, en cuanto a las alteraciones esqueléticas se han descrito tórax estrecho, luxación de articulaciones, displasias óseas, escoliosis, trece pares de costillas y dedos superpuestos, en cuanto a las alteraciones genitourinarias pueden presentar malformaciones renales, genitales externos hipoplásicos y criptorquidia, todos presentan discapacidad intelectual severa. (Cammarata-Scalisi, 2019).

La tetrasomía del cromosoma 9, es secundaria a la presencia de dos cromosomas adicionales. En forma similar que la trisomía 9, la mayoría de los casos se abortan o mueren en el periodo posnatal temprano, tiene que hallarse en forma de mosaico para ser compatible con la vida. El fenotipo es variable y los pacientes presentan múltiples defectos congénitos, similares a los de la trisomía 9. (Papoulidis et al, 2012; El Khattabi et al, 2015).

2.3.2 ALTERACIONES ESTRUCTURALES DEL CROMOSOMA 9

DELECCIONES DEL CROMOSOMA 9

Aunque es un cromosoma relativamente grande, solo hay tres síndromes clínicos causados por deleciones de este cromosoma: un síndrome causado por la deleción del brazo corto y dos síndromes causados por deleciones del brazo largo.

SÍNDROME DE DELECCIÓN 9p o SÍNDROME DE ALFI OMIM #158170.

Fue descrito clínicamente por Alfi en 1973, es la deleción mas frecuente y la mejor descrita en este cromosoma, se estima que existen mas de 320 pacientes con esta condición. Se ha sugerido que la región crítica de esta deleción se encuentra de p22-p24. Las deleciones mas comunes abarcan 5 Mb. Las deleciones de 9p se asocian con mucha frecuencia con duplicaciones de otros segmentos de 9p, suelen ser esporádicas o con la duplicación de otros segmentos cromosómicos causados por translocaciones en su mayoría heredadas (Vahabi et al, 2017).

Las principales manifestaciones son la trigonocefalia (90%), hipotonía posnatal, retraso en el desarrollo psicomotor, discapacidad intelectual (100%), anormalidades faciales como son hipertelorismo, epicanto, puente nasal plano, hipoplasia media facial, narinas antevertidas, pabellones auriculares con rotación posterior, canales auditivos estrechos, filtrum largo malformado, paladar hendido o la úvula bífida (10%), micrognatia y cuello corto, defectos cardiacos congénitos leves (15%), hipoplasia de cuerpo caloso, hernias inguinales o umbilicales, onfalocele aunque no es un hallazgo común, trastornos del desarrollo sexual, como es la disgenesia gonadal completa, genitales ambiguos, hipospadias, útero hipoplásico y atresia coanal en algunos pacientes. Se ha observado

que la mayoría de los pacientes con trigonocefalia tienen un desarrollo normal de los órganos sexuales. (Gardner, 2012; Kawara, 2006).

SÍNDROME DE DELECIÓN 9p24.3 o DISGENESIA GONADAL PARCIAL o COMPLETA CON DELECIÓN 9p24.3.

Este síndrome ha sido estudiado después del descubrimiento del gen del gen *DMRT1*. *DMRT1* es el gen determinante del sexo más conservado que se conoce, su expresión es normalmente mayor en el embrión masculino por su acción inductora en la formación de los testículos (Muroya, 2000).

SÍNDROME DE DELECIÓN 9q11-q21

Las deleciones de la parte proximal de 9q (9q11-9q21) son raras. Algunos pacientes en este grupo no presentaron anomalías clínicas significativas. Las manifestaciones son heterogéas y se sobrelapan con los otros síndromes. (Tuğ, Ergün & Perçin, 2018).

SÍNDROME DE DELECIÓN 9q22.32-q31.1 o SÍNDROME DE GORLIN.

Es un síndrome raro, donde se ve involucrada la región q11-q21 del brazo largo del cromosoma 9. Se ve invocado el gen *PTCH*, ubicado en 9q22.3. Las principales manifestaciones son tumores múltiples que afectan la piel (carcinomas de células basales) y al cerebro (meduloblastomas), anomalías múltiples del esqueleto (anomalías de vértebras cervicales y torácicas, costillas bífidas o fusionadas, pectum excavatum, sindactilia, metacarpianos cortos). Algunos pacientes presentan macrocefalia, rasgos faciales toscos, protuberancias frontales o hipertelorismo, convulsiones, agenesia del cuerpo calloso, catarata, desprendimiento de retina, pérdida auditiva, craneosinostosis, pérdida de audición, paladar hendido, defectos cardíacos, hernias inguinales y umbilicales (Tuğ, Ergün & Perçin, 2018). Los niños pequeños no presentan tumores, estos se diagnostican en la segunda o tercera década de la vida, pero se han reportado algunos casos infantiles (Roncalés-Samanes et al, 2014).

SÍNDROME DE DELECCIÓN 9q34.3 o SÍNDROME DE KLEEFSTRA.

Es un síndrome de microdelección subtelomérica con deficiencia intelectual severa, existen más de 100 pacientes y se han observado malformaciones múltiples en más de 50 casos reportados (Gardner, 2012). En estos pacientes se observa hipotonía, retraso en el desarrollo psicomotor, microcefalia absoluta, aunque la circunferencia de la cabeza al nacer suele ser normal. Las manifestaciones faciales típicas incluyen perfil facial plano, hipertelorismo, sinofritis o cejas arqueadas, nariz corta con puente nasal deprimido, lengua prominente, por lo que tiene facies parecidas a la trisomía 21. (Campbell et al, 2012). Algunos pacientes tienen malformaciones en el cerebro, convulsiones, hipoacusia, defectos cardíacos leves, anomalías de los intestinos, estenosis pilórica, hernia diafragmática, onfalocele, agenesia renal, braquidactilia, clinodactilia o sindactilia, y comportamiento antisocial. (Kannu, Winship & Aftimos, 2005).

CROMOSOMA 9 EN ANILLO

El cromosoma 9 en anillo ha sido reportado desde 1970. Se han reportado numerosas anomalías, como trigonocefalia, atresia coanal, microcefalia, cuerpo calloso hipoplásico, opacidad corneal, hipoacusia, hipotiroidismo, deficiencia de la hormona del crecimiento, estenosis pilórica, defectos cardíacos, hidronefrosis, riñón único ausencia de pulgares y estructuras radiales, polidactilia preaxial (Gardner, 2012).

INVERSIÓN DEL CROMOSOMA 9

Es importante determinar si estas son inversiones pericéntricas o paracéntricas.

Las inversiones pericéntricas se consideran heteromorfismos cromosómicos dentro de la varianza fenotípica normal, los cuales aparecen entre el 2 al 5% de la población general. Estas inversiones pericéntricas se han asociado a la presencia de infertilidad en varones como en mujeres (Gardner, 2012). Los pacientes con inversiones paracéntricas tienen una gran variedad fenotípica. Algunos portadores de estos arreglos pueden ser asintomáticos pero pueden generar descendencia con discapacidad intelectual, retraso global del desarrollo, malformaciones múltiples (Worsham, 1989). trastorno esquizoafectivo, talla y peso bajos, hipertelorismo. (Inayama et al, 1997).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A nivel mundial se han reportado síndromes relacionados con alteraciones específicas del cromosoma 9, sin embargo, las manifestaciones clínicas son diferentes para cada región cromosómica alterada, por lo que es difícil identificar clínicamente la relación que existe entre cada alteración y sus características fenotípicas.

En el HIMFG existen casos de pacientes con alteraciones del cromosoma 9, los cuales presentan una variabilidad en el fenotipo, por lo que es importante relacionar sus manifestaciones clínicas con las alteraciones citogenéticas específicas y observar la frecuencia de estas anomalías en nuestra población.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son las características fenotípicas y citogenéticas de pacientes con alteraciones del cromosoma 9 en el Hospital Infantil de México Federico Gómez?

5. JUSTIFICACIÓN

El estudio de pacientes con alteraciones del cromosoma 9 en el Hospital Infantil de México Federico Gómez nos permitirá conocer el espectro clínico de estas anomalías, con la finalidad de establecer una correlación entre las características clínicas y las alteraciones citogenéticas.

6. HIPOTESIS

Si se identifican las características clínicas y citogenéticas de los pacientes con alteraciones del cromosoma 9 del Hospital Infantil de México Federico Gómez, se podrá establecer una correlación entre el fenotipo, el manejo y el pronóstico de éstos pacientes.

7. OBJETIVOS (GENERAL Y ESPECÍFICOS)

7.1. OBJETIVO GENERAL

Describir las características clínicas y citogenéticas de los pacientes con alteraciones del cromosoma 9 que han sido estudiados en el Hospital Infantil de México Federico Gómez.

7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar las alteraciones del cromosoma 9 reportadas en pacientes del Hospital Infantil de México Federico Gómez en el periodo de 2010 a 2019.
- Estimar la frecuencia de estas alteraciones en el Instituto.
- Describir un caso clínico representativo.
- Establecer la correlación genotipo-fenotipo y comparar con lo publicado en la literatura.

8. METODOS

8.1 TIPO DE ESTUDIO (DISEÑO Y PROCEDIMIENTOS).

Observacional, descriptivo y transversal.

8.2 POBLACIÓN

FASE A.

Para identificar los casos y la frecuencia de las alteraciones del cromosoma 9, en el periodo de 2010 a 2019 en el HIMFG, la población de estudio estuvo formada por los registros de los resultados de cariotipo del Laboratorio de Citogenética.

FASE B.

Para describir un caso representativo de una alteración del cromosoma 9 y realizar una relación genotipo-fenotipo, la población de estudio fue un paciente seleccionado por presentar una gran relevancia clínica, así como su expediente clínico.

8.3 LUGAR.

Laboratorio de Citogenética del Departamento de Genética y Consulta Externa de Genética del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

8.4 PERIODO DE REALIZACIÓN.

Marzo 2018 a diciembre 2019.

8.5 CRITERIOS DE SELECCIÓN.

▪ CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

FASE A.

Reporte de cariotipo con bandas GTG que identificara alteraciones numéricas o estructurales del cromosoma 9, realizada en linfocitos de sangre periférica.

Reporte de cariotipo registrado entre 2010 y 2019.

FASE B.

Caso clínico con expediente disponible.

Paciente con alteración numérica o estructural del cromosoma 9 cuyo análisis se pudiese beneficiar de técnicas de citogenética molecular.

Contar con consentimiento informado del paciente y su familia para realizar el análisis citogenético molecular.

Contar con relevancia clínica para hacer la descripción del caso.

▪ CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

FASE A.

Reporte de resultado de cariotipo no concluyente.

FASE B.

Casos en los que no se consideró factible la realización del estudios adicionales por no ofrecer beneficio.

▪ CRITERIOS DE ELIMINACIÓN.

No aplica.

8.6 DESARROLLO GENERAL DE LA INVESTIGACIÓN

El análisis que se presenta se realizó en dos fases:

FASE A.

Se identificaron los casos reportados por el laboratorio de Citogenética del HIMFG para alteraciones del cromosoma 9, en el periodo de 2010 a 2019. Se analizaron los datos obtenidos, se compararon los tipos y la frecuencia de estas alteraciones con lo reportado en la literatura.

FASE B.

Se seleccionó un caso representativo con alteración cromosómica del 9, que ameritaba realizar otras técnicas citogenéticas moleculares. La fuente de obtención de datos se obtuvo de los registros del estudio de cariotipo del Laboratorio de Citogenética del Departamento de Genética y de la revisión de expedientes de los casos candidatos, durante el periodo de 2010 al 2019.

8.7 ANALISIS DE LA INFORMACIÓN

FASE A.

De los reportes identificados como con alteraciones del cromosoma 9, se analizaron las fórmulas cromosómicas correspondientes y se clasificaron de acuerdo a la nomenclatura internacional del ISCN (International System for Human Cytogenetics). Se realizó análisis de estadística descriptiva con porcentajes identificándose los tipos de alteraciones ya fuesen numéricas o estructurales y en este último caso, los tipos de alteraciones estructurales encontradas.

FASE B.

Se identificó a un caso representativo que pudiera beneficiarse del uso de otras técnicas citogenéticas como los microarreglos de SNPs CytoScan®. Con consentimiento informado, aprobación institucional y del comité de tesis, se realizó el estudio utilizando DNA de sangre periférica de la paciente.

8.8 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este proyecto tuvo un riesgo menor al mínimo en los casos de cromosopatías del cromosoma 9 en los que sólo se sólo se extrajeron datos de registros de estudios cromosómicos del Laboratorio de Citogenética del Departamento de Genética del Hospital Infantil de México Federico Gómez, dichos estudios fueron realizados en su momento con autorización de los pacientes, los padres o tutores.

En el caso de la paciente seleccionada para el caso clínico representativo, en la que se realizó toma de muestra de sangre periférica de menos de 450 ml, con la técnica habitual de venopunción, se consideró con riesgo mínimo. Se obtuvo consentimiento informado después de explicar a los padres los riesgos del procedimiento y beneficios del estudio. Se explicó el resultado a los mismos y se brindó el asesoramiento genético correspondiente.

9. RESULTADOS DEL ESTUDIO

9.1 FRECUENCIA DE LAS ALTERACIONES DEL CROMOSOMA 9

En el periodo de 2010 a 2019 se identificaron un total de 6,430 estudios citogenéticos realizados con técnica de bandas GTG. De este total, 69.3% de los casos (4,456 estudios) tuvieron un resultado normal.

La frecuencia total de alteraciones del cromosoma 9 fue de 1.41%, lo que corresponde a 91 pacientes en este periodo de tiempo (Tabla 1). Las principales indicaciones para realizar cariotipo en estos pacientes, fueron la presencia de malformaciones congénitas, el retraso del desarrollo psicomotor y la sospecha de cromosopatía en el probando, los resultados del análisis de estas indicaciones se ilustran en el Grafico 1.

Todos los casos de alteraciones en el cromosoma 9 correspondieron a alteraciones de tipo estructural, siendo las inversiones pericéntricas las más frecuentes con una frecuencia de 63.7% del total de cariotipos con alteración del cromosoma 9. Las segundas alteraciones más frecuentes fueron las translocaciones del cromosoma 9 presentes en el 13.1% (Tabla 3). Asimismo se cotejaron también aquellos casos con heteromorfismos de la región heterocromática del brazo largo del cromosoma 9 que representaron el 19.7% del total de los cariotipos con alteraciones en el cromosoma 9.

La Tabla 3 presenta la frecuencia anual y total de las alteraciones del cromosoma 9 en el periodo de 2010-2019. Cabe destacar que casi el 70% de los estudios citogenéticos realizados en nuestro Instituto presentaron una fórmula cromosómica normal. El pico de frecuencia de las alteraciones del cromosoma 9 se registró en el año 2016 con 13 casos reportados, un 14.28% del total de estudios con alteraciones del cromosoma 9. Los años que presentaron menor cantidad de casos fueron consecutivamente el 2012 y 2013, con 5 casos en cada año. Estos 5 casos representan el 5% del total. El promedio de casos para los 10 años fue de 9 casos/año.

Tabla 3. Frecuencia anual y total de las alteraciones en el cromosoma 9 identificados en el laboratorio de citogenética del HIMFG durante el periodo de estudio.

AÑO	CARIOTIPOS REALIZADOS EN EL AÑO	CARIOTIPOS CON RESULTADO NORMAL	CARIOTIPOS CON ALTERACIONES EN EL CROMOSOMA 9
2010	747	495 (66.2%)	12 (1.6%)
2011	704	517 (73.4%)	10 (1.4%)
2012	552	357 (64.6%)	5 (0.9%)
2013	664	472 (71%)	5 (0.75%)
2014	657	465 (82%)	11 (1.67%)
2015	705	486 (68.9%)	10 (1.41%)
2016	653	446 (68.3%)	13 (1.99%)
2017	652	469 (71.9%)	11 (1.68%)
2018	588	402 (68.3%)	6 (1.02%)
2019	508	347 (68.3%)	8 (1.57%)
TOTAL	6,430 (100%)	4,456 (69.3%)	91 (1.41%)

La Tabla 4 refleja la diferencia entre el número de casos por el género de los pacientes. Hay una mayor incidencia en los pacientes femeninos con una relación cercana a 1.5:1 mujeres por cada varón.

Tabla 4. Frecuencia anual y total de las alteraciones del cromosoma 9 en hombres y mujeres.

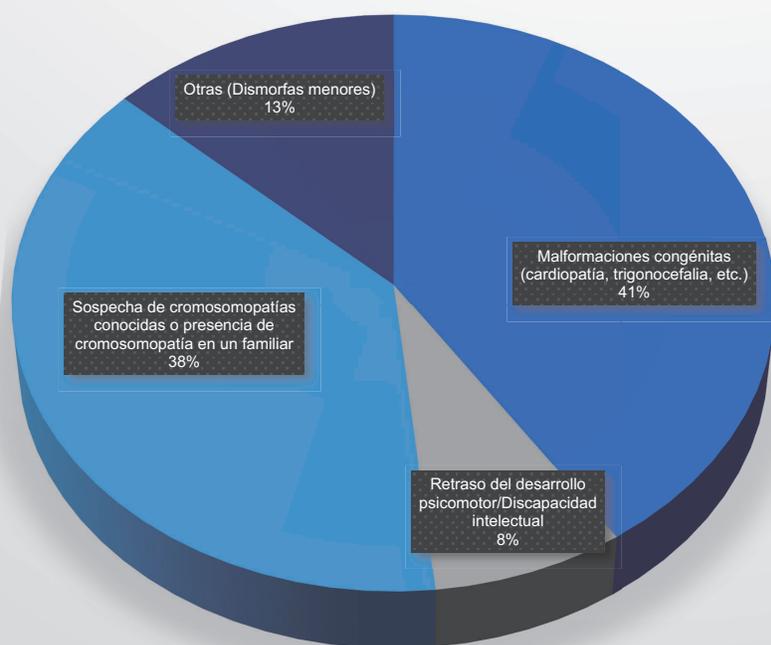
AÑO	CROMOSOMOPATÍAS DEL 9 EN VARONES	CROMOSOMOPATÍAS DEL 9 EN MUJERES
2010	6 (50%)	6 (50%)
2011	2 (20%)	8 (80%)
2012	2 (40%)	3 (60%)
2013	1 (20%)	4 (80%)
2014	6 (54%)	5 (46%)
2015	4 (40%)	6 (60%)
2016	8 (61.5%)	5 (38.4%)
2017	2 (18.1%)	9 (81.8%)
2018	3 (50%)	3 (50%)
2019	3 (37.5%)	5 (62.5%)
TOTAL	37 (40.65%)	54 (59.35%)

La Tabla 5 muestra la frecuencia anual por el tipo de cromosopatía estudiada. La alteración estructural más frecuente fue la inversión, representando el 63.7% de todos los casos. Las translocaciones representaron la segunda aberración más frecuente con el 13.1% de los estudios revisados. Los heteromorfismos se representaron con 19.7%. Las deleciones en conjunto presentaron una frecuencia del 3.2%.

Tabla 5. Frecuencia anual y total de las alteraciones del cromosoma 9 de acuerdo con el tipo de cromosopatía.

AÑO	DELECIÓN 9p	DELECIÓN 9q	INVERSIÓN	TRANSLOCACIÓN	HETEROMORFISMO
2010	0	0	8	1	3
2011	0	0	5	0	5
2012	1	1	2	0	1
2013	0	0	3	2	0
2014	1	0	6	3	1
2015	0	0	8	1	1
2016	0	0	9	2	2
2017	0	0	9	2	0
2018	0	0	5	1	0
2019	0	0	3	0	5
TOTAL	2 (2.19%)	1 (1.09%)	58 (63.7%)	12 (13.1%)	18 (19.7%)

Gráfico 1. Indicaciones para la toma de cariotipo entre los pacientes con alteraciones del cromosoma 9, n=91



- Malformaciones congénitas (cardiopatía, trigonocefalia, etc.)
- Retraso del desarrollo psicomotor/Discapacidad intelectual
- Sospecha de cromosopatías conocidas o presencia de cromosopatía en un familiar
- Otras (Dismorfias menores)

9.2. CASO CLÍNICO REPRESENTATIVO DE UNA ALTERACIÓN DEL CROMOSOMA 9

9.2.1 RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN CLÍNICA

Se trata de un paciente femenino de 10 años de edad, conocida en la consulta externa de Genética de nuestro Instituto a la edad de 4 años. Fue referida del servicio de Pediatría por la presencia de trigonocefalia y síndrome dismórfico.

La paciente es producto de la primera gesta de padres jóvenes al momento de la concepción, no consanguíneos, aparentemente sanos. La madre cursó con amenaza de aborto en el primer trimestre con manejo no especificado, asimismo, cursó con preeclampsia a partir de la semana 36 de gestación, sin referir manejo para la misma.

Se obtuvo a la paciente a las 41 semanas de gestación por vía abdominal por falta de progresión del trabajo de parto. La somatometría al nacimiento registró un peso de 3,300 g (p50-75), talla 49 cm (p10-25) y la escala de Apgar fue de 9 a los 5 minutos.

Dentro de sus antecedentes personales patológicos destaca la presencia de retraso global del desarrollo e hipotonía generalizada, la cual ameritó manejo por el servicio de Rehabilitación desde a los 4 años de edad. Se realizó remodelación craneal por trigonocefalia a los 6 años, actualmente recibe seguimiento por parte de Neurología y Neurocirugía. Se le han realizado dos estudios de audiometría, la última a los 6 años, ambas con audición normal bilateral. Presentó cuadro de varicela a los 7 años, sin complicaciones.

Se le practicó una tomografía de cráneo simple realizada a la edad de 6 años previa a la cirugía, la cual reportó cierre de la sutura metópica y quiste retrocerebeloso (presencia de área hipodensa en el hemisferio derecho del cerebelo) (Figura 19). La resonancia magnética de encéfalo mostró este mismo quiste retrocerebeloso y el tallo cerebral se reportó con menor diámetro ventrodorsal de lo esperado.

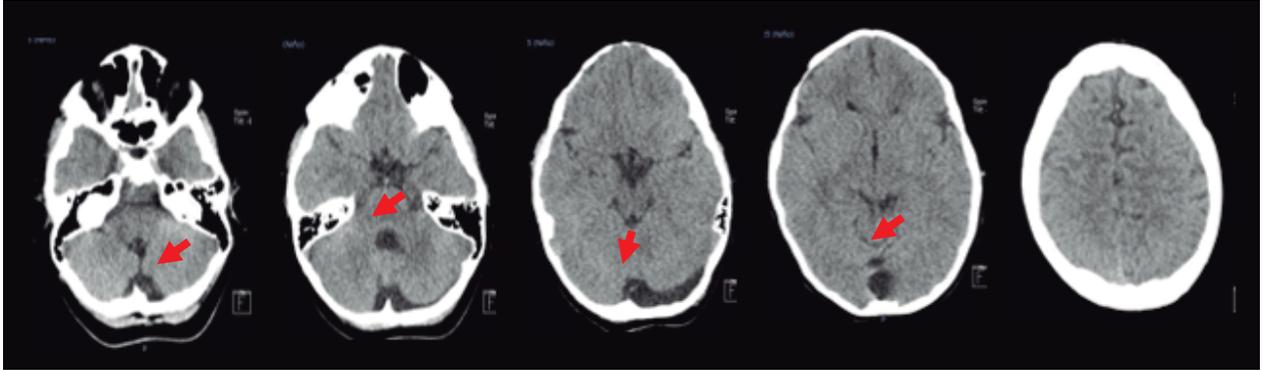


Figura 19. Tomografía computarizada simple de cráneo de la paciente. Se observa el quiste en la fosa posterior que comienza en la región media del cerebelo y sigue el trayecto del seno sagital. Llama la atención la aparente dilatación del acueducto cerebral en las dos imágenes de la extrema izquierda.



Figura 20. Fenotipo facial de la paciente. A) Fotografía frontal en la que se muestra la sutura metópica prominente (trigonocefalia). B) Fotografía lateral en la que se observa la braquicefalia, la hipoplasia de la región medifacial y la retrognatía. El pabellón auricular izquierdo se aprecia con hélix plegado.

A la exploración física inicial de la paciente se observó peso y talla adecuados para la edad (p15-50 para la edad y sexo de acuerdo a las tablas de la OMS), sutura metópica prominente secundaria a fusión prematura (trigonocefalia), con disminución de la distancia bitemporal. Los arcos supraciliares se observaron hipoplásicos con cejas arqueadas y bien pobladas, principalmente en los tercios medio y lateral. El puente nasal se observó elevado, con dorso recto y columna de adecuada implantación. El filtrum se valoró como largo y semiborrado. Se observó hipoplasia de la región medifacial así como una retrognatía leve. Los pabellones auriculares se apreciaron con implantación limítrofe y hélix plegado (Figura 20). En la región cardiopulmonar se encontró soplo holosistólico grado II/IV en foco tricuspídeo. El abdomen se encontró sin alteraciones, no se palparon crecimientos anormales en hígado o bazo. Los genitales fenotípicamente femeninos, Tanner I, sin anomalías visibles. En las extremidades inferiores, se observaron tibias con varo bilateral, braquidactilia del 4o. y 5o. dedo ambos pies, con mayor acortamiento del 4º orjejo del pie izquierdo, así como *talus valgus* (Figura 21). A la exploración neurológica era notoria la discapacidad intelectual de la paciente, sin otras alteraciones a este nivel.



Figura 21. Extremidades inferiores de la paciente. Se observa una braquidactilia que afecta principalmente al 4º y 5º orjejos en ambos pies. El primer orjejo del pie derecho también aparenta un acortamiento menos grave.

Se decidió la toma de cariotipo con base a la discapacidad intelectual, las malformaciones neurológicas y las dismorfias menores en la paciente. Se realizó además el cariotipo en ambos padres. Posteriormente, se realizó el estudio de microarreglos de SNPs.

9.2.2 RESULTADOS DEL ESTUDIO CITOGÉNÉTICO

El estudio citogenético convencional con bandas GTG arrojó como resultado un individuo con complemento de cromosomas sexuales femenino con una deleción terminal del brazo corto del cromosoma 9 (Figuras 22 y 23), cuya fórmula cromosómica se reportó como 46,XX,del(9)(p23)[25].

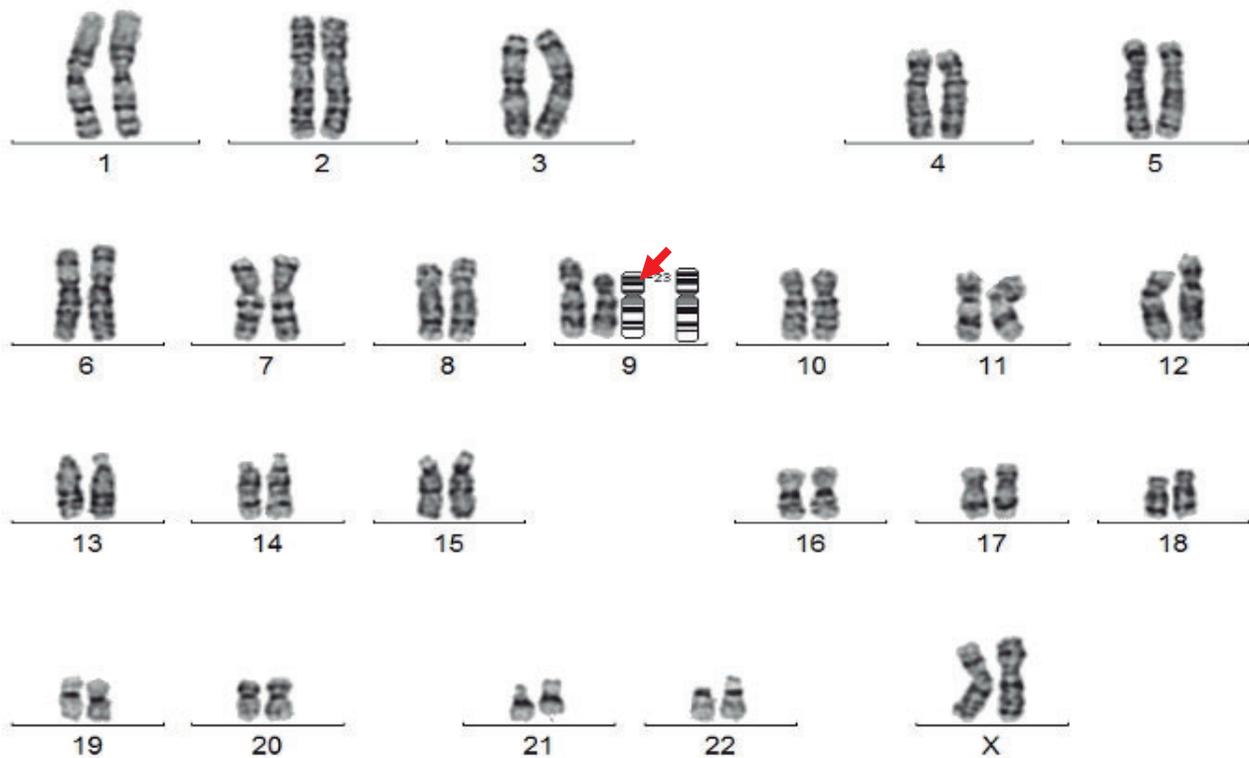


Figura 22. Cariotipo de bandas GTG de 450-500 bandas de resolución.

Se muestra la deleción terminal del brazo corto del cromosoma 9 con punto de ruptura en la región p23. (Imagen proporcionada por la Biol. Ariadna Berenice Morales Jiménez, Laboratorio de Citogenética, Hospital Infantil de México).

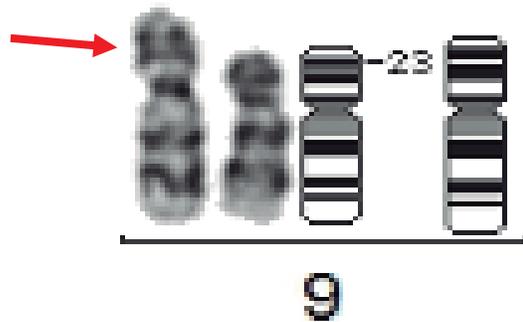


Figura 23. Cromosoma 9 en cariotipo e ideograma. Se muestra el cromosoma normal y el deletado, con la ausencia de la banda terminal. (Imagen proporcionada por la Biol. Ariadna Berenice Morales Jiménez, Laboratorio de Citogenética, Hospital Infantil de México).

El cariotipo de ambos padres resultó normal. El padre presentó un heteromorfismo benigno del cromosoma 21 (46,XY,21ptsk+[25]).

9.2.3 RESULTADOS DEL ESTUDIO DE MICROARREGLOS SNPs

El estudio de microarreglos en la paciente corroboró la pérdida de material en el brazo corto del cromosoma 9, correspondiente a una longitud de de 10.74 Mb (Figura 24).

También con este estudio se identificaron los puntos exactos de 9p22.1 (coordenada genómica en el nucleótido 18,885,862) en el extremo centromérico y 9p24.1 (coordenada genómica en el nucleótido 8,137,148) en el extremo telomérico.

La fórmula cromosómica final después de realizar este estudio fue:

arr[GRCh38] 9p24.1p22.1 (8,137,148_18,885,862)x1.

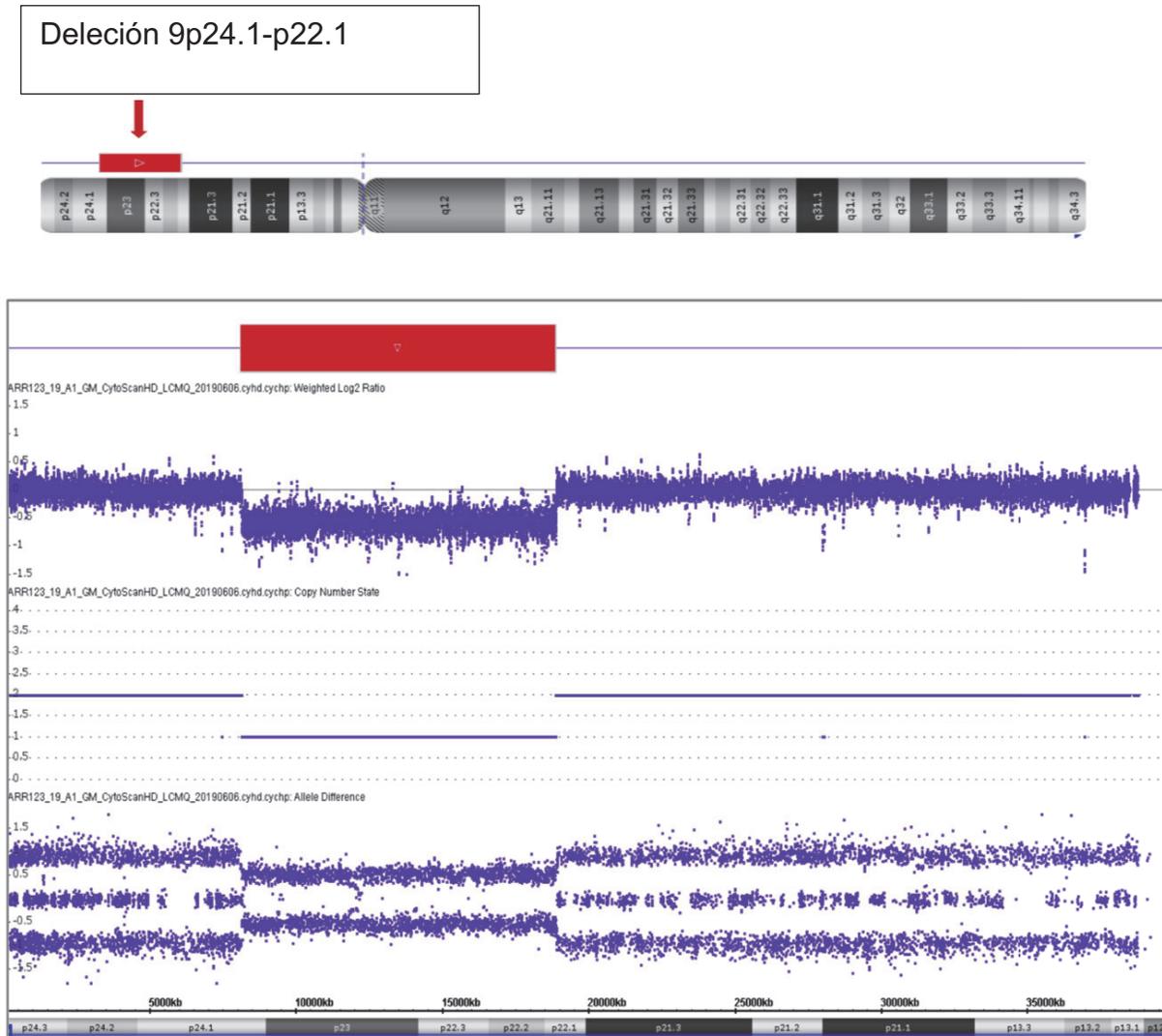


Figura 24. Resultado del estudio de microarreglos de SNPs Affymetrix HD CytoScan®. Se muestra arriba de la gráfica, la imagen representativa del cromosoma 9 y el sitio de la deleción. En la gráfica, la imagen de arriba corresponde a la escala Log^2 Rank que muestra la pérdida de material en el cromosoma 9. La imagen de abajo muestra la gráfica de diferencia alélica en la que puede observarse el cambio de una región diploide (3 líneas) a una haploide (2 líneas) y nuevamente un cambio a una región diploide; lo cuál concluye la pérdida de material genético en la región comprendida entre las bandas citogenéticas 9p22.1 hasta 9p24.1 que abarcan 10.74 Mb. (Imagen proporcionada por el *Dr. Cuauhtli Nacxiti Azotla Vilchis y la Dra. Luz del Carmen Márquez Quiroz. Laboratorio de Diagnóstico Molecular GENOS Médica*).

La región perdida contiene 15 genes registrados en la base de datos del Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM – www.omim.org) que se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 6. Genes involucrados en la delección de la paciente del caso clínico presentado.

Gen	Número OMIM	Proteína	Asociación con enfermedad monogénica
<i>PTPRD</i>	601598	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, delta polypeptide	No
<i>TYRP1</i>	115501	Tyrosinase-related protein 1	Sí, albinismo oculocutáneo tipo III (autosómico recesivo)
<i>LURAP1L</i>	616130	Leucine-rich adaptor protein like 1	No
<i>MPDZ</i>	603785	Multiple PDZ domain protein	Sí, hidrocefalia congénita con alteraciones oculares tipo II (autosómico recesivo)
<i>NFIB</i>	600728	Nuclear factor I/B	Macrocefalia adquirida con desarrollo intelectual anormal (autosómica dominante)
<i>ZDHHC21</i>	614605	Zinc finger DHHC domain-containing protein 21	No
<i>CER1</i>	603777	Cerebrus 1, Xenopus, homolog of	No
<i>FREM1</i>	608944	FRAS1-related extracellular matrix protein	Sí. Trigonocefalia tipo 2; Síndrome oculotricoanal tipo Manitoba; Nariz bífida con o sin malformaciones anorrectales y renales
<i>TTC39B</i>	613574	Tetratricopeptide repeat domain 39B	No
<i>SNAPC3</i>	602348	Small nuclear RNA-activating protein complex, polypeptide 3	No
<i>PSIP1</i>	603620	PC4-and SFRS1-interacting protein 1	No
<i>BNC2</i>	608669	Basonuclin 2	Sí. Obstrucción congénita de la vía urinaria (autosómica dominante)
<i>CNTLN</i>	611870	Centlein	No
<i>SH3GL2</i>	604465	SH3 domain, GRB2-like, 3	No
<i>ADAMSTSL1</i>	609198	A disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1(ADAMTS)-like protein 1	No

10. DISCUSIÓN

10.1 DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En el presente estudio se revisaron los registros del Laboratorio de Citogenética del Hospital Infantil de México Federico Gómez de los años 2010 al 2019 encontrando en total 6,430 estudios realizados, de los cuales, 4,456 fueron reportados como resultados con fórmula cromosómica normal. Estos resultados normales representan un 69.3% de las muestras procesadas con resultado reportado.

El 30.7% restante de los cariotipos que tuvieron un resultado anormal, incluyeron los estudiados solicitados por las indicaciones de sospecha de síndromes cromosómicos conocidos como la Trisomía 21 y el Síndrome de Turner, y otras indicaciones como la ambigüedad de genitales.

Algo que debe tomarse en cuenta al describir la frecuencia de cariotipos con resultado anormal que obtuvimos en este trabajo, es la minuciosidad de los registros del Laboratorio de Citogenética de nuestro Hospital que, apegados a la nomenclatura internacional, reportan también heteromorfismos cromosómicos considerados benignos como las variantes en el tamaño de las regiones satélite y los tallos de los cromosomas acrocéntricos así como las variaciones en el tamaño de las regiones de heterocromatina constitutiva de los cromosomas 1, 9, 16 y Y, que se han reportado hasta en 2-5% de la población general (Tempest & Simpson, 2017). Esto podría ser una explicación a nuestros resultados de una frecuencia alta de los cariotipos con resultado anormal.

Al analizar específicamente las alteraciones del cromosoma 9, encontramos 91 pacientes con alteraciones, representando el 1.41% de todos los cariotipos realizados en el periodo de 10 años. Dentro de estas 91 muestras es posible observar que los heteromorfismos son alteraciones cromosómicas frecuentes, sin embargo, estas no representan un problema de salud aparente aunque algunos autores han asociado estos heteromorfismos cromosómicos con casos de subfertilidad (Ni, Chen & Gao, 2017) pero estos estudios son poco concluyentes.

De los 91 resultados con alteraciones del cromosoma 9, 59 pacientes (63.7%) tuvieron una inversión pericéntrica del cromosoma 9. La inversión pericéntrica del cromosoma 9 involucra una región de heterocromatina constitutiva ubicada en el brazo largo del mismo que presenta un tamaño variable y ausencia de DNA transcripcionalmente activo, por lo que el cambio de su posición no parece intervenir en la expresión de los demás genes localizados en este cromosoma. En la mayoría de los casos, una inversión no provoca un fenotipo anormal en el portador, sin embargo se han asociado la inversión pericéntrica del 9 con alteraciones como discapacidad intelectual, esquizofrenia, síndrome de Walker-Warburg, espectro oculo-auriculo-vertebral, predisposición al cáncer e infertilidad. Recientemente, se ha proporcionado evidencia de que la presencia de una inversión constitucional 9 se correlaciona con una tasa significativamente mayor de aberraciones numéricas en el esperma de dichos portadores, tal vez debido a las influencias en la formación del complejo del sinaptonema (Kosyakova, 2013). En otros casos, los heteromorfismos del cromosoma 9 por lo general tienen todavía un significado clínico no comprendido (Kosyakova, 2013). En nuestra institución se encontró una frecuencia de 19.7% de heteromorfismos del total de cariotipos con resultado anormal.

Por otro lado, dentro de estos cariotipos que tuvieron una alteración clínicamente relevante del cromosoma 9, la alteración más frecuente fue las translocación del cromosoma 9 y otro autosoma, con una frecuencia del 13.1% del total de cariotipos con resultado anormal. La mayoría correspondieron a un caso familiar de una translocación (2;9) previamente reportada en una publicación de nuestro Instituto (León-Carlos et al, 2018). Esta alteración es interesante dada su baja frecuencia dentro de las alteraciones estructurales del cromosoma 9.

10.2 DISCUSIÓN DEL CASO CLÍNICO PRESENTADO.

Nos encontramos frente a una paciente que cumple dos de los criterios principales para la toma de estudio citogenético convencional: malformaciones congénitas y discapacidad intelectual de origen desconocido. Aunque las guías del ACMGG para este grupo de pacientes sugieren desde el año 2010 el uso de microarreglos como estudio de primera elección (Miller et al, 2010), no se contaba con ese estudio en ese momento, por lo que se realizó de forma inicial un cariotipo de bandas GTG, el cual permitió la caracterización de una alteración estructural del brazo corto del cromosoma 9.

Nuestra paciente presenta el dato cardinal de la delección 9p, la trigonocefalia, asociada a la haploinsuficiencia del gen *FREM1* localizado en la banda 9p22.3 que, como se mencionó anteriormente, se encuentra en la región delimitada como mínima para la expresión fenotípica del síndrome. *FREM1* codifica para la Proteína de Matriz Extracelular Relacionada con FRAS1 tipo 1 (Smyth et al, 2004). *FRAS1* codifica una proteína de la matriz extracelular del mesénquima alterada en el síndrome de Frasier (Van Haelst, 2008). La proteína FREM1 parece tener un papel en el desarrollo normal de los huesos frontales y por tanto se ha asociado su haploinsuficiencia con el cierre prematuro de la sutura metópica (Vissers et al, 2011).

Respecto a la hipotonía y el retraso del desarrollo psicomotor de nuestra paciente, esta es también una característica común en los pacientes con delección 9p y esto puede asociarse con un estancamiento del crecimiento de la circunferencia cefálica o a las malformaciones cerebrales (Vahabi et al, 2017). No existe un perfil neurocognitivo de los pacientes con síndrome de delección 9p, pero el retraso global del desarrollo es una característica reportada desde los primeros casos descritos por Alfi y colaboradores en 1973 y presentes en diversos reportes, incluyendo los pacientes descritos previamente en nuestro Instituto (León-Carlos et al, 2018).

Del resto de las dismorfias presentadas por nuestra paciente, destaca la braquidactilia de ambos pies, con mayor afección del 4º y 5º orfejos. La braquidactilia ha sido reportada

en estos pacientes pero es más común la referencia a la presencia de dedos largos en las manos (Hou, 2016) (Vahabi et al, 2017) que nuestra paciente no presentaba.

Las alteraciones a nivel cardíaco no son un reporte frecuente en estos pacientes pero las malformaciones asociadas suelen ser defectos septales y soplos, algunos con repercusiones hemodinámicas graves (Swinkels et al, 2008).

Las alteraciones de los genitales se asocian a pérdida de la región 9p24.3 en pacientes de sexo masculino (Muroya et al, 2000) situación que hace que en nuestra paciente no se esperen anomalías a este nivel como se observó tanto a la exploración física como en el ultrasonido pélvico.

Las malformaciones del sistema nervioso central son inespecíficas. Los reportes incluyen la presencia de quistes subaracnoideos, variantes anatómicas normales como el cavum septum pellucidum, megacisterna magna, entre otros (Spazzapan, 2015). Nuestra paciente presenta un quiste en la región retrocerebelosa que hasta el momento de su última revisión clínica no representó un problema clínico. Se encontró sin datos de síndrome cerebeloso, ataxia u otros déficits neurológicos además de la discapacidad intelectual. Por esta razón se decidió un manejo conservador.

Actualmente la paciente se encuentra en seguimiento por parte del servicio de Genética, Neurología y Rehabilitación. El resultado del estudio de microarreglos de SNPs ya fue explicado a la familia y se brindó el asesoramiento genético pertinente. Dada la heterogeneidad fenotípica de estos cuadros clínicos descritos, la paciente se benefició clínicamente de la realización de este estudio adicional al delinear la deleción que presentaba.

Por el método de citogenética convencional, la deleción de nuestra paciente parecía ser una deleción terminal que iniciaba en la banda 9p23. El estudio citogenético molecular permitió precisar la deleción que no se había caracterizado con el cariotipo convencional.

El conocimiento de los puntos de ruptura en los síndromes de delección permite delimitar la región mínima requerida para producir el fenotipo asociado a estos trastornos genómicos, a estas regiones se les conoce como regiones críticas y están descritas para un gran número de síndromes. Los genes incluidos en estas regiones pueden o no ser sensibles a dosis y se considera que solo uno o dos de ellos están involucrados principalmente en el desarrollo del fenotipo (Weise et al, 2012).

En el caso de nuestra paciente, los puntos de ruptura descritos en el resultado del estudio de microarreglos en efecto demuestran la pérdida de la banda 9p23, sin embargo, la delección abarca desde la región 9p22.1 hasta la región 9p24.1, lo cuál demuestra que la delección es en realidad de tipo intersticial, conservando la región subtelomérica del cromosoma 9, esto tiene implicaciones en las manifestaciones clínicas esperadas en los pacientes con este tipo de alteraciones.

En la descripción clínica de los pacientes con Síndrome de Alfi o una delección “clásica” a nivel de 9p se incluyen: Discapacidad intelectual, trigonocefalia, fisuras palpebrales ascendentes, hipoplasia medio facial, hipotonía y, en algunos casos, trastornos del desarrollo gonadal (León-Carlos et al, 2018). Las manifestaciones prenatales son poco conocidas ya que es infrecuente realizar el diagnóstico en esta etapa pero hay al menos un caso reportado de onfalocele en un feto de sexo femenino (Hou et al, 2016). La mayoría de los casos reportados se asocian a delecciones puras (es decir, no asociadas a otras alteraciones estructurales como translocaciones o inversiones paracéntricas) y los puntos de ruptura comunes ocurren en las bandas 9p22 y 9p24 (Hauge et al, 2008), lo cuál corresponde con nuestra paciente, que además de la trigonocefalia presentó hipoplasia medifacial e hipotonía.

Se considera que la haploinsuficiencia de *FREM1*, parece ser suficiente para generar la trigonocefalia pero esto no está completamente demostrado. Respecto a los otros genes de la región, muchos de ellos no se han descrito en síndromes monogénicos, sin embargo, la pérdida de una de sus copias podría tener un efecto conjunto para la creación del fenotipo asociado a la delección 9p, entre los genes descritos en esta región que

podrían tener un factor en el desarrollo del fenotipo se incluyen los que codifican para los factores de transcripción *NFIB*, *MPDZ*, *LURAP1L* y *ZDHHC21*, todos con expresión en tejido cerebral y los primeros dos se han asociado con alteraciones del desarrollo del SNC (Shaheen et al, 2017; Schanze et al, 2018).

Algunos estudios han determinado que la región crítica para las características faciales del síndrome de delección 9p se encuentra en las regiones 9p22.2-p23 de al menos 2 Mb de tamaño (Kawara et al, 2006) y que una delección de 3.5 hasta 15 Mb es suficiente para producir el fenotipo completo (Yang et al, 2014). La pérdida de la región 9p24.3 es importante ya que el gen *DMRT1* se ha asociado a trastornos de la diferenciación sexual, principalmente en varones (Vialard et al, 2002), no obstante esto no se ha observado en todos los casos.

En la Tabla 7 se resumen los hallazgos clínicos encontrados en diversos reportes. Hasta el año 2015 se habían reportado 100 casos de delecciones 9p (Spazzapan, 2015), dentro de los hallazgos encontrados en todos ellos se encuentra la trigonocefalia y el filtrum largo así como un grado variable de discapacidad intelectual. El tamaño de las delecciones es variable, con las menores reportadas de menos de 3 Mb y asociadas a trastornos de la diferenciación gonadal en varones (Veitia et al, 1998), y otras abarcando mayores tamaños. Se considera que en promedio se trata de delecciones visibles por citogenética convencional por abarcar entre 6.7 y 14 Mb (Hou et al, 2016; León-Carlos et al, 2018).

El asesoramiento genético de los pacientes con delección 9p debe incluir la revisión con métodos citogenéticos convencionales y, de considerarse necesario, moleculares en los padres, ya que al menos el 50% de las delecciones son secundarias a la presencia de un rearrreglo balanceado (translocación o inversión paracéntrica) en alguno de los progenitores (Gardner, 2012). El asesoramiento dependerá del tipo de aberración cromosómica presente y de cuál de los padres es el portador. En el caso de delecciones de novo, como en el caso de los padres de nuestra paciente se considera un riesgo de recurrencia similar al de la población general (1-3%) (León-Carlos et al, 2018) pero se recomendará a los padres recibir asesoramiento genético preconcepcional y prenatal en

caso de intentar un nuevo embarazo. En el caso del polimorfismo presentado en el cromosoma 21 por el padre de la paciente, este hasta el momento se considera de poca relevancia clínica (Tempest & Simpson, 2017). La paciente, en caso de ser madre, tendría un riesgo del 50% de heredar el cromosoma con la delección en cada embarazo, independientemente del sexo del feto, cabe mencionar que no se han reportado problemas de infertilidad en estos pacientes

Tabla 7. Hallazgos clínicos de pacientes reportados en la literatura comparados con el caso que se presenta. (+: Característica presente; -: característica ausente; NR: No reportado).

Característica clínica	Nuestra paciente 9p22.1-p24.1	Spazzapan et al, 2016 (6 pacientes reportados)	Vahabi, Hasan & Rad, 2017 (1 paciente reportado)	Hou et al, 2016 (1 paciente reportado)	León-Carlos et al, 2018 (2 pacientes reportados)
Trigonocefalia	+	6/6	+	+ / +	+ / -
Discapacidad intelectual / RDPM	+	6/6	+	+ / +	+ / +
Disminución del diámetro bitemporal	+	NR	NR	NR	+ / -
Cejas arqueadas	+		+	+ / +	- / +
Fisuras palpebrales ascendentes	+	5/6	+	NR	- / +
(descendentes)					
Ptosis	+	NR	+	NR	NR
Quistes aracnoideos	+	1/6	-	-	+ / -
Hipoplasia medifacial	+	2/6	NR	+ / +	- / -
Micrognatia/Retrognatia	+	1/6	+	NR	+ / -
Pabellones auriculares pequeños	-	6/6	+	- / -	+ / +
Filtrum largo	+	5/6	+	NR	+ / +
Anomalías cardíacas	+	4/6	NR	NR / -	+ / -
Atresia de coanas	-	1/6	NR	NR	NR
Epilepsia	-	1/6	+	NR	- / -
Hernia umbilical	-	3/6	NR	NR	NR
Hernia inguinal	-	1/6	NR	NR	NR
Onfalocele	-	1/6	NR	NR	NR
Anomalías de los genitales	-	1/6	NR	- / -	- / -
Dedos largos	-	2/6	NR	+ / +	- / +
Escoliosis	-	2/6	NR	NR	NR
Teletelia	-	1/6	NR	NR	- / +
Asimetría de miembros	-	1/6	NR	NR	NR
Braquidactilia	+	NR	NR	NR	- / -

11. CONCLUSIONES

En este estudio se identificaron las características clínicas y citogenéticas de los pacientes con alteraciones del cromosoma 9 del Hospital Infantil de México Federico Gómez durante el periodo de 2010 a 2019 y concluimos lo siguiente:

- Las alteraciones del cromosoma 9 en nuestra institución son frecuentes (1.41%) aunque la mayoría de ellas representen heteromorfismos cromosómicos que se consideran, hasta la fecha, de poca o nula relevancia clínica, aunque nuevos reportes han asociado estos heteromorfismos con una mayor tasa de infertilidad cuando se comparan con controles sin estas variantes.
- El estudio de microarreglos de SNPs es un método excelente para la caracterización de estas alteraciones cromosómicas debido a su mayor resolución y capacidad para detectar los puntos de ruptura y la cantidad exacta de genes involucrados en la región perdida o ganada.
- Nuestra paciente presenta las características clínicas cardinales del Síndrome de Alfi, el síndrome cromosómico mejor descrito dentro de las alteraciones del cromosoma 9. Aunque la región crítica para la aparición del fenotipo aún no ha sido determinada, nuestro reporte aporta nuevos datos clínicos para ampliar la descripción de este grupo de pacientes.
- El asesoramiento genético y el estudio de los padres es imperativo en los pacientes con delección 9p ya que hasta 50% podrían ser producto de una alteración balanceada (translocación o inversión) que podría incrementar el riesgo de recurrencia en la familia.
- Es importante la valoración por parte de un Genetista de todos los niños con discapacidad intelectual de origen desconocido, ya que la presencia de dismorfias menores que orienten a un diagnóstico podrían ser pasadas por alto en la atención de primer nivel.
- El estudio de cariotipo convencional es esencial para iniciar el abordaje de pacientes con discapacidad intelectual con o sin malformaciones congénitas, ya que puede detectar además alteraciones balanceadas que los métodos moleculares no pueden.

12. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividades	2018		2019		2020	
	1ºSem	2ºSem	1ºSem	2ºSem	1ºSem	2ºSem
Elaboración de protocolo						
Identificación de los casos y recolección de datos						
Revisión de literatura						
Análisis de resultados						
Identificación casos específicos						
Elaboración de tesis						
Correcciones y conclusiones finales						
Entrega de versión final						

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfi O, Donnell GN, Crandall BF, Derencsenyi A, Menon R (1973) Deletion of the short arm of chromosome no.9 (46,9p-): a new deletion syndrome. *Ann Genet* 16(1):17–22
- Baillet, A., & Mandon-Pepin, B. (2012). Mammalian ovary differentiation - a focus on female meiosis. *Molecular and cellular endocrinology*, 356(1-2), 13–23. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.09.029>
- Baynes J, Dominiczak M. (2019) *Bioquímica médica*, (5ª Ed.). South Carolina, US, Elsevier.
- Bejjani, B. A., & Shaffer, L. G. (2008). Clinical utility of contemporary molecular cytogenetics. *Annual review of genomics and human genetics*, 9, 71–86. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164207>
- Cammarata-Scalisi F. (2019). Trisomy 9p. A brief clinical, diagnostic and therapeutic description. Trisomía 9p. Una breve descripción clínica, diagnóstica y terapéutica. *Archivos argentinos de pediatría*, 117(5), e473–e476. <https://doi.org/10.5546/aap.2019.eng.e473>
- Campbell, I. M., Yatsenko, S. A., Hixson, P., Reimschisel, T., Thomas, M., Wilson, W., Dayal, U., Wheless, J. W., Crunk, A., Curry, C., Parkinson, N., Fishman, L., Riviello, J. J., Nowaczyk, M. J., Zeesman, S., Rosenfeld, J. A., Bejjani, B. A., Shaffer, L. G., Cheung, S. W., Lupski, J. R., ... Scaglia, F. (2012). Novel 9q34.11 gene deletions encompassing combinations of four Mendelian disease genes: STXBP1, SPTAN1, ENG, and TOR1A. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 14(10), 868–876. <https://doi.org/10.1038/gim.2012.65>
- Cha, R. S., & Hartsuiker, E. (2014). *Meiosis. Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001359.pub3>
- El Khattabi, L., Jaillard, S., Andrieux, J., Pasquier, L., Perrin, L., Capri, Y., ... Verloes, A. (2015). *Clinical and molecular delineation of Tetrasomy 9p syndrome:*

Report of 12 new cases and literature review. American Journal of Medical Genetics Part A, 167(6), 1252–1261. [doi:10.1002/ajmg.a.36932](https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36932)

- Elkon, R., & Agami, R. (2017). Characterization of noncoding regulatory DNA in the human genome. *Nature biotechnology*, 35(8), 732–746. <https://doi.org/10.1038/nbt.3863>
- Galati, A., Micheli, E., & Cacchione, S. (2013). Chromatin structure in telomere dynamics. *Frontiers in oncology*, 3, 46. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00046>
- Gardner R.J., McKinklay (2012) *Chromosome abnormalities and genetic counseling* (4^a ed.). New York, US: Oxford University Press, Inc.
- Genetics Home Reference, National Library of Medicine, National Institutes of Health. Revisado en febrero 2020. <https://ghr.nlm.nih.gov/chromosome/9#conditions>
- Gersen S, Keagle M (2013). Chapter 2: DNA, Chromosomes and Cell Division. En *Principles of Clinical Cytogenetics*, 3rd. Ed. pp. 9-23
- Grewal, S. I., & Jia, S. (2007). Heterochromatin revisited. *Nature reviews. Genetics*, 8(1), 35–46. <https://doi.org/10.1038/nrg2008>
- Guilherme, R. S., Meloni, V. A., Perez, A. B., Pilla, A. L., de Ramos, M. A., Dantas, A. G., Takeno, S. S., Kulikowski, L. D., & Melaragno, M. I. (2014). Duplication 9p and their implication to phenotype. *BMC medical genetics*, 15, 142. <https://doi.org/10.1186/s12881-014-0142-1>
- Hansen NJ, Poole JC, Andrews LG, Tollefsbol TO (2005). Telomerase: Structures and function. *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons Ltd. [doi: 10.1038/npg.els.0006167](https://doi.org/10.1038/npg.els.0006167)
- Hauge, X., Raca, G., Cooper, S., May, K., Spiro, R., Adam, M., & Martin, C. L. (2008). Detailed characterization of, and clinical correlations in, 10 patients with distal deletions of chromosome 9p. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 10(8), 599–611. <https://doi.org/10.1097/gim.0b013e31817e2bde>

- Heidenreich, B., & Kumar, R. (2017). TERT promoter mutations in telomere biology. *Mutation research*, 771, 15–31.
<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.11.002>
- Holmquist GP (2005). Chromosomal bands and sequence features. Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons Ltd. [doi: 10.1038/npg.els.000502](https://doi.org/10.1038/npg.els.000502)
- Hou, Q.-F., Wu, D., Chu, Y., & Liao, S.-X. (2016). *Clinical findings and molecular cytogenetic study of de novo pure chromosome 9p deletion: Pre- and postnatal diagnosis. Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 55(6), 867–870. [doi:10.1016/j.tjog.2016.11.001](https://doi.org/10.1016/j.tjog.2016.11.001)
- Hsieh CL (2011). Cytogenetic techniques. Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons Ltd. [doi: 10.1002/9789470015902.a0002650.pub2](https://doi.org/10.1002/9789470015902.a0002650.pub2)
- Humphray, S. J., Oliver, K., Hunt, A. R., Plumb, R. W., Loveland, J. E., Howe, K. L., Andrews, T. D., Searle, S., Hunt, S. E., Scott, C. E., Jones, M. C., Ainscough, R., Almeida, J. P., Ambrose, K. D., Ashwell, R. I., Babbage, A. K., Babbage, S., Bagguley, C. L., Bailey, J., Banerjee, R., ... Dunham, I. (2004). DNA sequence and analysis of human chromosome 9. *Nature*, 429(6990), 369–374.
<https://doi.org/10.1038/nature02465>
- Inayama, Y., Yoneda, H., Fukushima, K., Sakai, J., Asaba, H., & Sakai, T. (1997). Paracentric inversion of chromosome 9 with schizoaffective disorder. *Clinical genetics*, 51(1), 69–70. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.1997.tb02419.x>
- Kannu, P., Winship, I., & Aftimos, S. (2005). Further case report of a child with a 9q34 deletion and a review of the reported cases. *American journal of medical genetics. Part A*, 133A(2), 219–221. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.30507c>
- Kamath, B. M., Thiel, B. D., Gai, X., Conlin, L. K., Munoz, P. S., Glessner, J., Clark, D., Warthen, D. M., Shaikh, T. H., Mihci, E., Piccoli, D. A., Grant, S. F., Hakonarson, H., Krantz, I. D., & Spinner, N. B. (2009). SNP array mapping of chromosome 20p deletions: genotypes, phenotypes, and copy number variation. *Human mutation*, 30(3), 371–378. <https://doi.org/10.1002/humu.20863>
- Karp G (2013). Capítulo 12: El núcleo celular y el control de la expresión génica. En: *Biología Celular y Molecular*, 6ª Ed. McGraw-Hill. pp. 485-508

- Kass DH, Batzer MA. (2004). Genome Organization: Human. En: *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & sons, Ltd.
- Kawara, H., Yamamoto, T., Harada, N., Yoshiura, K., Niikawa, N., Nishimura, A., Mizuguchi, T., & Matsumoto, N. (2006). Narrowing candidate region for monosomy 9p syndrome to a 4.7-Mb segment at 9p22.2-p23. *American journal of medical genetics. Part A*, 140(4), 373–377.
- Kosyakova, N., Grigorian, A., Liehr, T., Manvelyan, M., Simonyan, I., Mkrtchyan, H., Aroutiounian, R., Polityko, A. D., Kulpanovich, A. I., Egorova, T., Jaroshevich, E., Frolova, A., Shorokh, N., Naumchik, I. V., Volleth, M., Schreyer, I., Nelle, H., Stumm, M., Wegner, R. D., Reising-Ackermann, G., ... Ergul, E. (2013). Heteromorphic variants of chromosome 9. *Molecular cytogenetics*, 6(1), 14. <https://doi.org/10.1186/1755-8166-6-14>
- Klug S. W., Cummings M.R., Spencer C.A. Palladino M.A. (2013) *Concepts of genetic*, (Ed.11). Editorial: PEARSON.
- Krebs, J., Goldstein, E., & Kilpatrick, S. (2014). *Lewin's Genes XI*. Burlington, MA: Jones & Bartlett Learning, LLC.
- León-Carlos, N. Y., García-Delgado, C., Morales-Jiménez, A. B., Serrano-Bello, C., Cervantes, A., & Morán Barroso, V. F. (2018). Monosomy 9p24 in two non-related patients as result of a translocation (2;9). Monosomía 9p24 secundaria a translocación (2;9) en dos pacientes no relacionadas. *Archivos argentinos de pediatría*, 116(4), e603–e608. <https://doi.org/10.5546/aap.2018.e603>
- Loane, M., Morris, J. K., Addor, M. C., Arriola, L., Budd, J., Doray, B., Garne, E., Gatt, M., Haeusler, M., Khoshnood, B., Klungsoyr Melve, K., Latos-Bielenska, A., McDonnell, B., Mullaney, C., O'Mahony, M., Queisser-Wahrendorf, A., Rankin, J., Rissmann, A., Rounding, C., Salvador, J., ... Dolk, H. (2013). Twenty-year trends in the prevalence of Down syndrome and other trisomies in Europe: impact of maternal age and prenatal screening. *European journal of human genetics : EJHG*, 21(1), 27–33. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2012.94>
- Luger, K., & Hansen, J. C. (2005). Nucleosome and chromatin fiber dynamics. *Current opinion in structural biology*, 15(2), 188–196. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2005.03.006>

- Luthardt FW, Keitges E (2001). Chromosomal syndromes and genetic disease. *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons Ltd. [doi:10.1038/npg.els.0001446](https://doi.org/10.1038/npg.els.0001446)
- Miller, D. T., Adam, M. P., Aradhya, S., Biesecker, L. G., Brothman, A. R., Carter, N. P., ... Ledbetter, D. H. (2010). *Consensus Statement: Chromosomal Microarray Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies*. *The American Journal of Human Genetics*, 86(5), 749–764. [doi: 10.1016/j.ajhg.2010.04.006](https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.04.006).
- Miller, M. P., Amon, A., & Ünal, E. (2013). Meiosis I: when chromosomes undergo extreme makeover. *Current opinion in cell biology*, 25(6), 687–696. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.07.009>
- Moore, C. M., & Best, R. G. (2001). *Chromosomal Genetic Disease: Structural Aberrations*. *Encyclopedia of Life Sciences*. [doi:10.1038/npg.els.0001452](https://doi.org/10.1038/npg.els.0001452)
- Moore, C. M., & Best, R. G. (2007). *Chromosome Mechanics*. *Encyclopedia of Life Sciences*. [https://doi:10.1002/9780470015902.a0001441.pub2](https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001441.pub2)
- Muroya, K., Okuyama, T., Goishi, K., Ogiso, Y., Fukuda, S., Kameyama, J., Sato, H., Suzuki, Y., Terasaki, H., Gomyo, H., Wakui, K., Fukushima, Y., & Ogata, T. (2000). Sex-determining gene(s) on distal 9p: clinical and molecular studies in six cases. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 85(9), 3094–3100. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.9.6771>
- Musani, V., Cretnik, M., Situm, M., Basta-Juzbasic, A., & Levanat, S. (2009). Gorlin syndrome patient with large deletion in 9q22.32-q22.33 detected by quantitative multiplex fluorescent PCR. *Dermatology (Basel, Switzerland)*, 219(2), 111–118. <https://doi.org/10.1159/000219247>
- Ni, T., Li, J., Chen, H., Gao, Y., Gao, X., Yan, J., & Chen, Z. J. (2017). Male chromosomal polymorphisms reduce cumulative live birth rate for IVF couples. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 34(8), 1017–1025. <https://doi.org/10.1007/s10815-017-0951-1>
- Nurse P. (2000). A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell*, 100(1), 71–78. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81684-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81684-0)

- Ogiyama, Y., & Ishii, K. (2012). The smooth and stable operation of centromeres. *Genes & genetic systems*, 87(2), 63–73. <https://doi.org/10.1266/ggs.87.63>
- Papoulidis, I., Kontodiou, M., Tzimina, M., Saitis, I., Hamid, A. B., Klein, E., Kosyakova, N., Kordass, U., Kunz, J., Siomou, E., Nicolaidis, P., Orru, S., Thomaidis, L., Liehr, T., Petersen, M. B., & Manolakos, E. (2012). Tetrasomy 9p mosaicism associated with a normal phenotype in two cases. *Cytogenetic and genome research*, 136(4), 237–241. <https://doi.org/10.1159/000337520>
- Patel, A. (2019) Chromosomal Microarray Analysis Using Array Comparative Genomic Hybridization on DNA from Amniotic Fluid and Chorionic Villus Sampling in Prenatal Diagnosis, 2nd Ed. - Methods in Molecular Biology.
- Przewloka, M. R., & Glover, D. M. (2009). The kinetochore and the centromere: a working long distance relationship. *Annual review of genetics*, 43, 439–465. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134310>
- Rando, O. J., & Chang, H. Y. (2009). Genome-wide views of chromatin structure. *Annual review of biochemistry*, 78, 245–271. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.071107.134639>
- Reddy, U. M., Page, G. P., & Saade, G. R. (2012). The role of DNA microarrays in the evaluation of fetal death. *Prenatal diagnosis*, 32(4), 371–375. <https://doi.org/10.1002/pd.3825>
- Robinson, P. J., & Rhodes, D. (2006). Structure of the '30 nm' chromatin fibre: a key role for the linker histone. *Current opinion in structural biology*, 16(3), 336–343. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2006.05.007>
- Robinson WP, McFadden D. (2002). Chromosomal genetic disease: numerical aberrations. Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons Ltd. [doi: 10.1002/9789470015902.a0001451.pub2](https://doi.org/10.1002/9789470015902.a0001451.pub2)
- Roncalés-Samanes, P., Peña-Segura, J. L., Fernando-Martínez, R., Fuertes-Rodrigo, C., García-Oguiza, A., & López-Pisón, J. (2014). Síndrome de Gorlin en la edad pediátrica [Gorlin syndrome in the paediatric age]. *Revista de neurología*, 58(7), 303–307.

- Schanze, I., Bunt, J., Lim, J., Schanze, D., Dean, R. J., Alders, M., Blanchet, P., Attié-Bitach, T., Berland, S., Boogert, S., Boppudi, S., Bridges, C. J., Cho, M. T., Dobyns, W. B., Donnai, D., Douglas, J., Earl, D. L., Edwards, T. J., Faivre, L., Fregeau, B., ... Richards, L. J. (2018). NFIB Haploinsufficiency Is Associated with Intellectual Disability and Macrocephaly. *American journal of human genetics*, 103(5), 752–768. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.10.006>
- Shaheen, R., Sebai, M. A., Patel, N., Ewida, N., Kurdi, W., Altweijri, I., Sogaty, S., Almardawi, E., Seidahmed, M. Z., Alnemri, A., Madirevula, S., Ibrahim, N., Abdulwahab, F., Hashem, M., Al-Sheddi, T., Alomar, R., Alobeid, E., Sallout, B., AlBaqawi, B., AlAali, W., ... Alkuraya, F. S. (2017). The genetic landscape of familial congenital hydrocephalus. *Annals of neurology*, 81(6), 890–897. <https://doi.org/10.1002/ana.24964>
- Sharkey, F. H., Maher, E., & FitzPatrick, D. R. (2005). Chromosome analysis: what and when to request. *Archives of disease in childhood*, 90(12), 1264–1269. <https://doi.org/10.1136/adc.2004.068668>
- Shaw, C. J. & Lupski, J. R. (2004). *Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. Human Molecular Genetics*, 13(90001), 57R–64. doi:10.1093/hmg/ddh073
- Smyth, I., Du, X., Taylor, M. S., Justice, M. J., Beutler, B., & Jackson, I. J. (2004). The extracellular matrix gene *Frem1* is essential for the normal adhesion of the embryonic epidermis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(37), 13560–13565. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402760101>
- Spazzapan, P., Arnaud, E., Baujat, G., Nizon, M., Malan, V., Brunelle, F., & Di Rocco, F. (2016). Clinical and neuroradiological features of the 9p deletion syndrome. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*, 32(2), 327–335. <https://doi.org/10.1007/s00381-015-2957-2>
- Speicher, M. R., & Carter, N. P. (2005). The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nature reviews. Genetics*, 6(10), 782–792. <https://doi.org/10.1038/nrg1692>

- Spinner N B, Saitta S C, Emanuel B S. (2007). *Deletions and other structural abnormalities of the autosomes. Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics*. Philadelphia: Elsevier.
- Stratchan T, Read A. Capítulo 2: Estructura y función de los cromosomas. En: *Genética Humana*. Mc-Graw-Hill Interamericana, 2006. p. 33-56.
- Swinkels, M. E., Simons, A., Smeets, D. F., Vissers, L. E., Veltman, J. A., Pfundt, R., de Vries, B. B., Faas, B. H., Schrandt-Stumpel, C. T., McCann, E., Sweeney, E., May, P., Draaisma, J. M., Knoers, N. V., van Kessel, A. G., & van Ravenswaaij-Arts, C. M. (2008). Clinical and cytogenetic characterization of 13 Dutch patients with deletion 9p syndrome: Delineation of the critical region for a consensus phenotype. *American journal of medical genetics. Part A*, 146A(11), 1430–1438. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32310>
- Tempest, H. G., & Simpson, J. L. (2017). Why are we still talking about chromosomal heteromorphisms?. *Reproductive biomedicine online*, 35(1), 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.05.006>
- Trask B. J. (2002). Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting. *Nature reviews. Genetics*, 3(10), 769–778. <https://doi.org/10.1038/nrg905>
- Tuğ, E., Ergün, M. A., & Perçin, E. F. (2018). Clinical findings in cases with 9q deletion encompassing the 9q21.11q21.32 region. *The Turkish journal of pediatrics*, 60(1), 94–98. <https://doi.org/10.24953/turkiped.2018.01.015>
- Van Haelst, M. M., Maiburg, M., Baujat, G., Jadeja, S., Monti, E., Bland, E., Pearce, K., Fraser Syndrome Collaboration Group, Hennekam, R. C., & Scambler, P. J. (2008). Molecular study of 33 families with Fraser syndrome new data and mutation review. *American journal of medical genetics. Part A*, 146A(17), 2252–2257. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32440>
- Vahabi, A., Hazan, F., & Rad, I. A. (2017). A Case Report of 9p Deletion Syndrome Associated with Partial Trisomy of 1q42. *Maedica*, 12(1), 55–58.
- Veitia, R. A., Nunes, M., Quintana-Murci, L., Rappaport, R., Thibaud, E., Jaubert, F., Fellous, M., McElreavey, K., Gonçalves, J., Silva, M., Rodrigues, J. C., Caspurro, M., Boieiro, F., Marques, R., & Lavinha, J. (1998). Swyer syndrome and

- 46,XY partial gonadal dysgenesis associated with 9p deletions in the absence of monosomy-9p syndrome. *American journal of human genetics*, 63(3), 901–905. <https://doi.org/10.1086/302023>
- Vialard, F., Ottolenghi, C., Gonzales, M., Choiset, A., Girard, S., Siffroi, J. P., McElreavey, K., Vibert-Guigue, C., Sebaoun, M., Joyé, N., Portnoï, M. F., Jaubert, F., & Fellous, M. (2002). Deletion of 9p associated with gonadal dysfunction in 46,XY but not in 46,XX human fetuses. *Journal of medical genetics*, 39(7), 514–518. <https://doi.org/10.1136/jmg.39.7.514>
 - Vissers, L. E., Cox, T. C., Maga, A. M., Short, K. M., Wiradjaja, F., Janssen, I. M., Jehee, F., Bertola, D., Liu, J., Yagnik, G., Sekiguchi, K., Kiyozumi, D., van Bokhoven, H., Marcelis, C., Cunningham, M. L., Anderson, P. J., Boyadjiev, S. A., Passos-Bueno, M. R., Veltman, J. A., Smyth, I., ... Roscioli, T. (2011). Heterozygous mutations of *FREM1* are associated with an increased risk of isolated metopic craniosynostosis in humans and mice. *PLoS genetics*, 7(9), e1002278. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002278>
 - Watson, J.D. (5^a Ed.). (2008). *Biología Molecular del Gen*. Madrid, España: Editorial Panamericana.
 - Warren, J. E., Turok, D. K., Maxwell, T. M., Brothman, A. R., & Silver, R. M. (2009). Array comparative genomic hybridization for genetic evaluation of fetal loss between 10 and 20 weeks of gestation. *Obstetrics and gynecology*, 114(5), 1093–1102. <https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e3181bc6ab0>
 - Weil, P. A. (2013) Capítulo 34: Estructura y Función del Ácido Nucleico en Harper Bioquímica Ilustrada 29^a Ed. Lange–McGraw-Hill.
 - Weise, A., Mrasek, K., Klein, E., Mulatinho, M., Llerena, J. C., Jr, Hardekopf, D., Pekova, S., Bhatt, S., Kosyakova, N., & Liehr, T. (2012). Microdeletion and microduplication syndromes. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 60(5), 346–358. <https://doi.org/10.1369/0022155412440001>
 - Woodcock C. L. (2006). Chromatin architecture. *Current opinion in structural biology*, 16(2), 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2006.02.005>

- Worsham, M. J., Miller, D. A., Devries, J. M., Mitchell, A. R., Babu, V. R., Surli, V., Weiss, L., & Van Dyke, D. L. (1989). A dicentric recombinant 9 derived from a paracentric inversion: phenotype, cytogenetics, and molecular analysis of centromeres. *American Journal of Human Genetics*, 44(1), 115–123.
- Yang HX, Feng JZ, Wei SY, Tian-Jie LI, Jia LY, Fan HF, (2014) Chromosome karyotype analysis of umbilical blood samples in 2036 newborns. *J Int Reprod Health Fam Plan* 2014;33:478e80. [doi: 10.22074/ijfs.2016.5046](https://doi.org/10.22074/ijfs.2016.5046)

14. LIMITACIÓN DEL ESTUDIO

El presente estudio tiene diversas limitaciones por su carácter descriptivo.

La estimación de la frecuencia de las alteraciones del cromosoma 9 puede verse sobrerrepresentada, ya que no se estudió a la población en general, sino un grupo de pacientes pertenecientes a nuestra institución.

En la revisión del caso clínico representativo, el fenotipo puede verse afectado por características propias de la paciente, que son variantes o rasgos familiares. La selección de dicho paciente se realizó con fines ilustrativos, esta selección no fue al azar.

15. ANEXOS.

ANEXO 1. Técnica caritipo con bandas GTG en sangre periférica

Toma de muestra

Material:

- Jeringa 3 ml
- Heparina de Sodio (1000UI/ML)
- Solución antiséptica (etanol al 70%)
- Torundas de algodón (humedecida en etanol 96%)
- Gasas
- Guantes desechables

Equipo

- Campana flujo laminar

Método

Con guantes puestos tomar una gasa humedecida en solución antiséptica y limpiar la superficie de la campana, coloque el material a utilizar.

Prepare la jeringa dentro de la campana de flujo, limpie con torunda el tapón del frasco ampolla de heparina, introduzca la aguja y succione el contenido, baje el embolo de la jeringa hasta el tope y regrese el contenido al mismo frasco, asegúrese de bañar la pared interna de la jeringa con heparina, deje 0.1 ml en el cuerpo de la jeringa al final.

Al terminar el proceso, tomar una gasa humedecida en solución antiséptica, limpiar la superficie de la campana. Esterilizar con luz ultravioleta por un periodo de 15 a 30 minutos.

Limpie con una torunda de algodón el área donde se tomará la muestra.

La muestra debe ser tomada por técnica cerrada; por venopunción o por cateter, pues será sujeta a cultivo celular por lo que no puede ser por goteo, en caso de ser tomada por cateter éste debe ser lavado previamente.

Tomar 2 ml de sangre periférica para el estudio (mínimo requerido 1 ml), etiquetar la jeringa con el número de registro asignado por el laboratorio (número consecutivo de

registro de recepción de muestras por el laboratorio, seguido por un punto y el número 1, si es la primera vez que se le toma muestra al paciente ó número 2 o 3, etc. Si es repetición del estudio, seguido por un guión y el año en que se toma la muestra), y las iniciales del nombre del paciente.

Al término de la toma se re-encapucha la aguja y se introduce en la camisa donde viene originalmente la jeringa, poner el número de control en ella con plumón indeleble y cerrar el empaque con grapas; una a cada lado del émbolo. Engrapado la muestra con la solicitud del estudio, el consentimiento informado y la copia (amarilla) del recibo de pago, toda la documentación será marcada con el número asignado a la muestra en la esquina superior derecha indeleble.

Al término de la toma de muestra entregar al laboratorio para continuar con el procedimiento no. 2.

METODO DE CULTIVO DE SANGRE

Material

- Medio de cultivo suplementado, especial para cariotipo (PB Max)
- Tubos de ensayo de 15 ml estériles desechables de polipropileno
- Guantes estériles
- Gasas
- Jeringa estéril de 20 ml
- Aguja amarilla (20x32)
- Cinta adhesiva
- Marcador indeleble

Equipo

- Campana de flujo laminar
- Incubadora

Método

Todo el proceso se realiza con guantes estériles y en la campana de flujo laminar

En vaso de precipitados colocar agua corriente, e introducir el frasco con medio de cultivo, ya descongelado agitar suavemente sin crear burbujas, verificar que el medio de cultivo esté homogéneo y no tener precipitado.

Preparar dos tubos por cada muestra, rotularlos con las letras A y B, con el número de registro asignado a la muestra, los datos se marcarán de la siguiente manera.

En la tapa de cada tubo se coloca la letra y el número del cultivo.

En el cuerpo del tubo se coloca un fragmento de cinta adhesiva con el número completo de la muestra, las iniciales del paciente y la letra correspondiente a cada tubo.

Limpiar el frasco con gasa impregnado con solución antiséptica y retirar el sello de la seguridad, limpiar nuevamente con solución antiséptica.

Retire la envoltura de la jeringa (20ml) y jale suavemente el medio sin crear burbujas.

En cada tubo colocar 5 ml de medio de cultivo. Procedimiento: deslice el medio por la pared del tubo sin crear burbujas, tpe inmediatamente el tubo. Realizar todas las alicuotas del medio en una sola exhibición, las alicuotas no utilizadas guardarlas en congelación (-20°C).

Tomar la muestra, agitar suavemente, ya homogénea retire la aguja con todo y capuchón.

Desechar la primera gota en una gasa.

Inocular en cada tubo 12 a 16 gotas de la muestra

Tape inmediatamente y agite suavemente para homogenizar

Introduzca los tubos en la incubadora

Incubar los cultivos 37 °C por un periodo de 72 horas.

COSECHA

Material

- Solución trabajo de colchicina (0.02%)
- Solución hipotónica de Cloruro de potasio (KCL) 0.075M
- Solución carnoy (fijador)
- Vasos precipitados
- Micro pipeta

- Puntas para micro pipeta
- Pipeta de transferencia

Equipo

- Campana de flujo laminar
- Centrifuga
- Incubadora
- Refrigerar
- Vortex (agitador)
- Cronómetro

Método

Sacar los tubos de la incubadora, agregar 20 μ l de la solución trabajo de colchicina.

Incubar nuevamente por 25 minutos

Calentar la solución hipotónica a 37°C (en incubadora)

Al término del tiempo de exposición centrifugar 10 minutos a 2500 rpm

Remover el sobrenadante, con pipeta de transferencia, dejar un poco del líquido sobre el botón celular

Resuspender el botón celular en el vórtex

Adicionar lentamente y con agitación 1-2 ml de solución hipotónica (a 37°C)

Fuera del vórtex llevar el volumen a 10 ml

Agitar para homogenizar

Incubar por 20 minutos

Elabrar la solución de Carnoy (fijador) y refrigerar

Al término del tiempo de exposición, sacar los tubos de la incubadora

Agregar 1 ml de fijador a cada tubo

Agitar suavemente hasta obtener un viraje en la suspensión, de color rojo vivo a un marrón oscuro (para el proceso anterior)

Centrifugar 10 minutos a 2500 rpm

Remover el sobrenadante, con pipeta de transferencia

Resuspender el botón celular, adicionar lentamente y con agitación constante 1 ml de solución fijadora (recién preparada y fría)

Fuera del vórtex llevar el volumen a 8 ml

Agitar para homogenizar

Centrifugar 10 minutos a 2500 rpm

Remover el sobrenadante y adicionar con agitación constante a 8 ml de solución fijadora

Repetir los pasos hasta obtener una de dos condiciones:

Botón celular blanco

Sobrenadante transparente

Realice inmediatamente el siguiente procedimiento

REVISIÓN Y EXTENDIDO DEL CULTIVO CELULAR

Material

- Portaobjetos
- Agua fría
- Alcohol etílico al 96%
- Pipetas
- Lapiz punta diamante (carburo tungsteno)
- Pinzas punta roma
- Vaso precipitados

Equipo

- Centrifuga
- Vórtex
- Microscopio
- Estufa a 60°C

Método

Los portaobjetos son previamente tratados con dextrán, enjuagados con agua destilada y preservados en alcohol en refrigeración

Poner los portaobjetos en un vaso de precipitados llevar el volumen del vaso a $\frac{3}{4}$ con agua fría

Retirar el sobrenadante de los tubos (a revisión) con pipeta de transferencia dejar un poco de sobrenadante

Resuspender el botón celular y agregar solución de carnoy (fresco y frío) a un volumen de 1 ml

Tomar un portaobjeto y quitar el excedente de líquido, gotear de 3 a 4 gotas del cultivo en suspensión.

Dejar las laminillas

Rotular con el lápiz diamante el número de la muestra y el tubo de cultivo del cual se obtuvo el estendido celular

Observar al microscopio

Evaluar la calidad y la cantidad de mas metafases

Anotar en la bitácora de goteo si hubo crecimiento, si es escaso o no lo hay

De la revisión del cultivo, se obtiene el número de laminillas por un tubo y el total por cultivo para realizar el siguiente procedimiento

Madurar las laminillas a 60°C por un día.

BANDAS G.T.G.

Material

- Solución buffer de fosfatos pH 7.4
- Solución buffer de fosfatos pH 6.8
- Tripsina (solución trabajo)
- Colorante Wrigth
- Colorante Giemsa
- Cubreobjetos
- Gasas
- Guantes
- Vasos copplin
- Vaso de precipitados
- Pipeta graduada
- Probeta graduada
- Pipeta de transferencia
- Pipeta Pasteur
- Entellán

Equipo

- Cronómetro
- Microscopio
- Pinzas punta roma

Método

Preparar en tren: 4 vasos copplin y 1 vaso de precipitados cada una de las siguientes soluciones:

49 ml de la solución buffer pH 7.4 y 1 ml de tripsina

Solución buffer pH 7.4

48 ml solución buffer pH6.8 y 2 ml de colorante Wright

48 ml de solución buffer pH6.8 y 2 ml de colorante Giemsa

Vaso de precipitados con agua corriente

Sumergir de 10-30 segundos una laminilla en el primer copplin (digestión)

Sacar la laminilla al termino del tiempo y enjuagarla en el segundo copplin (para actividad)

Sumergir la laminilla en el siguiente copplin 2 minutos (tinción con Wright)

Sumergir la laminilla en el siguiente copplin 2 minutos (tinción con Giemsa)

Sumergir y enjuagar la laminilla en el vaso de precipitados

Secar

Montar inmediatamente con 3 gotas de entellán y cubreobjetos

Revisar la calidad de las bandas

Dejar secar a temperatura ambiente.

ANEXO 2: Técnica de Hibridación In Situ con Fluorescencia (FISH)

Técnicas de siembra y cosecha del material a hibridar

La técnica utilizada en el laboratorio para la obtención del material biológico es la misma ya sea para técnica de citogenética clásica y molecular. (Ver el manual para el estudio de cariotipo, procedimientos 1, 2 y 3).

Elaboración de laminillas

Se realiza un concentrado de la muestra obtenida en fijador Camoy a base de ácido acético y metanol 1:3, hasta que se encuentre libre de detritos para evitar ruido de fondo, esto depende de cada muestra en particular y se formará el criterio de cuando la muestra ya no requiere de lavados con el fijador y cual sea la densidad celular requerida para un buen diagnóstico.

Se deja caer una gota en el portaobjetos previamente desengrasado en alcohol de 70% y con un paño limpio que no suelte se seca, se marca la laminilla con el número correspondiente al caso en cuestión y con un lápiz diamante se delimita la zona que se va a hibridar calculando que se usará un área de 18 por 18 mm. Se dejan secar y se observa al microscopio en contraste de fases.

El criterio por seguir es un material limpio cuyas células no se encuentren encimadas, pues esto va a dar una errónea observación de la marca asimismo cuidando que no existan detritos que también interfieren a la observación.

Co-hibridación

Posteriormente se colocan 5 gl de la sonda en un cubreobjeto de 18X18 mm y se hace coincidir la zona marcada con la sonda, en este paso debe uno de ser muy cuidadoso de ponerlo encima del material a hibridar. Más adelante se notifica la forma de hacer la mezcla de la sonda tomando en cuenta que marca de sonda tiene su fórmula diferente.

Se sella con un pegamento llamado Iris cuyas características son adecuadas para que no se deseque el material y sea fácil de retirarlo, poniendo cuidado de que toda la orilla del cubre objeto quede perfectamente sellada.

Se coloca en el Hybrite el cual cuenta con programas adecuados en cuanto a temperaturas y tiempos de hibridación Los tiempos con los que se trabaja de $750\text{C} \pm 1$ por 5 minutos e inmediatamente se ajusta la temperatura de 370C . El tiempo de hibridación de 48 horas.

Lavados post-hibridación

Se saca la lámina de la cámara de hibridación y se retira el pegamento con mucha precaución, teniendo en cuenta que el cubreobjetos no debe de moverse, este es muy delicado, porque el material puede maltratarse con el simple movimiento del cubreobjetos, posteriormente se sumerge la lámina en un vaso de couplin con 2XSSC a temperatura ambiente. Esto es con el fin de que solo el cubreobjetos.

Inmediatamente se sumerge la lámina en un couplin que contiene un detergente llamado NP40, con el fin de evitar uniones inespecíficas de la marca.

Esta solución debe de encontrarse a $700\text{C} \pm 1$ y su concentración es 0.4XSSC/0.3% NP40 (también se puede utilizar el TWEEN en la misma proporción) durante 5 minutos, agitando de vez en cuando para aumentar el efecto por la misma acción mecánica.

Posteriormente se saca y se sumerge en otro vaso de couplin conteniendo el mismo detergente ya sea NP40 (Nonidet) o TWEEN, pero ahora una concentración de 2XSSC/0.1%, también durante 5 minutos.

El paso siguiente consiste en sumergir la lámina en agua destilada y agitar un poco, para quitar el residuo del detergente.

Se saca del agua y se coloca vertical para que drene y se seque.

Contra tinción

Este paso tiene por objeto teñir el ADN de un color azul con excepción de las secuencias que se encuentran con la sonda y proporcionar un mayor contraste para dar una mejor lectura de la marca. Se realiza con DAPI II y ANTIFADE en una proporción de 1:1.

Se colocan sobre el cubreobjetos 5 μ l de esta mezcla y se procede a empalmar con el área del material hibridado. Se deja un tiempo mínimo de 10 minutos para que la contra tinción penetre y la observación pueda realizarse de una manera adecuada.

Observación al microscopio

Para esta técnica es necesario contar con un microscopio de esto es una fuente de luz ultravioleta que incida por arriba del objeto para que el fluorocromo de la sonda sea excitado por dicho rayo y pueda observarse.

El documento correspondiente a esta interpretación se encuentra en el Sistema Internacional de 2005. Se debe de la bibliografía, se encuentran los criterios a los nos normamos para diagnosticar, y reportar los hallazgos.

PREPARACION DE REACTIVOS

A. Preparación de la sonda

Mezclar con Vórtex y luego centrifugar la sonda sola, con el fin de colectarla en el fondo del tubo. En un tubo tipo ependorff mezclar la sonda con su buffer.

Nótese que cada sonda tiene un número de catálogo según la marca que se maneje y el tipo de sonda que sea. Vysis presenta los buffer para cada sonda tanto LSI, CEP, WCP, TEL, contienen sulfato dextran, formamida y SSC (PH 7).

Para lámina:

0.5 μ l de sonda

1 μ l de agua filtrada

3 μ l de buffer de hibridación

Posteriormente mezclar de nuevo, pero ahora la mezcla en el Vórtex y centrifugar un pulso en la micro centrifuga alcanzando hasta 4000 rpm.

B. 20 XSSC, marca Vysis N° 32-804850 (500)

Aforar a 500 ml con agua pura, guardar a temperatura ambiente.

20 X SSC

Agitar con mosca magnética a lograr homogenización

Aforar a 1000 ml con agua pura, ajustar pH a 7.0 ± 0.2

Almacenar a temperatura ambiente.

C. Solución de Invado 0.4 X SSC/0.3% NP40

20 XSSC

NP40

20 ml

3 ml

Agitar con mosca magnética a lograr homogenización

Aforar a 1000 ml con agua pura, ajustar pH a 7.0 a 7.5

Almacenar a temperatura ambiente.

D. DAPI II

Utilizamos de la marca Vysis N° 32- 804831

2 X 500 μ l 8125 ng/ml

Antifade.

Utilizamos de la marca Vysis N° 32-804029

240 μ l x 2

Consta de 1,4, fenildiamina y glicerol en solución acuosa buffer.

Técnica de hibridación “in situ” con fluorescencia (FISH, por sus siglas en inglés)

La hibridación “in situ” con fluorescencia o FISH consiste en el marcaje de genes, cromosomas o partes de ellos con fluorocromos que se evidencian con un microscopio de luz ultravioleta (epifluorescencia) utilizando filtros adecuados.

Esta técnica se basa en abrir las cadenas de la doble hélice del DNA en estudio, utilizando formamida y así mismo hacerlo con la sonda marcada, la cual se coloca a temperatura de 75° para este efecto, ambas sonda y blanco se unen por complementariedad de bases.

Actualmente se cohibrida, es decir, se abren las cadenas de DNA de ambos al mismo tiempo, sonda y blanco (figura 25).

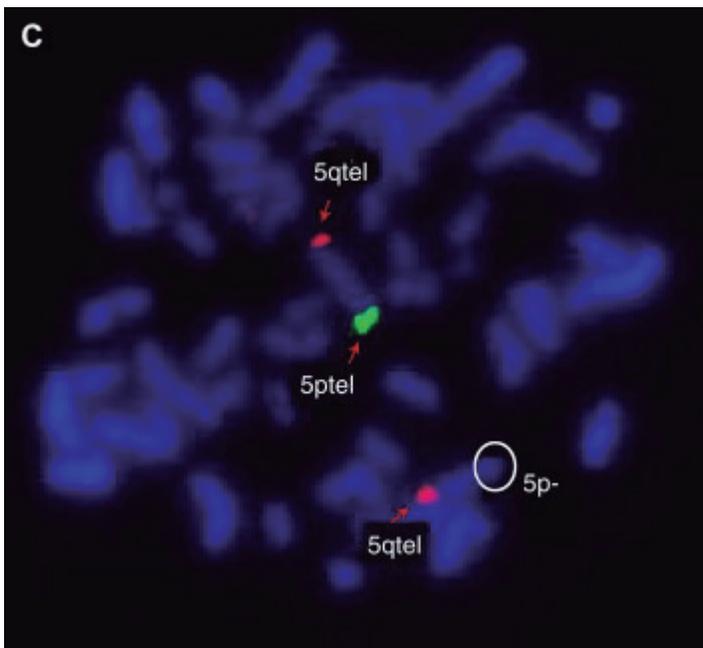


Figura 25. Células en división positivas para una deleción de 5p.

Hibridación por fluorescencia in situ significa utiliza sondas marcadas por fluorescencia para hibridar preparaciones citogenéticas de células.

Existen diferentes tipos de sondas:

LSI: Locus específicas, son secuencias de DNA homólogas a regiones específicas de genes, marcadas con fluorocromo, incluidas en la sonda hay secuencias bloqueadoras para suprimir secuencias contenidas en el loci y que son comunes a otros cromosomas. Se pueden utilizar en interfase.

CEP: Son sondas que marcan DNA satélite altamente repetitivo de los centrómeros, son utilizadas para la identificación y enumeración de los cromosomas, con una brillantez tanto en metafases como en núcleos interfásicos, dependiendo del estadio del ciclo celular, de la condensación del DNA y la relativa distancia entre las cromátidas, algunas veces pueden aparecer difusas o partidas o rotas llamadas Split, la marca puede variar en tamaño debido al polimorfismo de estas regiones entre individuos.

Son utilizadas para estudiar cuerpos polares, blastómeros, muestras prenatales, tumores y procesos malignos hematológicos.

WCP: Estas sondas van a marcar el cromosoma entero y aplicables para detectar translocaciones, análisis de rearrreglos cromosómicos múltiples, rearrreglos mutágenos, radiaciones, cromosomas marcadores, etc.

TEL: Sondas que marcan las regiones teloméricas de los cromosomas.

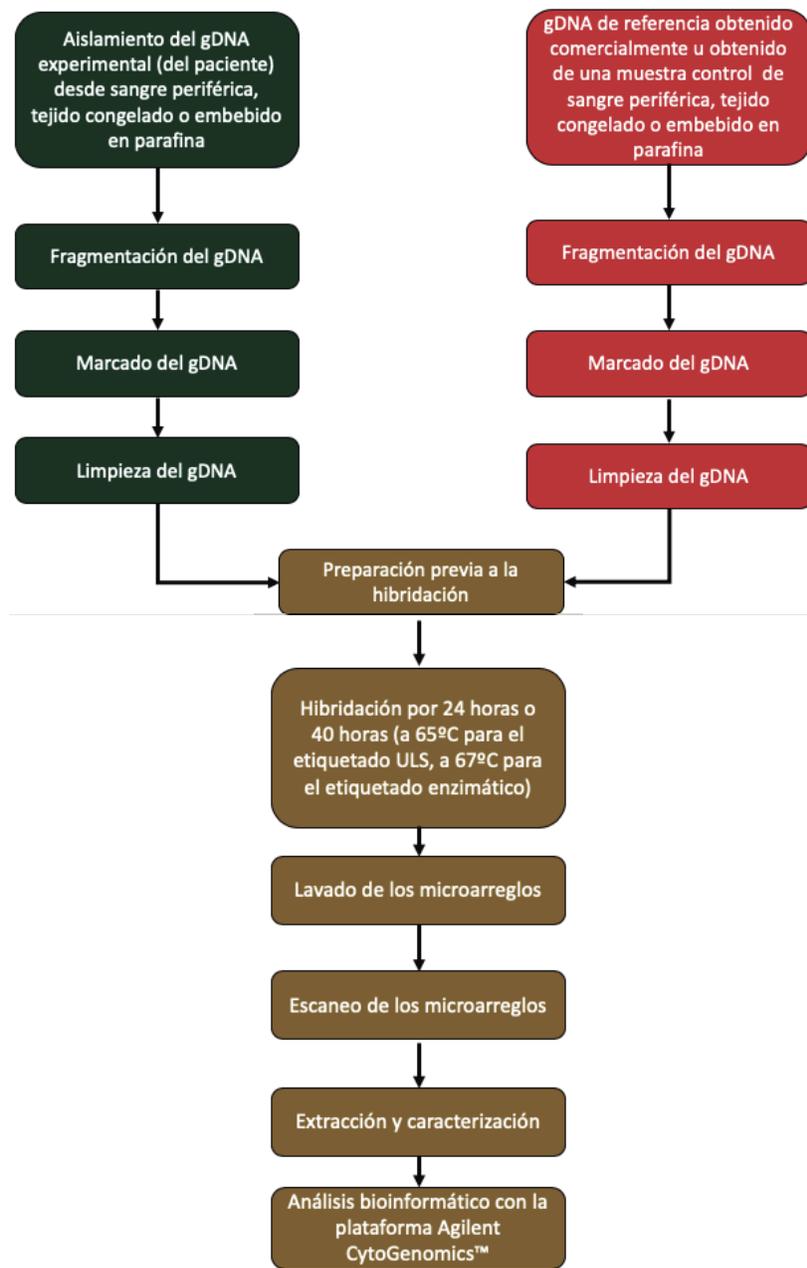
Es recomendable trabajar con las sondas en un lugar de poca luz para que el fluorocromo no pierda su brillantez, y las sondas se guardan a bajas temperaturas de 4 a 6 °C las de uso y almacenadas a -20 °C.

Se utiliza formamida a temperatura de 75 °C o bien puede realizarse la cohibridación por medio de un Hybrite.

En nuestro laboratorio, llevamos a cabo la cohibridación en una plancha de metal cuya temperatura es controlada a través de un termómetro.

ANEXO 3: Técnica de Hibridación Genómica Comparativa en plataforma de Microarreglos (array-Comparative Genomic Hybridization – aCGH)

En el siguiente esquema se resume el flujo de trabajo para la realización de un estudio de Hibridación Genómica Comparativa por microarreglos de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis Protocol 2.3, August 2015).



Nota: La realización del estudio de aCGH requiere de un laboratorio de biología molecular debidamente equipado junto con las herramientas bioinformáticas indicadas para el análisis de las muestras y personal técnico capacitado.

La técnica se presenta en sus generalidades ya que en nuestra Institución no se realiza dicho estudio y no existe un protocolo para su realización como para las técnicas previamente presentadas.

ANEXO 4. Consentimiento informado para toma de fotografías clínicas



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



Hospital Infantil de México Federico Gómez
Instituto Nacional de Salud
Departamento de Genética

CONSENTIMIENTO DE TOMA DE FOTOGRAFÍAS CLÍNICAS

A QUIEN CORRESPONDA:

Por medio de la presente deseo manifestar que estoy de acuerdo con la invitación que me han hecho llegar los doctores del Departamento de Genética del Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG), para que sean publicadas y /o presentadas en congresos científicos nacionales e internacionales las características clínicas de mi caso y /o el de mi hijo, en forma escrita o gráfica (fotografías).

Se me ha explicado que la finalidad de publicar o presentar esta información es para compartir el conocimiento con la comunidad médica y científica y para ayudar a tener un mejor conocimiento y entendimiento de mi enfermedad y/o la de mi familiar. Se me ha explicado que se omitirán todos los datos personales que permitan la identificación del paciente.

Por lo anterior, establezco aquí que he tomado esta decisión libremente, que se me ha explicado que no es obligatorio el participar y que no percibiré por ello ningún beneficio en especie o económico de ninguna naturaleza. De la misma manera, se me ha explicado que de negarme a participar, ello ni influirá en el tratamiento y prestaciones que recibo por parte del HIMFG, obedeciendo a los derechos que como paciente tengo, respecto a mi toma de decisiones y a mi dignidad.

Para cualquier duda contactar al Dr. Rodrigo Moreno Salgado en el Departamento de Genética del Hospital Infantil de México Federico Gómez, tel 52289917, ext 2037.
Firmo este consentimiento de conformidad y recibo copia de este.

Nombre del paciente: _____

Firma del paciente*: _____

Registro: _____ Fecha de nacimiento: _____

Nombre y firma del padre o tutor: _____

Nombre y firma testigo 1: _____

Nombre y firma testigo 2: _____

Nombre y firma de quien obtiene este consentimiento: _____

Lugar y fecha: _____

*Para pacientes mayores de 12 años aptos para firmar, además de su padre o tutor.

ANEXO 5: Consentimiento para toma de muestra de sangre periférica para estudio de cariotipo con bandas GTG

 Hospital General de México Frente al Estadio México, D.F.	FORMATO DE CONSENTIMIENTO BAJO INFORMACION HIM-LC-PR.01-RE.01
--	--

CUBICULO No. FECHA / /

REMITIR: DEL PACIENTE _____ Sexo M F Otro _____ AÑOS _____

PROCEDIMIENTO PROPUESTO Y EXPLICACION DEL MISMO:

Toma de muestra SANGUINEA ORINA MATERIA FECAL OTRO (explique) _____

Beneficios: DIAGNOSTICO OPORTUNO DE PADECIMIENTO Y/O SEGUIMIENTO AL TRATAMIENTO

Riesgos y complicaciones: MINIMOS, SI SE PRESENTA ALGUNA CONTAMOS CON PERSONAL CAPACITADO EN ATENDER LA URGENCIA. EL MATERIAL ES NUEVO, ESTERIL Y DESECHABLE.

Yo _____ de _____ años de edad. Reconozco que se me explico y entendi el procedimiento para realizar los exámenes, estoy enterado de los beneficios, sé de los riesgos y las probables complicaciones que se me pueden presentar. Consiento de que se busca un beneficio, doy mi consentimiento sin obligación y por decisión propia para que los exámenes se efectúen, así mismo para realizar la atención de contingencias y urgencias derivadas del acto autorizado, con base al principio de libertad prescripta.

SIRMA DEL PACIENTE O SU REPRESENTANTE LEGAL _____

TESTIGO FAMILIAR (Nombre y Firma) _____

TESTIGO SUPERVISOR (Nombre y Firma) _____

NOMBRE Y FIRMA DEL FLEBOTOMISTA _____

Este consentimiento deberá llenarse para todo procedimiento de Toma de Muestras en el Laboratorio a realizarse en todo paciente sin excepción alguna. El responsable de recabarlo es quien vaya a realizar el mismo. Esta carta es renovable mientras no se concluya el procedimiento y no obligará al Químico, Técnico o Médico a realizar u omitir un procedimiento cuando ello entrañe un riesgo hacia el paciente. La muestra podrá ser utilizada para fines de investigación.

REFERENCIA: LEY GENERAL DE SALUD cap. IV, Art. 80, 81, 82, y 83. NOM-168-SSA1-1996