



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DETECCION DE ANEUPLOIDIA DEL CROMOSOMA 21 EN CELULAS DE MUCOSA BUCAL DE PADRES DE NIÑOS CON TRISOMIA 21, POR MEDIO DE HIBRIDACION IN SITU CON FLUORESCENCIA

T E S I S

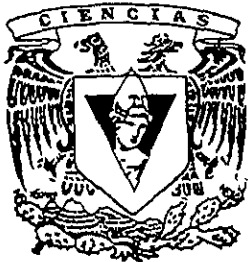
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: B I O L O G O P R E S E N

PALOMA DEL CARMEN NERI VIDAURI



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

DIRECTOR: DRA. SARA FRIAS VAZQUEZ



MEXICO, D.F.

207244 2000



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.

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE
CITOGENÉTICA DEL DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN
GENÉTICA HUMANA DEL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA,
S.A. BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. SARA FRIAS VAZQUEZ.

**DETECCIÓN DE ANEUPLOIDÍA DEL CROMOSOMA 21 EN
CÉLULAS DE MUCOSA BUCAL DE PADRES DE NIÑOS CON
TRISOMÍA 21, POR MEDIO DE HIBRIDACIÓN *IN SITU* CON
FLUORESCENCIA.**

A MIS PADRES.

Con mi eterno cariño y respeto
Porque todo lo que tengo y soy ahora
se lo debo a ellos.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco especialmente a la Dra. Sara Frias Vazquez por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo y brindarme todo su apoyo, asesoría, enorme comprensión y tolerancia para la realización de este trabajo.

De igual manera a mis sinodales Bertha, Lupita, Sandy y Angy, por su amistad, enseñanzas y por todos los comentarios para la realización de este trabajo.

Mis padres: Fede y Lupita, por que con su amor, educación, apoyo y entusiasmo me impulsaron a llegar al final de mi carrera. Gracias por ser la base y razón de mi crecimiento académico y personal, por enseñarme que el conocimiento es la mejor y más noble arma de la vida.

Mi hermana Caro por que sin ella mi vida sería muy aburrida.

Mis amigas del Laboratorio de Citogenética Humana y Cultivo de Tejidos: Silvia, Chelo, Paty, Laura, Luz, Marisa y Lorenza por su amistad, cariño y apoyo que me brindaron en el momento preciso.

Mis amigas de la Facultad de Ciencias: Moni, Paula, Mónica, Leonor, Catalina y Areli por hacer de mis estudios en la universidad una parte inolvidable de mi vida.

El Dr. Di Castro por enseñarme que la vida a veces no es fácil, que hay que estar preparado y tener las armas y bases suficientes para enfrentar momentos difíciles con decisiones firmes y razones claras. Gracias Dr. Por darme la oportunidad de crecer y desarrollarme profesional y personalmente.

Dra. Calderón por mostrarme el valor que tiene un nuevo ser en la vida de dos personas. Por la enorme confianza depositada en mi y por promover y apoyar mi formación académica.

A TODOS USTEDES: GRACIAS.

CONTENIDO

	Página
Resumen.....	1
1. Introducción.....	2
2. Justificación.....	20
3. Objetivo.....	20
4. Hipótesis.....	20
5. Población de estudio.....	21
6. Diagrama del diseño experimental.....	22
7. Metodología.....	23
8. Consideraciones éticas y carta de consentimiento informado.....	26
9. Resultados.....	28
10. Discusión.....	36
11. Apéndice 1.....	44
12. Apéndice 2.....	46
13. Apéndice 3.....	48
14. Referencias bibliográficas.....	50

DETECCIÓN DE ANEUPLOIDÍA DEL CROMOSOMA 21 EN CÉLULAS DE MUCOSA BUCAL DE PADRES DE NIÑOS CON TRISOMÍA 21, POR MEDIO DE HIBRIDACIÓN *IN SITU* CON FLUORESCENCIA.

El síndrome de Down (SD) es la anomalía cromosómica más común en la especie humana. Dado que es una entidad no letal al nacimiento y la única trisomía autosómica viable, es importante detectar a las parejas con riesgo de recurrencia mayor al 1.5% que la población general. Por otra parte es importante realizar el estudio citogenético en más de un tejido, ya que cuando se realiza sólo en uno —generalmente sangre periférica— la presencia de un mosaicismo puede pasar desapercibido. Por tal motivo el objetivo del presente trabajo fue detectar mosaicos de trisomía del cromosoma 21 en parejas menores de 35 años con uno o más hijos con trisomía 21 por no disyunción, en células de mucosa bucal. Se analizaron 12 parejas normales; 2 de ellas con hijos normales, 9 con un hijo con SD y una con más de un hijo con SD. En cada una se realizó árbol genealógico y diagnóstico citogenético en sangre periférica (SP). Para detectar la presencia de células con trisomía 21 se tomaron muestras de la mucosa oral en todos los individuos. Las células exfoliadas se fijaron y las laminillas fueron preparadas por goteo. Se usaron enzimas de digestión con el fin de optimizar el alcance de la sonda al DNA blanco, se utilizó la sonda de secuencia única para la región 21q22.2 del cromosoma 21. Se analizaron 1000 núcleos de mucosa bucal por persona. De acuerdo a los resultados obtenidos en las parejas normales y siguiendo la metodología de Anastasi (1990), se determinó que todos aquellos individuos que en el análisis celular tuvieran un valor superior a 0.625% de células con trisomía 21, se considerarían mosaico. De 24 individuos, 4 fueron mosaicos, los cuales pertenecen al grupo de padres con un hijo con SD y su resultado en SP fue normal. Cabe señalar que este es uno de los primeros trabajos en promover la utilización del tejido epitelial de la mucosa oral en estudios citogenéticos para la detección de alteraciones cromosómicas en padres fenotípicamente normales menores de 35 años con hijos con SD.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

El Síndrome de Down (SD) es una de las alteraciones cromosómicas más frecuentes (1/700) en recién nacidos vivos en el mundo, se encuentra en todas las razas humanas y niveles socioeconómicos, y no se ha podido encontrar relación alguna con dietas, enfermedades, áreas geográficas, etc; es la menos severa de las trisomías autosómicas y la más conocida, pues es la principal causa del retraso mental y enfermedades cardíacas congénitas en los infantes (Gadner y Mckinlay, 1996)

A principios del siglo XIX Esquiloren en 1838, Seguín en 1846 y Duncan en 1866, realizaron las primeras descripciones de niños con ciertas características y rasgos fenotípicos muy peculiares sugerentes a SD (Lott y Mc Coy, 1992). Pero fue hasta 1866 cuando John Langdon Down (1820-1890), médico y físico, publicó en el London Hospital Reports, la primera descripción de un grupo de pacientes con características físicas y faciales muy parecidas al grupo étnico de Mongolia (por lo que lo nombró síndrome del mongolismo); pero con un comportamiento social muy particular, coordinación corporal anormal y dificultades en el lenguaje.

Down consideró, en un principio, que ciertas enfermedades en los padres podrían originar éste síndrome y hasta en alguno de sus escritos comentó que la tuberculosis durante el embarazo podía romper la barrera de las razas y ocasionar que padres europeos tuvieran hijos orientales. A éste informe inicial le siguieron otros en los cuales hacían alusión a nuevos signos presentes en el síndrome, hasta llegar a la idea de considerarlo como una regresión al hombre primitivo (Ortega, 1997).

La causa del SD se mantuvo como un misterio durante casi 100 años; pero a principios del siglo XX surgió una especulación acerca de su origen y los primeros investigadores en suponer que posiblemente se debía a una anomalía cromosómica fueron Waanderberg y Bleyer entre 1930 y 1932.

En 1959, cuando las técnicas para detallar el análisis de los cromosomas humanos fueron más precisas, el SD fue el primer síndrome en ser estudiado cromosómicamente por los investigadores franceses Jerome Lejune y Patricia Jacobs, quienes determinaron que la causa del síndrome era una trisomía del cromosoma acrocéntrico 21. Este suceso fue históricamente importante ya que la verificación de la naturaleza cromosómica del síndrome marcó el inicio de la citogenética médica, pues en los siguientes 3 años se descubrieron casos de SD debidos a translocaciones y mosaicismos (Frias, *et al*, 1996).

En 1974, Nierburg propuso que ciertas regiones del cromosoma 21 contribuyen con aspectos muy particulares al fenotipo en el SD y que por lo tanto podrían originarse como resultado de una duplicación de genes en la región comprendida entre 21q22.13 y 21q22.2 (Hsu, 1986).

Las características fenotípicas y mentales del síndrome surgen por un desequilibrio en el material genético que altera el programa normal de desarrollo y crecimiento; en general los pacientes presentan las siguientes características (figura 1):



FOTO 1. Pacientes con Síndrome de Down, referidos de la consulta del Instituto Nacional de Pediatría.

1.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS FRECUENTES.

- ◆ Hipotonía muscular.
- ◆ Retraso mental, el coeficiente intelectual suele estar dentro del margen de 25-50. Pero el grado de retraso mental varía ampliamente, de leve a moderado y a grave.
- ◆ Perfil facial plano.
- ◆ Fisuras palpebrales oblicuas.
- ◆ Puente nasal deprimido.
- ◆ Lengua protruyente con ausencia de la fisura central.
- ◆ Manos con braquidactilia, pliegue simiano y clinodactilia del 5º dedo.
- ◆ Del 30 al 50% presentan cardiopatía congénita del tipo comunicación interventricular.
- ◆ La pubertad es normal en ambos sexos, pero los varones no son fértiles debido a una alteración en la maduración espermática.

1.3 CARACTERÍSTICAS RARAS:

- ◆ Pabellones auriculares displásicos y micro-retrognatia.
- ◆ Hiperlaxitud e hipotonía.
- ◆ Diástasis entre el 1º y 2º orjejo bilateral en pies, con un surco que se extiende hacia abajo y a lo largo de la superficie plantar.
- ◆ Estenosis duodenal, páncreas anular, atresia anal y megacolon.
- ◆ Pelvis displásica
- ◆ Epilepsia e hipotiroidismo.
- ◆ Ectasia piélica bilateral, braquicefalia y hernia umbilical.

1.4 DIAGNÓSTICO

Aunque se puede diagnosticar clínicamente a la mayoría de las personas con SD, es obligado el análisis cromosómico para determinar la característica citogenética del individuo. El cariotipo no solo sirve para confirmar una expresión clínica, sino que identifica el tipo de alteración cromosómica: trisomía 21 regular, translocación, mosaicismo, isocromosoma o duplicación (Pueshchel y Pueshchel, 1994). El tipo de alteración citogenética es muy importante porque determina el riesgo de cada pareja de tener otro producto con SD.

1.5 VARIEDADES DE TRISOMÍA 21 Y MECANISMOS DE FORMACIÓN.

El SD puede originarse por las siguientes variedades citogenéticas (figura 2).

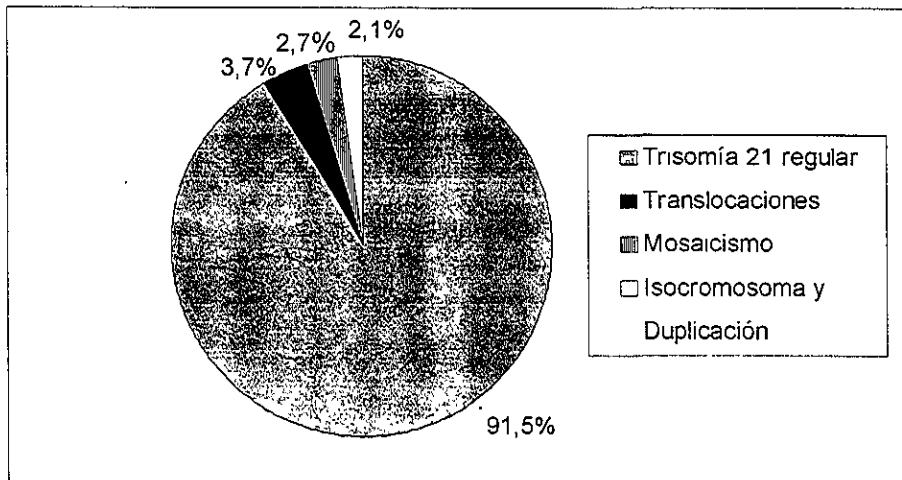


Figura 2. Porcentaje de las 5 variedades citogenéticas causantes del SD en la población (Gardner y Mckinlay, 1996)

1 5 1 TRISOMÍA 21 REGULAR

Esta variedad citogenética se caracteriza porque en los pacientes hay un cromosoma 21 extra en todas de las células del cuerpo, el 91.5% de los casos reportados de SD caen dentro de esta variedad y del 90 al 95% de éstos se originan por un error en la meiosis materna (Salamanca, 1990); de esos, el 75% son errores que ocurren en meiosis I y 25% en meiosis II. Sólo entre el 5 y 10% se deben a errores en la no disyunción paterna; de los cuales el 25% son de meiosis I y 75% meiosis II (Antonarakis, 1992).

1.5.2 TRANSLOCACIÓN

a) Translocación Robertsoniana.

Ésta variedad citogenética se forma por la translocación de un cromosoma 21 con otros cromosomas acrocéntricos, ya sea del grupo D o G y se presenta en el 3.7% de los casos reportados con SD. La translocación más frecuente es t(Dq;21q) con una frecuencia de 54.2%, la cual comprende las translocaciones: t(13q;21q) (22%), t(14q;21q) (58.5%) y t(15q;21q) (19.5%). El 55% de estas translocaciones se originan como eventos *de novo* y en 45% son heredadas por un padre portador. Le sigue la translocación t(21q;Gq) con una frecuencia de 40.9% y dentro de ésta tenemos: la t(21q;21q) que representa el 83.3% y la t(21q;22q) con 16.7%, el 96% de éstas translocaciones ocurren como eventos *de novo* y sólo en 4% son heredados (Giraud y Mattei, 1975)

b) Translocación Recíproca.

Este tipo de reordenamiento representa 4.9% dentro de las translocaciones y se origina por una ruptura en los cromosomas involucrados no homólogos, con intercambio recíproco de los fragmentos rotos. Puede originarse como un evento esporádico (translocación *de novo* 75%) en meiosis I o ser transmitida por un padre portador de la translocación (translocación familiar 25%).

Cuando en un sujeto portador de una translocación se lleva a cabo la meiosis y los cromosomas se aparean, por medio de sus regiones homólogas, en forma de una figura de 4 radios. La segregación alterna, -el tipo usual de segregación 2:2-, genera 2 gametos: uno con complemento cromosómico normal y el otro con los cromosomas translocados balanceados. Las segregaciones adyacentes 1 y 2 generan gametos desbalanceados (figura 3) (Thompson y Thompson, 1996)

Existen otras complicaciones meióticas, en particular riesgo de no disyunción, que causan segregaciones 3:1 (Gadner y Mckinlay, 1996.; Therman, 1992.; Petersen, *et al*, 1991).

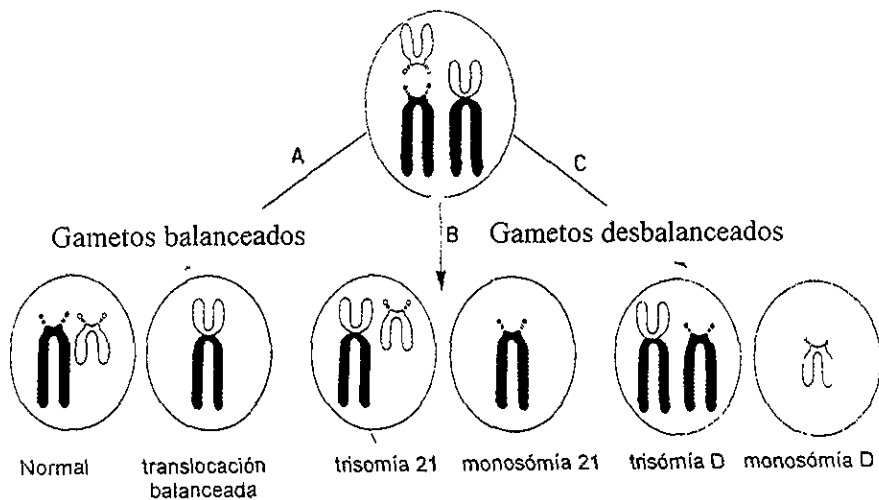


Figura 3. Posibles genotipos de la descendencia si el gameto de un portador de una translocación robertsoniana t(Dq;21q) forma un cigoto con un gameto normal. A) complemento normal y translocación balanceada. B) un gameto desbalanceado con translocación y cromosoma 21 normal; el otro gameto solo con un cromosoma D. C) gameto desbalanceado con translocación y un cromosoma D normal; el otro gameto con un cromosoma 21. (Fotografía tomada de Thompson y Thompson, 1996).

1 5.3 ISOCROMOSOMA

El isocromosoma i(21q21q) es un cromosoma en el que falta el brazo corto y el largo esta duplicado, es decir, un individuo con un i(21q) tiene una sola copia del material genético del brazo corto y 3 copias del material del brazo largo. Este evento se origina en la mitosis postcigótica temprana por la división errónea del centrómero y presenta un riesgo de recurrencia muy bajo o hasta nulo, su frecuencia en la población es de 2% para los casos reportados de SD (Dagna, *et al.*, 1990.; Gardner y Mckinlay, 1996.; Antonarakis, *et al.* 1990)

1.5.4 DUPLICACIÓN DE LA REGIÓN 21q22.2.

La presencia de una duplicación en el material genético de ciertas regiones en los cromosomas, puede ser originada por un entrecruzamiento desigual o por una segregación anormal durante la meiosis en un portador de una translocación o una inversión. Una duplicación en un gameto genera un desequilibrio cromosómico que puede alterar la expresión de ciertos genes de una región crítica en un cromosoma dando un fenotipo anormal. Al respecto, tras años de investigación, se encontró que las principales características fenotípicas y fisiológicas del SD están confinadas en la región 21q22 (figura 4) y no al cromosoma completo.

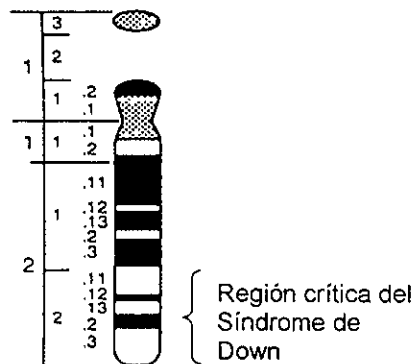


Figura 4. Representación esquemática de la región crítica del SD 21q22.2 en el cromosoma 21, de acuerdo a Delabar (1993).

Casos en los cuales solo una parte del cromosoma 21 esta triplicada han sido intensamente estudiados ya que muy pocos pacientes (0.1%) presentan la región crítica triplicada. Estos estudios permiten realizar mapas fenotípicos con los que se puede correlacionar las características fenotípicas particulares del síndrome con regiones específicas o loci del cromosoma. De acuerdo a Delabar, *et al* (1993) esta región se encuentra específicamente entre 21q22.2 y 21q22.3, contiene por lo menos de 50 a 100 genes (algunos ya han sido identificados) y que suponen la causa de los signos más significativos del SD (O'brien, 1993). Algunos de estos genes y sus efectos clínicos se presentan en la siguiente tabla.

Gen identificado	Efecto clínico
Superóxido dismutasa	Defectos en el corazón
Oncogen c-ETS-2	Anormalidades esqueléticas y/o leucemias
Factor ensamblador de cromatina I	Afecta el metabolismo y reparación del DNA
Cistationina β -sintetasa	Retraso en la síntesis de DNA
Proteína 1 de AML	Leucemia mieloide aguda t(8;21)
α -polipeptido 1	Cataratas en los ojos
Biosíntesis de purinas	Afecta la síntesis de DNA y los mecanismos de reparación
Receptor interferon α	Interfiere con el sistema inmune

Tabla 1. (Tomado de Scriver, 1995 y Antonarakis, 1998))

1.5.5 MOSAICISMO CELULAR

Otra variedad citogenética causante del SD es el mosaicismo celular, se ha reportado en un 2.7% de los casos totales del SD y se caracteriza por la presencia simultánea de dos líneas celulares en un mismo individuo: una línea cromosómica normal y una trisómica, ambas derivadas de un solo cigoto. Las características físicas en los pacientes pueden variar de acuerdo a la proporción de éstas líneas pues se pueden encontrar en proporciones sumamente variables (Dagna, *et al*, 1990 y Jones, 1988).

Clark en 1961 descubrió el primer caso de mosaicismo de trisomía 21/normal en un paciente que presentaba algunas características fenotípicas del síndrome e inteligencia normal.

En 1969, Richards indicó que el mosaico celular frecuentemente involucraba una línea normal, sin embargo, existen evidencias donde se presentan mosaicos más complejos, que incluyen trisomías y tetrasomías para los cromosomas del grupo G y mosaicos estructurales (frecuentemente translocaciones G/G) con líneas normales (Wilson, *et al*. 1980). Es muy probable que esta anomalía cromosómica pase inadvertida al diagnóstico, ya que hasta el momento no se conoce la frecuencia real de mosaicos menores al 10% pues el número de células que habitualmente se analizan no es suficiente para excluir la presencia de mosaicos crípticos (Armendares, *et al*, 1990).

Los efectos del mosaicismo en el desarrollo varían, dependiendo del momento en el que se produjo el evento de la no disyunción, de la naturaleza de la anomalía cromosómica, de las proporciones de las diferentes líneas cromosómicas presentes y de los tejidos afectados (Thompson y Thompson, 1996).

Una de las causas del mosaicismo es la no disyunción en una mitosis postcigótica temprana, en la célula proveniente de un cigoto normal: una línea celular gana un cromosoma 21 y el embrión continúa su desarrollo como mosaico 47,XX,+21/46,XX, la línea monosómica se pierde (figura 5).

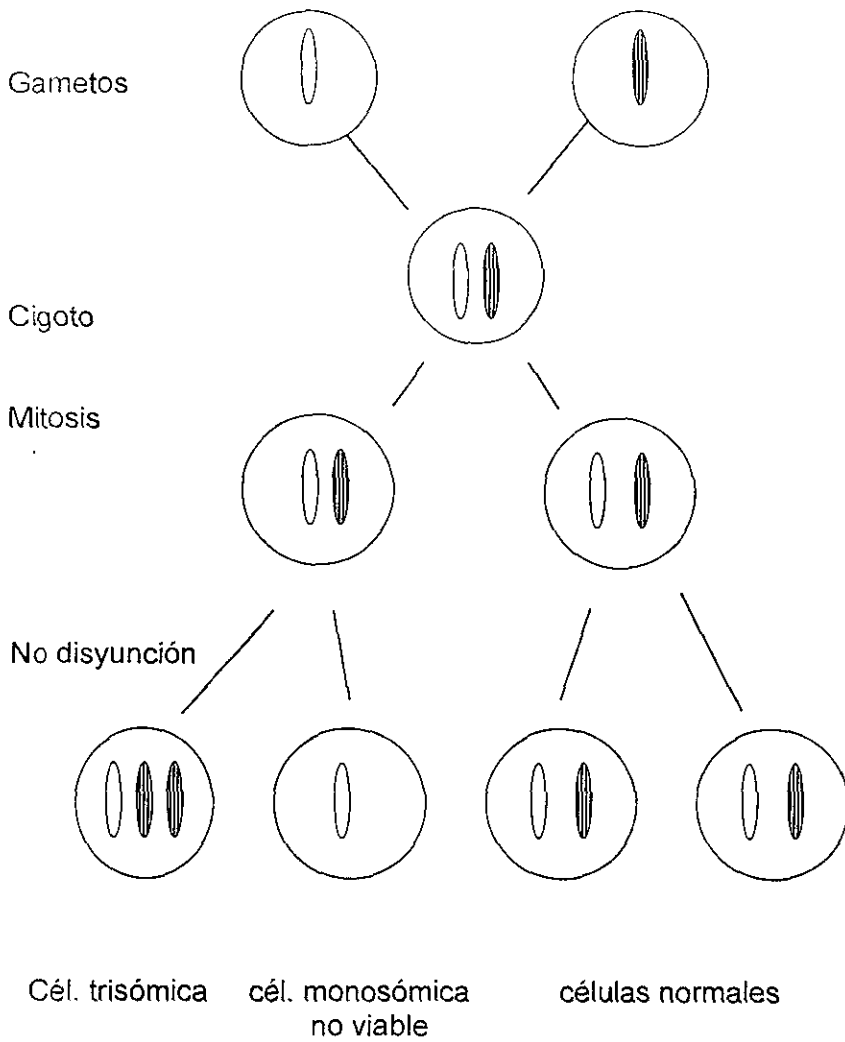


Figura 5. Representación de un evento de no disyunción post-cigótica.

Por otro lado, estudios realizados en base a la edad materna sugieren que una gran proporción de casos con SD en mosaico se deben a una no disyunción mitótica temprana, de un embrión que en su origen fue un cigoto 47,XX+21 y pierde el cromosoma 21 extra en una línea celular, originando 47,XX,+21/46,XX.

Considerando lo anterior, Niikawa y Tadashi (1984) propusieron que algunos casos de mosaicismo provienen de una no disyunción meiótica seguida de una segunda no disyunción mitótica (Armendares, *et al*, 1990). Es decir, dos errores de no disyunción: el primero en la gametogénesis parental y el segundo en la mitosis embriogénica (Harris, *et al*, 1982).

Estudios citogenéticos y moleculares determinaron que no existe relación entre el aumento de la edad materna y el origen parental del cromosoma 21 en los eventos de no disyunción mitótica, de tal manera que el efecto de la edad materna se restringe solo a los casos de no disyunción meiótica, principalmente en MI (Hassold, 1998.; Petersen, *et al*, 1992).

Actualmente se sabe que la presencia de mosaico no es necesariamente privativa de los pacientes con SD, se ha propuesto que alguno de los padres puede ser portador de 2 líneas celulares, una normal en alto porcentaje debido a una proliferación preferencial y otra trisómica en muy bajo porcentaje y por lo tanto con un fenotipo completamente normal por la baja frecuencia de células con trisomía 21 (Thompson y Thompson, 1996). Además, la línea trisómica puede estar confinada solo a ciertos tejidos, dentro de los cuales se puede encontrar el gonadal; de tal manera que para conocer el riesgo de recurrencia en los casos de mosaico parental se debe considerar el grado de mosaicismo somático y gonadal, pues es éste último el que puede estar originando los casos de recurrencia de SD en la descendencia (Gadner y Mckinlay, 1996). Sin embargo es difícil obtener células germinales en donde se pueda descartar un mosaicismo, por lo que normalmente sólo se analizan células somáticas.

En las últimas décadas se han realizado varios estudios para determinar el origen del mosaicismo parental como causa de la trisomía 21 regular *de novo* en parejas normales, sin embargo no se ha establecido cual es el porcentaje de mosaicismo paterno y materno a considerar ya que los estudios han reportado datos muy variados.

Entre los primeros estudios esta el realizado con dermatoglifos por Penrose en 1966, quien determinó que el 11% de los casos de trisomía 21 podían ser provocados por mosaico (10% de origen materno y 1% paterno), Priest en 1973 estudiando patrones dérmicos en padres de niños con SD determinó un 19% (11% para madres y 8% para padres). Posteriormente Harris en 1982 y Pangalos en 1992 trabajando con polimorfismos determinaron que sólo el 1% y 1.6% de los casos de SD se debían a mosaicismo parental respectivamente (Harris, *et al*, 1982). Por este motivo y debido a que no se conoce con exactitud la verdadera frecuencia de este tipo de mosaicos, es importante realizar estudios cromosómicos en los que se analice un número adecuado de células en un tejido y con metodología que permitan detectar el mosaico con mayor precisión y eficiencia.

1.6 MECANISMO DE FORMACIÓN DE LA NO DISYUNCIÓN

Entre las principales aneuploidías, la trisomía del cromosoma 21 es el tipo más frecuente, aunque las causas no se conocen bien, se sabe que el mecanismo cromosómico más frecuente es la no disyunción meiótica (Thompson y Thompson, 1996) (figura 6).

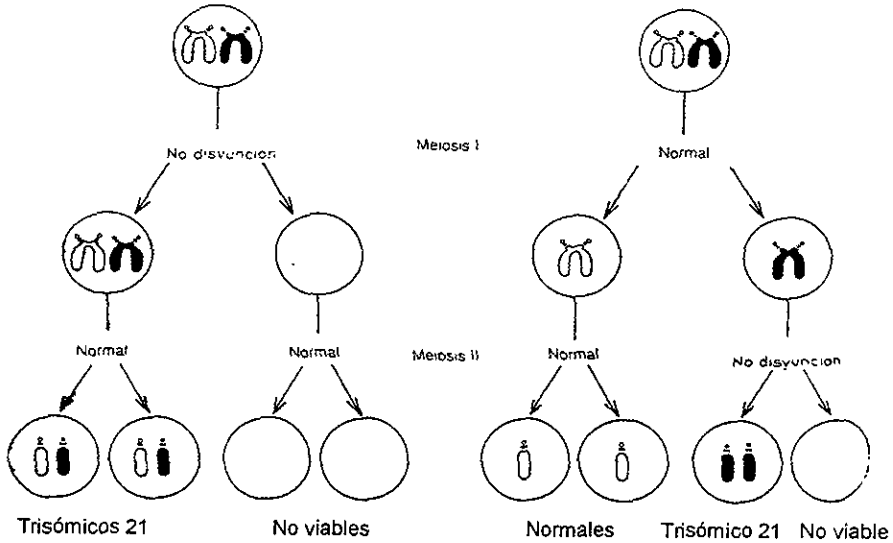


Figura 6. Los diferentes gametos resultantes de la no disyunción en meiosis I (izquierda) y en meiosis II (derecha).

El mecanismo de no disyunción se produce cuando falla la separación normal de un par de cromosomas durante una de las 2 divisiones meióticas, siendo más frecuente la meiosis I. Las consecuencias de la no disyunción durante las meiosis I y II son diferentes; durante la meiosis I, dos de los gametos con 24 cromosomas contienen los miembros paterno y materno del cromosoma 21 y los otros dos no son viables. Durante la meiosis II dos gametos contienen un cromosoma 21, uno contiene un cromosoma 21 extra del mismo origen y el otro no es viable (Thompson y Thompson, 1996).

Estudios recientes han propuesto 3 hipótesis que explican las causas más frecuentes por las cuales se origina un evento de no disyunción en la formación de las trisomías humanas.

- ◆ Por acumulación de eventos, ya sea intrínsecos (autoinmunidad tiroidea, heteromorfismos genéticos etc.) o extrínsecos (radiación ionizante, anticonceptivos orales, drogas, etc.) (Wyrobeck, *et al*, 1996).
- ◆ Por ausencia de apareamiento y/o reducción de la frecuencia de quiasmas y recombinación confinada a la región proximal 21q, sugiriendo que esta ausencia de quiasmas proximales predispone a la no disyunción (Gadner y Mckinlay, 1996) ya que una reducción en la recombinación proximal genética en 21q (cercana al centrómero) en meiosis I incrementa la no disyunción en meiosis II (Hassold, 1998).
- ◆ Por división prematura del centrómero, Sin embargo, Alfi y colaboradores en 1980 sugirieron que este tipo de alteraciones numéricas podrían producirse por la acción de un gen relacionado con la no disyunción en la especie humana.

1.7 RIESGO E INCIDENCIA EN LA POBLACIÓN.

Se ha reportado que el riesgo de tener hijos con SD se incrementa por la presencia de características citogenéticas o antecedentes en los padres, que se comportan como factores predisponentes. Estos factores son:

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

En México la frecuencia del SD es de aproximadamente 1 en 700 recién nacidos vivos encontrándose relación directa con la edad materna, la cual esta estudiada y reconocida desde hace 60 años (Hassold et al., 1989). Se sabe que a mayor edad (más de 35 años) la posibilidad de tener un hijo con SD se incrementa de manera significativa, es decir, el riesgo para madres de 20 años es de 1 en 1540, elevándose posteriormente a 1 en 44.1 a los 45 años de edad o más (tabla 2) (Mckinlay, 1996). En la siguiente tabla se muestra la incidencia del SD en recién nacidos vivos en relación con la edad materna.

Edad materna	Prevalencia en recién nacidos (%)
15	0.64
20	0.65
25	0.74
30	1.12
35	2.81
40	10.4
45	44.1
50	195

Tabla 2. (Tomado de Mckinlay, 1996).

1.8 RECURRENCIA

1.8.1 TRISOMÍA 21 REGULAR

En el caso de parejas que ya tienen un hijo con SD con trisomía 21 regular, se ha determinado que el riesgo teórico de tener un segundo hijo afectado es del 1.5% para mujeres menores de 30 años y para mayores de 30 años el riesgo de recurrencia depende de la edad materna (Tabla 3). (Hsu, 1986. y Scriver, 1995).

Edad materna al nacimiento del primer hijo con SD	Recurrencia
<30 años	1.5%
30 años	2.1%
35 años	2.81%
40 años	10.4%
45 años	44.1%
47 años	79.7%

Tabla 3. (Tomado de Scriver, 1995)

Hasta la fecha las causas de la recurrencia no se han establecido con certeza, pero existen evidencias que sugieren relación con la consanguinidad, predisposición genética a la no disyunción y la presencia de mosaicismo por parte de los padres (Alfi, *et al*, 1980 y Krishna-Murthy y Farag, 1995). De este modo después del primer hijo con SD se recomienda a los padres hacer una prueba de diagnóstico prenatal, el estudio en vellocidades coriónicas se recomienda hacerlo entre las semanas 8 -12 y para amniocentesis entre las semanas 14 y 20. Sach en 1990 monitoreó 1211 embarazos con diagnóstico prenatal, precedido de un embarazo con trisomía 21 y observó 6 casos (0.5%) de recurrencia. En un caso encontró que el cariotipo del padre era 47,XY,+21/46,XY en análisis de fibroblastos y en otro caso, la madre había 3%, 14%, 14% y 47% de células trisómicas en cultivo de linfocitos, fibroblastos y los dos ovarios respectivamente. Un total de 2 mosaicos somáticos-gonadales en 1211 parejas (0.08% de 2422 personas), por lo que determinó que desafortunadamente pocas familias con recurrencia de trisomía 21 pueden reflejar esta predisposición genética en el diagnóstico del primer niño con SD.

Sin embargo una vez que se haya presentado la recurrencia, las probabilidades de tener un progenitor con mosaicismo es muy alta (33%) (Gadner y Mckinlay, 1996).

1.8.1 TRANSLOCACIONES.

A diferencia de la trisomía 21 regular, el SD por translocaciones no muestra relación con la edad materna; sin embargo si la madre es portadora de la translocación se considera que tiene un riesgo de 10% al 15% de posibilidades de recurrencia, este porcentaje se considera significativamente bajo en una portadora de una translocación, pero hay que tomar en cuenta que los productos con trisomía 21 que así se procreen son más susceptibles de abortarse espontáneamente. En el caso de que el padre sea el portador de la translocación, el riesgo se considera entre el 3% y 5%. Una explicación a esto alude al hecho de que, probablemente, los espermatozoides desbalanceados son más retardados y lentos en su avance por fecundar al óvulo. (Gamboa, 1994).

1.8.2 MOSAICISMO PARENTAL.

La recurrencia de SD en parejas jóvenes con cromosomas normales y que han tenido concepciones con trisomía 21 se ha relacionado muchas veces como resultado de la presencia de mosaicismo en una línea germinal (Lott, 1992) Uchida y Freeman en 1986 reportaron una madre con 7.4% de células trisómicas en sangre periférica, 2% en fibroblastos, 22% en ovario derecho y 24 en el ovario izquierdo. Nielsen en 1988 reportó otro caso de una madre con múltiples recurrencias de SD con 18% de células trisómicas en estroma de ovario.

Y aunque aún se desconoce el porcentaje de padres con mosaicismo en la población, es importante determinarlo, pues hasta el 60% de los niños con SD han nacido de mujeres menores de 35 años, en muchas de éstas familias el mosaicismo parental podría ser la causa, con un riesgo de recurrencia mayor de 1.5%, es decir, un SD por cada 67 embarazos.

2. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACION.

El riesgo de recurrencia para el SD depende del tipo de alteración citogenética. Generalmente cuando una pareja tiene un hijo con SD por trisomía 21 regular, no se elabora un estudio citogenético a los padres y se da un riesgo empírico de 1.5% de tener otro hijo con SD, sin embargo este riesgo se incrementa considerablemente con la presencia de mosaico parental, dependiendo del porcentaje de células anormales en cada caso. La detección de mosaico parental es muy importante para conocer la contribución de esta alteración a la recurrencia del SD, además es importante el nivel de atención del paciente para obtener criterios e información suficientes y poder proporcionar un asesoramiento genético preciso, así como para que los padres puedan tomar una decisión reproductiva antes de iniciar un nuevo embarazo.

Por lo que se propone la aplicación de la técnica de FISH ya que permite estudiar un mayor número de células y tejidos diferentes (a los linfocitos) y de este modo abordar el problema de la existencia de mosaicismo parental en familias con SD, ya que el 60% de los casos de SD nacen de madres menores a los 35 años.

3. OBJETIVO

Detectar la trisomía por medio de FISH del cromosoma 21 en las células de mucosa bucal de parejas jóvenes menores de 35 años con uno o más hijos con Síndrome de Down por no disyunción.

4. HIPOTESIS

Las parejas con uno o más hijos con trisomía 21 originada por no disyunción presentarán una mayor frecuencia de células de mucosa bucal con trisomía 21, comparada con las parejas normales.

2. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACION.

El riesgo de recurrencia para el SD depende del tipo de alteración citogenética. Generalmente cuando una pareja tiene un hijo con SD por trisomía 21 regular, no se elabora un estudio citogenético a los padres y se da un riesgo empírico de 1.5% de tener otro hijo con SD, sin embargo este riesgo se incrementa considerablemente con la presencia de mosaico parental, dependiendo del porcentaje de células anormales en cada caso. La detección de mosaico parental es muy importante para conocer la contribución de esta alteración a la recurrencia del SD, además es importante el nivel de atención del paciente para obtener criterios e información suficientes y poder proporcionar un asesoramiento genético preciso, así como para que los padres puedan tomar una decisión reproductiva antes de iniciar un nuevo embarazo.

Por lo que se propone la aplicación de la técnica de FISH ya que permite estudiar un mayor número de células y tejidos diferentes (a los linfocitos) y de este modo abordar el problema de la existencia de mosaicismo parental en familias con SD, ya que el 60% de los casos de SD nacen de madres menores a los 35 años.

3. OBJETIVO

Detectar la trisomía por medio de FISH del cromosoma 21 en las células de mucosa bucal de parejas jóvenes menores de 35 años con uno o más hijos con Síndrome de Down por no disyunción.

4. HIPOTESIS

Las parejas con uno o más hijos con trisomía 21 originada por no disyunción presentarán una mayor frecuencia de células de mucosa bucal con trisomía 21, comparada con las parejas normales.

2. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACION.

El riesgo de recurrencia para el SD depende del tipo de alteración citogenética. Generalmente cuando una pareja tiene un hijo con SD por trisomía 21 regular, no se elabora un estudio citogenético a los padres y se da un riesgo empírico de 1.5% de tener otro hijo con SD, sin embargo este riesgo se incrementa considerablemente con la presencia de mosaico parental, dependiendo del porcentaje de células anormales en cada caso. La detección de mosaico parental es muy importante para conocer la contribución de esta alteración a la recurrencia del SD, además es importante el nivel de atención del paciente para obtener criterios e información suficientes y poder proporcionar un asesoramiento genético preciso, así como para que los padres puedan tomar una decisión reproductiva antes de iniciar un nuevo embarazo.

Por lo que se propone la aplicación de la técnica de FISH ya que permite estudiar un mayor número de células y tejidos diferentes (a los linfocitos) y de este modo abordar el problema de la existencia de mosaicismo parental en familias con SD, ya que el 60% de los casos de SD nacen de madres menores a los 35 años.

3. OBJETIVO

Detectar la trisomía por medio de FISH del cromosoma 21 en las células de mucosa bucal de parejas jóvenes menores de 35 años con uno o más hijos con Síndrome de Down por no disyunción.

4. HIPOTESIS

Las parejas con uno o más hijos con trisomía 21 originada por no disyunción presentarán una mayor frecuencia de células de mucosa bucal con trisomía 21, comparada con las parejas normales.

5. POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de estudio estuvo contemplada en tres grupos:

- A. Grupo normal: integrado por parejas que son padres sanos con hijos sanos.
- B. Parejas con un hijo con SD
- C. Parejas recurrentes: integrado por parejas con más de un producto con SD.

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

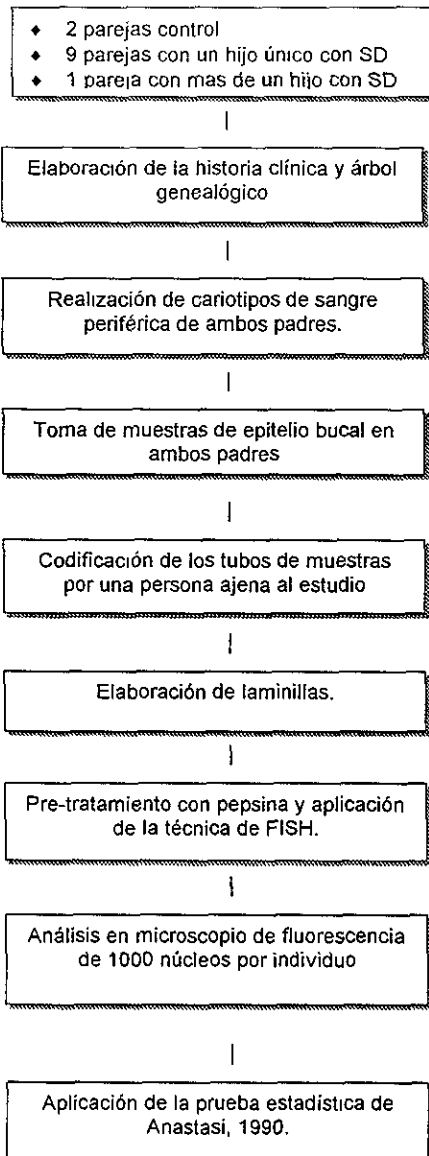
5.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

- A. Parejas de 35 años o menores al momento del nacimiento del o los hijos con SD por no disyunción o trisomía 21 regular o sanos en el caso de las parejas normales.
- B. Que aceptaron participar en el estudio.
- C. Con cariotipo normal 46,XX o 46,XY.
- D. Que acudieron a la consulta de genética del Instituto Nacional de Pediatría o Perinatología.

5.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

- A. Aquellas familias en la que alguno de los padres hubiera sido transfundido dentro de los últimos tres meses, o bien, que hubiera recibido tratamientos que puedan dar lugar a alteraciones cromosómicas.
- B. Que el material para el estudio no fuera suficiente en ambos miembros de la pareja.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL.



7. METODOLOGÍA.

La historia familiar y árbol genealógico lo realizó un médico Genetista, de acuerdo a los lineamientos del formato establecido (apéndice 1).

Para el estudio de FISH (apéndice 2) se requirieron células de tejido epitelial. Los tejidos epiteliales son tejidos que proliferan rápidamente y están en constante contacto con el ambiente, tanto interno como externo del cuerpo. Las células exfoliadas de estos tejidos, por sus características, no pueden ser cultivadas por las técnicas convencionales de citogenética, de manera que las muestras se procesaron con enzimas proteolíticas para desqueratinización y obtención de núcleos en interfase que permitieran la incorporación de la sonda al DNA blanco (Frias, *et al*, 1996).

La presente metodología se modificó con respecto a la propuesta por Schad, *et al*, (1996).

7.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS.

Las células se obtuvieron mediante el raspado de mucosa bucal con un abatelenguas de madera humedecido con agua. Se colocaron en un tubo con solución hipotónica (KCl, 0.075 M) durante 30 minutos. Posteriormente se fijaron con Carnoy (metanol absoluto: ácido acético 3:1), se centrifugaron a 1500 rpm durante 1 minuto y se cambió el fijador 3 veces. Las laminillas se prepararon por goteo en portaobjetos limpios, desengrasados y fríos, y se secaron sobre una superficie caliente a 45°C sin flamear.

7.2 TRATAMIENTO CON LA ENZIMA DE DIGESTIÓN.

Las laminillas se trataron para desqueratinización con pepsina 100µg/ml (0.01 gr/100 ml agua destilada + 87 µl de HCl) a 37° durante 20-25 minutos.; se lavaron con 2 X SSC (0.3 M NaCl, 0.03 M citrato de sodio, pH 7) 3 veces durante 2 minutos, se fijaron con paraformaldehído durante 10 min. y se lavaron con PBS (solución salina de fosfatos) durante 6 min a temperatura ambiente.

7.3 DESNATURALIZACIÓN

Las laminillas se desnaturalizaron en solución al 70% de formamida/2X SSC durante 2 minutos a 75°C, se deshidrataron en alcoholes de 70, 80 y 95% por 2 minutos respectivamente y se dejaron secar a temperatura ambiente. La sonda de secuencia única 21q22.2 marcada con digoxigenina para el loci DZ1 S55 (Oncor, 1996) se desnaturalizó a 72°C durante 5 min.

7.4 HIBRIDACIÓN.

Se aplicaron 10 μ l de sonda desnaturalizada a cada laminilla, se colocó encima un cubreobjetos limpio, se selló perfectamente con goma y se incubó a 37°C durante 24 horas en una cámara húmeda.

Posteriormente se removió con cuidado la goma y el cubreobjetos se dejó deslizar por sí solo en una solución de 0.25X SSC a temperatura ambiente. Las laminillas se lavaron en la misma solución a 70 °C durante 2 min; posteriormente se lavaron en 1XPBD 3 veces durante 2 minutos a temperatura ambiente.

7.5 DETECCIÓN Y AMPLIFICACIÓN

Se retiraron las laminillas de la solución 1X PBD y se aplicaron 25 μ l de fluoresceína conjugada con antidigoxigenina; se cubrieron con un cubreobjetos de plástico y se dejaron incubar durante 1 hora a 37 °C. Se lavaron tres veces con 1X PBD durante 2 min. Para la amplificación de la señal, se incubaron nuevamente a 37 °C 1 hora con 25 μ l del anticuerpo de conejo anti-oveja, se lavaron 3 veces con 1XPBD durante 2 minutos y por último se incubaron también por 1 hora con 25 μ l del anticuerpo anti-conejo marcado con fluoresceína, se lavaron de nuevo de la misma manera.

Para la contratinción, se adicionaron 8 μ l de ioduro de propidio, se colocó un cubreobjetos de vidrio y se selló con goma.

7.6 ANÁLISIS CELULAR.

Las células de epitelio bucal se observaron en el microscopio de fluorescencia Olympus BX40; con una lámpara de vapor de mercurio de arco corto HBO de 100 watts y un filtro BF de 520/610 nm de triple banda: DAPI, Fluoresceína y Rojo Texas con el objetivo de 100X, para observar la contratinción del DNA y detectar las señales que denotaban la presencia de algún cromosoma 21.

Todas las muestras se analizaron en forma ciega en laminas codificadas por una persona ajena al estudio, se analizaron 1000 núcleos por individuo. Para la identificación de las señales se utilizó un sistema de doble color: las señales 21q22 se observaron de color verde sobre las células contrateñidas de color rojo en un fondo negro (Foto 1).

Se consideró a una célula monosómica cuando solo presentaba una señal de hibridación, una célula normal cuando había 2 señales y una célula trisómica cuando se observaban 3 señales.

7.7 CRITERIOS DE ANALISIS.

Se analizaron aquellas células que presentaron su morfología sin alteraciones, no superpuestas, sin restos celulares y sin señales inespecíficas de modo que sólo se tomaron en cuenta las células con señales evidentes, que tuvieran aproximadamente el mismo tamaño, la misma intensidad y con una separación de por lo menos un dominio entre cada señal y que no se encontraran en la periferia.

7.8 INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Para poder determinar a los individuos con mosaicismo para el cromosoma 21, se obtuvieron los valores basales para las células con 3 señales de hibridación, los cuales representan el valor a partir del cual una población celular puede considerarse como anormal. Los valores basales se obtuvieron de las parejas normales mediante la siguiente fórmula según Anastasi, *et al*, (1990).

8. CONSIDERACIONES ETICAS Y CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

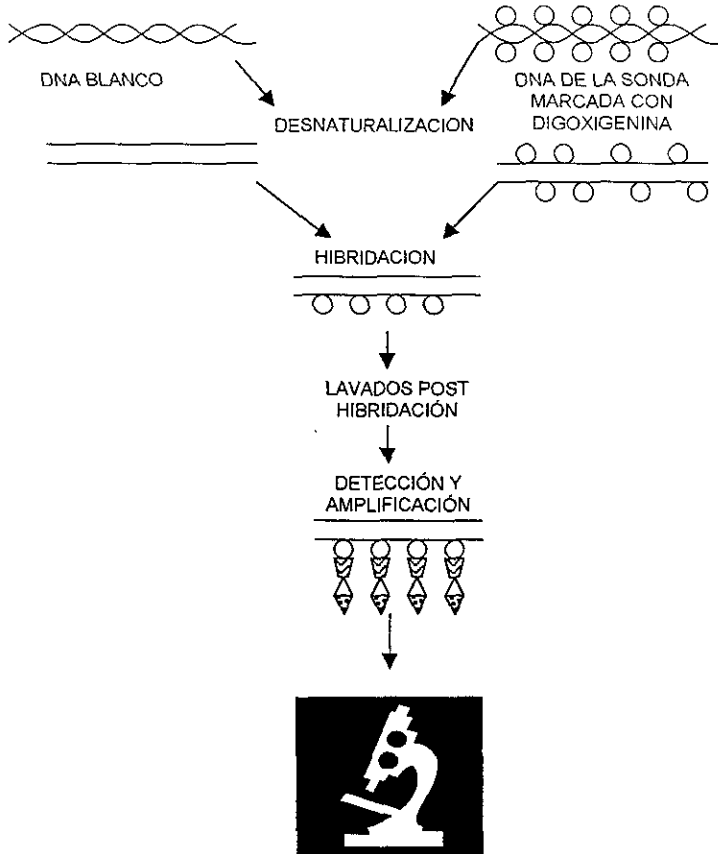
Los riesgos que se pueden presentar son los siguientes:

El proporcionar el asesoramiento genético inicial en donde se expone la posibilidad de recurrencia de esta entidad, genera en la pareja angustia durante el resto del estudio, por lo que a estas parejas se les dió la opción de acudir a la consulta de Psicología para recibir apoyo al respecto.

La toma de muestras se realizó por una persona adiestrada en el procedimiento y con las medidas higiénicas necesarias.

Cada pareja que acudió a participar en el estudio firmó una carta de consentimiento informado (apéndice 3).

TECNICA DE HIBRIDACIÓN *IN SITU* CON FLUORESCENCIA



- Digoxigenina incorporada a la sonda
- ◐ Antidigoxigenina marcada con fluoresceína
- △ Rabbit anti-sheep
- ◑ Anti-rabbit marcado con fluoresceína

9. RESULTADOS

Se analizaron un total de 12 parejas procedentes del Instituto Nacional de Pediatría y del Instituto Nacional de Perinatología; 2 parejas normales, 9 parejas con un hijo con SD y 1 pareja con más de un hijo con SD, a cada pareja se le dio un número clave (tabla 1).

Se registraron las edades de ambos padres al nacimiento del hijo afectado, siendo la edad menor de 16 años, pareja 3 y la mayor de 35 años, parejas "1" y "11", con un promedio de 23 años.

- Cariotipo en sangre periférica de las parejas estudiadas.

El cariotipo en sangre periférica se realizó en todos los padres y madres con el propósito de identificar alteraciones del cromosoma 21 observables al microscopio óptico o en su defecto detectar alteraciones relacionadas con otros cromosomas que pudieran dar pie al fenotipo Down en la descendencia. Todos los pacientes fueron normales para el cariotipo de sangre periférica con bandas G, registrándose 2 polimorfismos cromosómicos: el individuo P5 con 46,XYqh+ y el individuo P7 con una inv(9)(p11q12). (tabla 1).

- Antecedentes obstétricos de las parejas estudiadas.

Dentro de las parejas estudiadas: en la "3" se presentó una amenaza de aborto en el segundo mes de embarazo. En la pareja "4" la madre presentó oligohidramnios severo durante el embarazo lo cual no tuvo repercusión en el producto. En la pareja "7" se presentó líquido amniótico meconial, es decir, hay defecación de parte del producto *in útero*. En la pareja "8" se reportó un aborto espontáneo (sin estudio cromosómico) previo al nacimiento del hijo con SD. Por lo que se ignora si el segundo hijo con SD fue un caso de recurrencia por la presencia de algún factor predisponente en la pareja o si la etiología del aborto fue totalmente independiente. En la pareja recurrente "12" se reportó un óbito, un aborto, un SD fallecido, un aborto con SD y un hijo normal, datos muy sugestivos de un factor predisponente para una no disyunción o la presencia de mosaicismo parental (tabla 1).

- Estudio en células de mucosa bucal

En la tabla 2 se presentan los datos y valores calculados para determinar el mosaicismo de la trisomía 21 de acuerdo al protocolo de Anastasi (1990). Se tomaron en cuenta las células con 3 señales de las parejas normales, para identificar a los individuos con posible mosaico trisómico para el cromosoma 21, se obtuvo el promedio y se sumó 2 veces la desviación estándar. De acuerdo a lo anterior en el presente estudio se registró un valor límite de 0.62% de células con trisomía del cromosoma 21 en mucosa bucal, por lo que todos los padres estuvieron por arriba de este valor se consideraron mosaicos.

En el grupo de padres con un hijo con SD, se encontró que a los individuos M3 con 0.7%; P6 con 0.8% y M9 y M10 con 0.9% (tabla 3). En la pareja recurrente ninguno de los padres mostró un valor sugestivo de mosaicismo parental del cromosoma 21 (tabla 4).

En gráfica 1 se muestran en general los porcentajes de células con trisomía 21 de cada individuo estudiado, la barra horizontal muestra en promedio más 2 veces la desviación estándar (0.62%) de células trisómicas para el cromosoma 21.

Tabla 1 Datos generales e historia clínica de las parejas analizadas.

PAREJAS		M (madre) P (padre)	Edad (AÑOS)	Cariotipo en sangre periférica	Antecedentes clínicos de importancia
parejas con hijos normales	1	M P	35 35	46,XX 46,XY	
	2	M P	29 28	46,XX 46,XY	
Parejas con un hijo con SD	3	M P	19 16	46,XX 46,XY	amenaza de aborto en segundo mes con pre-eclampsia.
	4	M P	17 18	46,XX 46,XY	oligohidramnios severo
	5	M P	27 23	46,XX 46,XY,Yqh+	
	6	M P	29 27	46,XX 46,XY	
	7	M P	20 21	46,XX 46,XY, inv(9)	líquido amniótico meconial
	8	M P	27 26	46,XX 46,XY	un aborto espontáneo previo
	9	M P	33 24	46,XX 46,XY	
	10	M P	26 27	46,XX 46,XY	
	11	M P	35 33	46,XX 46,XY	
Parejas con SD recurrentes	12	M P	29 29	46,XX 46,XY	1 obito, 1 aborto, 1SD fallecido 1 aborto SD y 1 normal

Tabla 2. Valores de parejas normales para determinar mosaïcismo de trisomía del cromosoma 21

Parejas normales	No. total de núcleos analizados	Porcentaje de células con 1, 2 y 3 señales.		
		1	2	3
M1	1000	0	99.6	0.4
P1	1000	0.1	99.5	0.5
M2	1000	0	99.8	0.2
P2	1000	0.5	99.3	0.2
promedio				0.32
DS				0.15
prom+2DS				0,625*

*Todos los individuos por arriba de este valor se consideraron mosaicos para la trisomía 21.
(Anastasi, 1990)

Tabla 3. Porcentaje de células con trisomía 21 en padres con un hijo con SD.

Parejas	No. total de núcleos analizados	Porcentaje de núcleos con 1, 2 y 3 señales		
		1	2	3
M3	1000	0.2	99.1	0.7
P3	1000	0.2	99.5	0.3
M4	1000	0	99.9	0.1
P4	1000	0.4	99.3	0.3
M5	1000	0	100	0
P5	1000	0	99.8	0.2
M6	1000	0.8	99	0.2
P6	1000	0.5	98.7	0.8
M7	1000	0	99.6	0.4
P7	1000	0	99.5	0.5
M8	1000	0	99.5	0.5
P8	1000	0	99.7	0.3
M9	1000	0.2	98.9	0.9
P9	1000	0.2	92.2	0.6
M10	1000	0.2	98.9	0.9
P10	1000	0.2	99.4	0.4
M11	1000	0.1	99.8	0.1
P11	1000	0.2	99.2	0.6

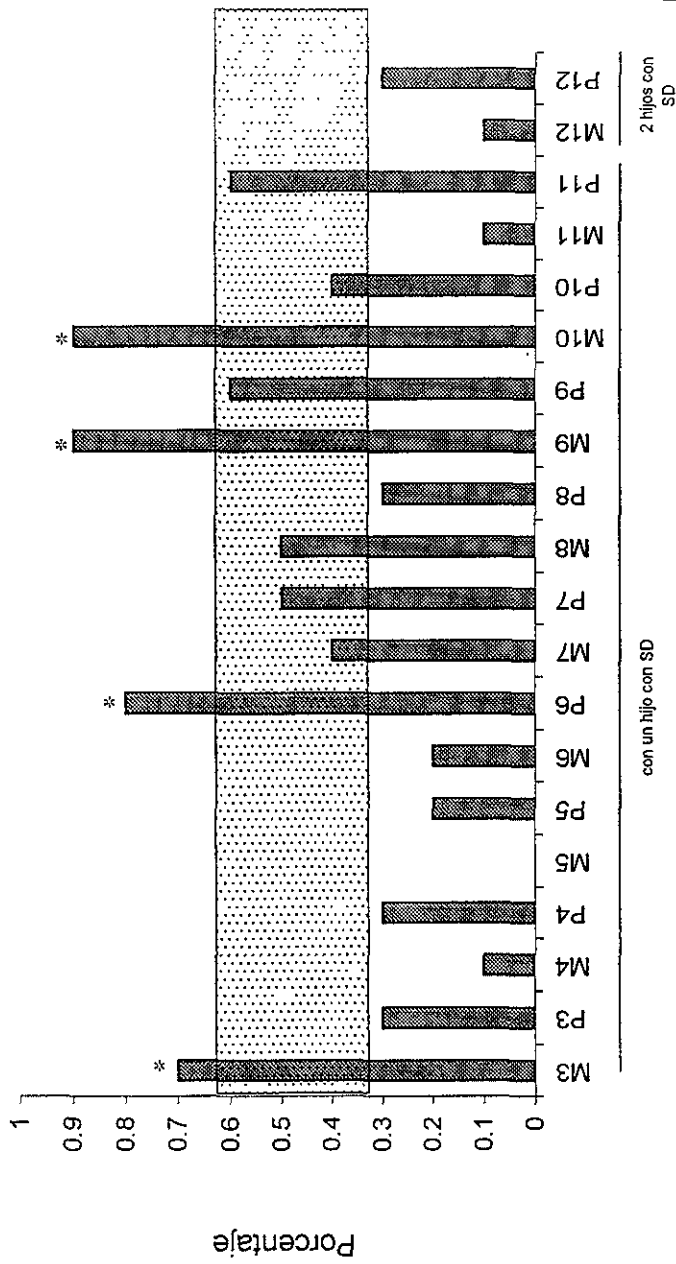
*En negritas se muestran los individuos que de acuerdo al criterio de Anastasi se consideraron como portadores de una población celular trisómica para el cromosoma 21 (0,62% valor normal según valor obtenido por criterio de Anastasi, *et al*, 1990)

Tabla 4. Porcentaje de células con trisomía 21 en padres con más de un hijo con SD.

Pareja	No. total de núcleos analizados	Porcentaje de células con 1, 2 y 3 señales.		
		1	2	3
M12	1000	0.4	99.5	0.1
P12	1000	0.1	99.6	0.3

(0,62% valor normal según valor obtenido por criterio de Anastasi, *et al*, 1990)

Frecuencia de células con 3 señales.



Gráfica 1. Los asteriscos señalan a los individuos mosaicos para la trisomía 21 en células de mucosa bucal. La barra punteada representa el porcentaje promedio de las parejas normales más 2 desviaciones estándar.

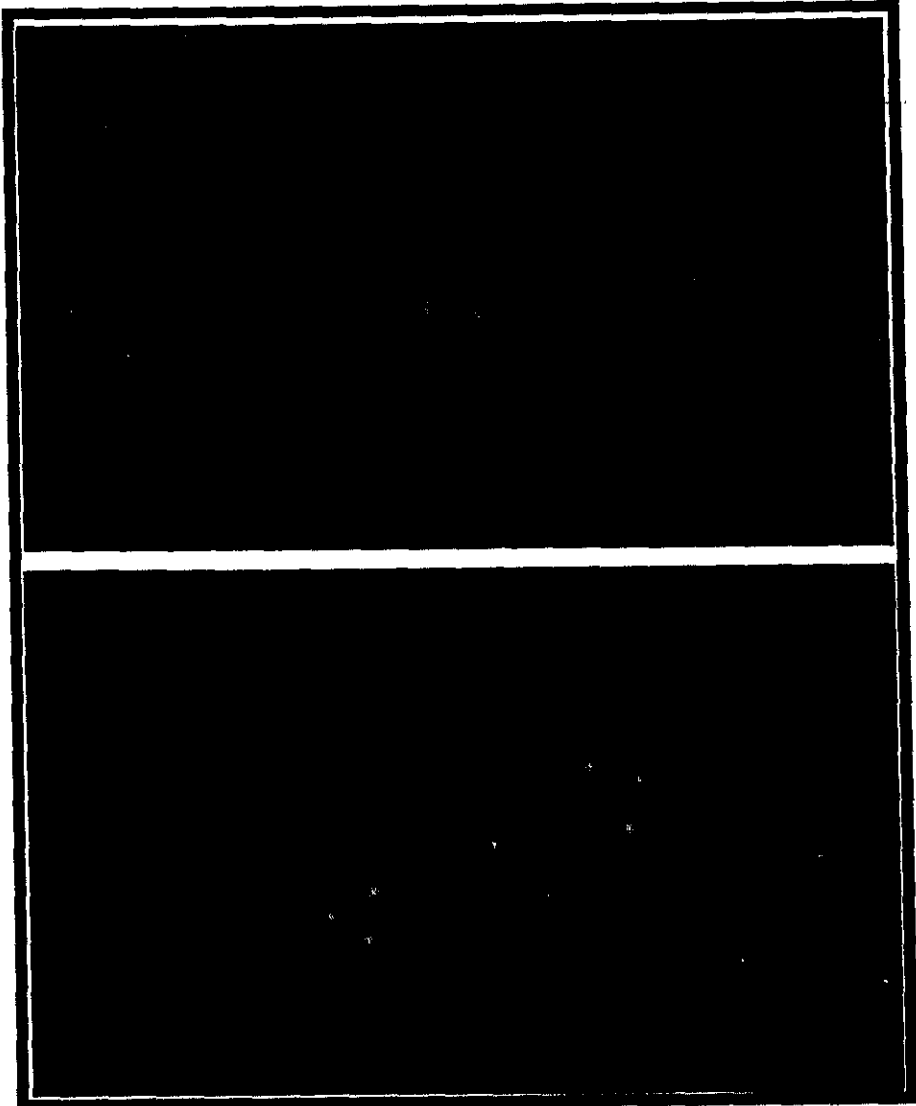


Foto 1. Núcleos de mucosa bucal que muestran 2 y 3 señales correspondientes al cromosoma 21.

10. DISCUSIÓN

El SD siempre ha estado asociado a la edad materna avanzada, es decir, mujeres mayores de 35 años y se ha atribuido a: (i) el envejecimiento de los óvulos ya que eventos acumulativos extrínsecos e intrínsecos pueden repercutir en el proceso de meiosis los cuales pueden llevar al mecanismo de no disyunción; (ii) una falla en la tubulina la cual se ve reflejada principalmente en la ruptura de los microtúbulos antes de que ocurra la separación correcta de los cromosomas y (iii) otro factor propuesto, pero aún no comprobado, es la presencia de enfermedades de la tiroides y la autoinmunidad tiroidea materna (Pangalos, *et al*, 1992; Scriver, 1995; Gamboa, 1994).

Sin embargo, en los últimos años se ha observado que el 60% de los niños con SD nacen de parejas menores de 35 años, tema del cual existen datos epidemiológicos limitados y además abre un área muy importante para ayudar a entender la etiología de la trisomía 21, ya que siempre se ha relacionado a este con la edad materna avanzada y al estado fisiológico del óvulo (Krishna-Murthy y Farag, 1995., Wyrobek, *et al*, 1996).

Entre las posibles etiologías para los nacimientos con SD en parejas jóvenes se han propuesto: (i) factores ambientales como: la presencia de virus, la radiación y agentes químicos (Alfi, *et al*, 1980); (ii) eventos de *novo* (Krishna-Murthy y Farag, 1995); y (iii) genes que predisponen al evento de no disyunción y que podrían explicar algunos casos relacionados con la consanguinidad (Alfi, *et al*, 1980). También se ha propuesto sobre todo en los casos de SD recurrente en las parejas jóvenes, el mosaicismo parental sin manifestaciones clínicas en los padres (Pangalos, *et al*, 1992; Krishna-Murthy y Farag, 1995).

En la última década, la citogenética se ha visto reforzada por la técnica de FISH realizada generalmente en sangre periférica, pero cuando su toma no es posible, también se han utilizado otros tejidos como lo son los fibroblastos o en estudios más específicos biopsias de tejidos u órganos

En muchas ocasiones la toma de éstas muestras es difícil o incómoda para los pacientes y debido a que el tejido epitelial de la mucosa bucal representa un tipo de muestra abundante y de fácil acceso se propone como otro tipo celular para el estudio de las alteraciones cromosómicas por medio de FISH; además de promover el uso de ésta técnica en células en interfase ya que las células exfoliadas del tejido epitelial no son viables y por lo tanto no pueden ser cultivadas *in vitro* (Moore, *et al*, 1993).

De acuerdo a las ventajas que ofrecen las células exfoliadas del tejido epitelial y la metodología de FISH el objetivo del presente estudio fue detectar mosaicismo parental del cromosoma 21 en parejas jóvenes. Este trabajo se llevó a cabo con 12 parejas, de las cuales: 2 tenían hijos normales, 9 un hijo afectado con SD y la pareja restante tenía más de un hijo con SD.

- Antecedentes obstétricos de las parejas estudiadas.

Entre los antecedentes clínicos de importancia (tabla 1), en la pareja 3 se presentó amenaza de aborto en las primeras semanas de gestación del caso índice. Cabe mencionar que la presencia de abortos o amenazas de abortos en concepciones con SD son comunes, ya que en la literatura se ha reportado que hasta el 60% de los productos concebidos con trisomía 21 son abortos espontáneos en las primeras semanas de la gestación, el 20% nacen muertos y solo el 20% restante nacen vivos. (Gadner y Mckinlay, 1996).

En el caso de la pareja 8, en un primer embarazo se presentó aborto espontáneo, ya que no se realizó estudio genético del material abortado, no se puede determinar si el caso índice con SD es el resultado de una recurrencia o si el aborto surgió por un evento diferente. En la pareja 12 en se reportaron un óbito, un aborto, un hijo con SD fallecido, un aborto con SD y un hijo normal, los cuales llevaron a la conclusión de que la pareja era muy sugestiva de la presencia un factor predisponente para los continuos nacimientos y abortos de fetos con SD, y uno de estos factores podría ser la presencia de mosaicismo en alguno de los padres.

- Cariotipo en sangre periférica.

El resultado del cariotipo en sangre periférica fue normal en todos los padres estudiados con un hijo con SD, sólo en 2 de ellos, se observaron polimorfismos cromosómicos, los cuales son variantes estructurales en tamaño y posición de la heterocromatina constitutiva observada principalmente en los cromosomas 1, 9, 16 y Y. Estos polimorfismos cromosómicos se encuentran ampliamente distribuidos en la población sin causar algún efecto clínico, aun en sus formas más extremas (Therman, 1992) y se utilizan principalmente en la determinación del origen parental y meiótico de cromosomas extras en la descendencia (Wyrobek, *et al*, 1996).

En el padre de la pareja 5 (P5) el polimorfismo se presentó como una inversión pericéntrica (9)(p11q12) (tabla 1, P5). Al respecto, en 1990 Krishna-Murthy reportó el caso de una mujer con esta inversión y una elevada frecuencia de abortos y nacimientos con SD. En su caso, el análisis en sangre periférica mostró un elevado porcentaje de células con división prematura del centrómero, endorreduplicación, poliploidías y aneuploidías, por lo que sugiere que la inversión predispone a la no disyunción por tener algún efecto intercromosómico que permitía la alta incidencia de aneuploidías del cromosoma 21, señalando que el riesgo de tener un hijo con SD se podía incrementar hasta en un 3%; sin embargo no existen suficientes evidencias que lo apoyen. En contraste Thompson y Thompson (1996) menciona que esta pequeña inversión (9)(p11q12) está presente en más del 1% en la población, y que no tiene efectos deletéreos conocidos en los portadores, no parece estar asociada con un riesgo significativo de abortos o descendencia desequilibrada y por lo tanto se considera generalmente como una variante normal.

El segundo polimorfismo encontrado en este estudio fue un Yqh+, el cual no se ha asociado con ninguna alteración o aneuploidía de otros cromosomas.

- Estudio en células de mucosa bucal.

De acuerdo al protocolo de Anastasi, *et al*, 1990, en el presente estudio se decidió que solo se tomarían como mosaicos a los individuos que presentaran valores de células trisómicas por arriba de los obtenidos en el grupo de parejas con hijos normales. Las parejas normales, mostraron un cariotipo normal, no se registraron antecedentes clínicos de importancia durante el embarazo y no se encontró en ningún padre datos sugestivos a la presencia de un mosaicismo para la trisomía 21. De acuerdo a este criterio, en este estudio de las 10 parejas con un hijo con SD, 4 personas (16.6%), 3 mujeres y un hombre, fueron consideradas mosaicos somáticos para la trisomía 21.

Cabe mencionar que dentro de estas 4 personas sólo en una (M3) se reportó amenaza de aborto durante el embarazo del caso índice. En los 3 individuos restantes no se reportaron alteraciones durante el embarazo.

En lo que respecta al único caso de trisomía 21 recurrente (pareja 12), ninguno de los padres estuvieron por arriba de del valor indicado para considerarlos como mosaicos; por lo que a ambos se les propuso el estudio a nivel de células germinales. Desafortunadamente la pareja decidió no continuar con el estudio genético, con lo cual no pudo ser descartado un posible mosaico a nivel germinal. En esta pareja, una explicación para la recurrencia de SD sin evidencia de mosaico, sería que en los padres existiera un factor genético predisponente para la no disyunción. Alfi y colaboradores al realizar un estudio de la frecuencia esperada de SD en grupos de parejas consanguíneas propuso la existencia de un gen recesivo que predispone a la no disyunción mitótica. Cuando ambos padres son heterocigotos para el gen, el cigoto homocigoto puede sufrir no disyunción para el cromosoma 21, ya sea en la primera o subsecuentes divisiones mitóticas. Si persiste la línea normal se desarrollará como mosaico; pero si se pierde, el cigoto se desarrollará como una trisomía 21. Por lo tanto el paciente con SD podría ser homocigoto recesivo para el gen de la no disyunción mitótica.

Otra opción es que el gen autosómico recesivo autosómico se halla originado de una no disyunción meiótica y por lo tanto se encuentren gametos desbalanceados en alguno de los padres (Alfi, et al, 1980).

En el presente trabajo, la frecuencia de mosaicismo en padres de niños con SD, esta por arriba de lo reportado por Uchida y Freeman en 1985, quienes por medio de estudios cromosómicos, reportaron de un 2.7% a un 4.3% de padres con mosaicismo. Lo antes mencionado se puede explicar porque: 1) el número de células analizadas en este estudio fue mayor que el analizado por Uchida. 2) en estos casos se utilizó solo una sonda y por lo tanto se debe tomar en cuenta que se incluyen las células poliploides, lo cual podría generar un sesgo en nuestros resultados. Entre los primeros estudios realizados para establecer la contribución del mosaicismo parental en el SD, se encuentran el de Penrose en 1966 y Priest en 1973, quienes por medio de datos dermatoglíficos reportaron un aporte del 19% de mosaicismo parental en todos los casos de trisomía 21 (11% en madres y 8% en padres).

El presente estudio mostró que las células epiteliales de mucosa bucal son otro tipo de tejidos en el cual se puede realizar estudios citogenéticos por medio de la técnica de FISH en núcleos interfásicos, además de que ofrece la ventaja de que las células no son cultivadas *in vitro* y por lo tanto no existe un efecto de selección en contra de las células anormales.

Es por ello la importancia de realizar estudios citogenéticos a nivel de otros tejidos y más cuando se trata de la presencia de un mosaico, ya que este puede estar confinado a ciertos órganos del cuerpo y en diferentes proporciones, por lo cual muchas veces puede pasar inadvertido y ser la causa de un fenotipo anormal en la descendencia. Posiblemente sea por eso las grandes diferencias y opiniones acerca del aporte materno y paterno que se han encontrado en los estudios para saber el origen del cromosoma 21 extra en la descendencia de padres jóvenes. Ya desde principios de la década de los 70's, los primeros trabajos que trataron de conocer el origen del cromosoma extra en niños con SD, utilizaron los polimorfismos

cromosómicos del brazo corto del cromosoma 21 (Grouchy, 1970; Juberg y Mowrey, 1983 y Jones, 1988), los cuales fueron informativos hasta en un 75% de los casos. En los siguientes 10 años los resultados de los estudios citogenéticos más grandes realizados en la década, indicaron que el origen del cromosoma 21 extra era materno en el 80% de los casos y 20% de origen paterno (Juberg y Mowrey, 1983; Hassold y Jacobs, 1984).

Pangalos y colaboradores en 1992, usando marcadores polimórficos de DNA del brazo largo del cromosoma 21 determinó el origen parental y meiótico del cromosoma 21 extra en la descendencia de familias con recurrencia de SD; entre sus resultados, encontró que el mosaicismo parental es un factor etiológico muy importante (22%) en la recurrencia del SD. Penrose reportó un 11% y Harris en 1982 encontró que el 3% de las parejas jóvenes con uno o más hijos con SD presentan mosaico para esa trisomía.

Ya para la última década del milenio 2 estudios colaborativos, utilizaron marcadores moleculares polimórficos del cromosoma 21, en donde estimaron un error de no disyunción materna en un 95% y solo un 5% de los casos son errores de origen paterno (Antonarakis et al., 1991). Los resultados más recientes basados en estudios moleculares determinaron un 8-9% de errores de no disyunción paternos (Mikkelsen, *et al*, 1995); quedando demostrado que también los padres pueden participar en los eventos de no disyunción, aunque con una contribución minoritaria (Hassold, 1998). Esto trajo como consecuencia un auge en los estudios para identificar directamente la participación del hombre en las aneuploidías; en los últimos años se han llevado a cabo estudios sobre el origen de las aneuploidías y del mecanismo de no disyunción (Hassold, 1998 y Wyrobek, *et al*, 1996) en células germinales masculinas por medio de fertilización cruzada involucrando ovocitos de Hamster y espermatozoides humanos. Entre los resultados de estos estudios se encontró: una tasa de aneuploidía total cercana al 2%, la presencia de disomías para todos los cromosomas y la existencia de un factor preferencial para algunos cromosomas. Entre los cuales, los cromosomas 1, 9, 16, 21 y los cromosomas sexuales se encontraron sobre representados en al menos el 50% de los espermatozoides hiperhaploides. Por lo que este

estudio sugirió la existencia de 2 mecanismos específicos de no disyunción paterna relacionada a la estructura de los cromosomas; la primera involucra a los cromosomas 1, 9, 16 y Y que contienen bloques variables de heterocromatina pericentromérica y la segunda es una variación en la recombinación cromosómica, como en el bivalente XY y el cromosoma 21 los cuales están unidos por sólo un quiasma en la meiosis masculina, mientras que los demás cromosomas están unidos por 2 quiasmas o más, lo que podría resultar en una frecuencia más alta de no disyunción para el cromosoma 21 (Hassold, 1998)

Recientemente con la introducción de la técnica de FISH multicolor ha sido posible no solo discriminar espermatozoides disómicos de espermatozoides diploides sino que también hace posible distinguir entre disomía de cromosomas sexuales como resultado de un error en meiosis I (disomía XY) o en meiosis II (YY o XX) (Hassold, 1998).

Entre los resultados registrados en estos estudios se reportó la existencia de una evidente variación entre los autosomas para la no disyunción. Específicamente en 3 estudios en los cuales se estudio la disomía del cromosoma 21 se reportaron niveles significativamente más altos que para otros autosomas (Hassold, 1998). Así, los resultados de los estudios iniciales de FISH en espermatozoides confirman la participación de la no disyunción paterna pero con niveles mucho más bajos que la no disyunción materna y que además existe una variación significativa entre cromosomas para la tasa de no disyunción.

Cabe mencionar que es necesario realizar más estudios de aneuploidías del cromosoma 21 en este tipo de tejidos ya que éste es uno de los primeros trabajos reportados sobre padres jóvenes con hijos con SD. Es muy importante tomar en cuenta que las células de la mucosa oral forman parte de un tejido epitelial que esta en constante contacto y exposición con el medio ambiente, por lo que se podrían presentar variaciones en su ciclo celular, degeneración del material genético, metaplasias, cambios neoplásicos y alteraciones cromosómicas no constitucionales sino tejido específicos.

También hay que tomar en cuenta que con frecuencia las células epiteliales son hiperdiploides y poliploides, lo cual puede sesgar nuestros resultados (Titenko-Halland, 1994., Schad, *et al*, 1996). Tomando esto en cuenta se propone para los siguientes trabajos aumentar el número de parejas de todos los grupos, aumentar el análisis celular, hacer el estudio de FISH con más de una sonda para detectar al mismo tiempo aneuploidías de otros cromosomas y tomar en cuenta la eficiencia de hibridación de la sonda al DNA blanco ya que también puede influir en los resultados esperados ya que en estos estudios hay que analizar el mayor número de células posibles para detectar los posibles mosaicos crípticos.

Otra propuesta muy importante es la sugerida por Van Hummelen en 1996, la cual consiste en desarrollar una guía con reglas de análisis que pudieran seguirse en todos los laboratorios con el fin de estandarizar el análisis de los fenotipos fluorescentes y así poder encontrar los porcentajes límites de mosaicismo parental que ocasionan en la descendencia el SD.

En conclusión el método de FISH en mucosa bucal se puede utilizar como un tejido opcional para estudiar los casos de aneuploidías cromosómicas, mientras que se sigan encontrando grandes diferencias entre lo reportado en los diferentes estudios de mosaicismo parental y las técnicas citogenéticas y moleculares sean más exactas para llegar a un valor estándar. De modo que nuestros resultados no sustituyen los métodos de citogenéticos si no que la complementan.



Instituto Nacional de Pediatría

HISTORIA CLINICA GENETICA X

DEPENDENCIA _____ FECHA _____

EDAD _____ M F No HOJA _____

EDAD _____

EDAD MATERNA AL NACIMIENTO _____ ORIGINARIA DE _____

EDAD PATERNA AL NACIMIENTO _____ ORIGINARIO DE _____

CONSANGUINIDAD _____

ARBOL GENEALOGICO

_____ ANTECEDENTES OBSTETRICOS P. E.

GESTA _____ PARA _____ ABORTOS _____ DURACION DE GESTACION _____ SEM.

INTENSIDAD DE MOVIMIENTOS FETALES _____ PROBLEMAS EN EL EMBARAZO (ENFERMEDADES, MEDICAMENTOS, RADIACIONES) _____

_____ PARTO _____ ATENDIDO EN _____ ANALGESIA _____

PRESENTACION _____ PESO _____ NEONATAL INMEDIATO _____

HIBRIDACION *IN SITU* CON FLUORESCENCIA (FISH)

La técnica fue descrita por primera vez por Pardue y Gall en 1969 (Swiger y Tucker, 1996). Se usa para muchos propósitos, incluyendo el análisis de daño cromosómico, la localización de expresión de ciertos genes, el arreglo de DNA y RNA nuclear, las aberraciones estructurales, secuencias homólogos entre especies, aneuploidías de células somáticas o germinales y mapeo de genes; así como también es de gran ayuda para diversas áreas de estudio, como en el diagnóstico clínico, Toxicología Molecular, Biología Molecular y Citogenética Clínica y Molecular (Swiger, 1996)

Un aspecto importante de la técnica es que permite el estudio de células tanto en metafase como en interfase, así como incrementar el número de células analizadas, proporciona datos acerca de la tasa de clonas con alteraciones cromosómicas y confirma de manera rápida las alteraciones cromosómicas numéricas en pacientes donde el diagnóstico citogenético es difícil de realizar (Frias, et al, 1996; Swiger & Tucker. 1996).

La hibridación *in situ* se basa en el apareamiento de una sonda de DNA con una secuencia de bases complementarias a secuencias de un DNA "blanco" que se encuentra en cromosomas específicos. Para que esta unión se pueda llevar a cabo, se requiere que tanto la sonda como el DNA blanco sean tratados en un proceso de desnaturalización, durante el cual se desestabilizan los puentes de hidrógeno que se encuentran entre los pares de bases dando como resultado la separación de las dobles hebras de DNA. Posteriormente se continúa con un proceso de hibridación que permite la formación de moléculas "híbridas" estables entre las hebras sencillas de la sonda y del DNA blanco.

La detección de la sonda que hibrida con el DNA blanco se realiza por medio de haptenos incorporados a la sonda de DNA, tales como: la biotina y la digoxigenina. Estas moléculas son detectadas por medio del uso de anticuerpos, los cuales a su vez se encuentran conjugados con un fluorocromo, que puede ser: fluoresceína, rodamina o rojo texas. Por ultimo de utiliza una contratinción la cual se asocia fuertemente al DNA y contraíñe la fluoresceína, como el yoduro de propidio, para la observación e identificación de los cromosomas o núcleos. El análisis celular se realiza con un microscopio equipado con fluorescencia y la presencia de hibridación positiva se podrán ver como pequeñas señales de color verde sobre un DNA de color rojo. (Swiger y Tucker, 1996).



**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**
Instituto Nacional de Pediatría

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION EN GENETICA HUMANA
LABORATORIO DE CITOGENETICA

México, D.F. a de de 199

A quien corresponda:

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

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

Muestra de sangre ()

Muestra de raspado de mucosa bucal ()

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

A t e n t a m e n t e .

Firma del padre

Firma de la madre

14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- ◆ Alfi O. S., Chang R. y S. Azen. Evidence for genetic control of non-disjunction in man. *Am J Hum Genet.* 1980, 32: 477-483.
- ◆ Anastasi, J., Le Beau, M., Vardiman, J. y C. Westbrook. Detection of numerical chromosomal abnormalities in neoplastic hematopoietic cell by *in situ* hibridization with a chromosome-specific probe. *Am Pathology.* 1990, 136: 131-138.
- ◆ Antonarakis, S. E., Aldelsberger, P., Petersen, P., Binkert, F. y C. Schinzel. Analysis of DNA polymorphisms suggests that most *de novo* dup(21) chromosomes in patients with Down Syndrome are isochromosomes and not translocations. *Hum Genet.* 1990, 968-972.
- ◆ Antonarakis, S. E., Lewis, J. G. y P. A. Adelsberger. Down Syndrome collaborative group. Parental origin the extra chromosome in trisomy 21 as indicated by analisis of DNA polymorphisms. *New Eng J Med.* 1991, 324: 872-876.
- ◆ Antonarakis, S. E. The meiotic stage of nondisjunction in trisomy 21: determination by using DNA polimorphisms. *Am J Hum Genet.* 1992, 50: 550-554.
- ◆ Armendares S., Buentellos L., y F. Salamanca. Frecuencia de mixoploidías en 85 casos índice con síndrome de Down. *Rev Inv Clin.* 1990, 42: 103-108.
- ◆ Dagna B., Pierluigi M., Grasso M., Strigini P. y L. Perroni. Origin of extra chromosome 21 in 343 families: Cytogenetic and molecular aproaches. *Am J Med Genet Suppl.* 1990, 7: 129-132.
- ◆ Delabar, J. M., Didier, T., Sohar, R., Zoubida, C., Blouin, J., Noel, B. y P. Siner. Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21. *Eur J Human Genet.* 1993, 1: 114-124.

- ◆ Frias, S., Ordaz, G., Blanco, B., Molina, B., Del Castillo, V. y A. Carnevale. Detección de aneuploidias por hibridación *in situ* con fluorescencia en células de mucosa oral. Rev Invest Clin. 1996, 48: 355-360.
- ◆ Gardner, S. and R. Mckinlay. 1996. Chromosome abnormalities and genetic counseling. Oxford University Press. New York. 243-245 pp.
- ◆ Gamboa, I. A. 1994. El niño Down. Ediciones año 2000. México. 162 pp.
- ◆ Giraud, F. y J. F. Mattei. Epidemiologic aspects of trisomy 21. J Hum Genet. 1975, 23: 1-30.
- ◆ Grouchy, J. 21p- maternal in two families with trisomy 21. Ann Genet. 1970, 13: 52-55.
- ◆ Harris D. J., Begleiter, M., Chamberlin, J., Hankis, L. y R. Megenis. Parental trisomy 21 mosaicism. Am J Hum Genet. 1982, 34: 125-133.
- ◆ Hassold, T. J. Nondisjunction in the human male. Curr Topic in Dev Biol. 1998, 37: 383-406.
- ◆ Hassold, T. J. y P. A. Jacobs. Trisomy in man. Ann Rev Genet. 1984, 18: 69-97.
- ◆ Hassold, T. J. y N. Takaesu. 1989. Analisis of non-disjunction in human trisomic spontaneous abortions. In: Hassold, T. J., Epstein, C.J. (eds). "Molecular and Cytogenetic Studies of Non-disjunction". Alan R. Liss. Inc. New York. 115-134 pp.
- ◆ Hsu, T. C. Pathak, S., Basen, B. M. y G. J. Sarrk. Induced Robertsonian fusions and tandem translocations in mammalian cell cultures. Cytogenet Cell Genet. 1978, 21: 86-98.

- ◆ Hsu, L. F. 1986. Prenatal diagnosis of chromosome abnormalities genetic disorders and the fetus. A. Milunsky ed. Plenum Publishing Corp. 115-167 pp.
- ◆ Jones K. L. 1988. Down Syndrome. In: Jones K.L. Smith's recognizable patterns of human malformation. Fourth edition. W.B. Saunders company, Philadelphia. 10-15 pp.
- ◆ Juberg, R. C. y P. N. Mowrey. Origin of nondisjunction in trisomy 21 syndrome: all studies compiled, parental age analysis, and international comparasions. Am J Med Genet. 1983, 16: 111-116.
- ◆ Krishna-Murthy, D.S. y T. I. Farag. Recurrent regular Trisomy 21 in two bedouin families. Parental mosaicism versus genetic predisposition. Ann Genet. 1995, 38: 217-224.
- ◆ Lott, I. y E. Mc Coy. 1992. Down Syndrome. Wiley-Liss. New York, USA. 196 pp.
- ◆ Mikkelsen, M., Poulsen, H., Grinsted, J. y A. Lange. Non-disjunction in trisomy 21 : study of chromosomal heteromorphisms in 110 families. Ann Hum Genet. 1995, 44: 17-25.
- ◆ More, L., Titenko-Holland, N. y M. Smith. Use of *in situ* hibridization to detect chromosome-specific changes in exfoliated human blader and oral mucosa cell. Environm Mol Mutagen. 1993, 22: 130-137.
- ◆ Nielsen, K. G., Poulsen H., Mikkelsen M y E. Steuber. Multiple recurrence of trisomy 21 Down Syndrome. Hum Genet. 1988, 78: 103-105.
- ◆ Niikawa, N. y K. Tadashi. The origin of mosaic Down syndrome: four cases with chromosome markers. Am J Hum Genet. 1984, 36: 123-130.
- ◆ O'brien S. J. 1993. Genetic maps. Human maps. Book S. Laboratory Press. Cold Spring, Harbor . 23-24 pp.

- ◆ Oncor, Inc. 1994. Chromosome *in situ* hybridization system. Ed. 3.1. Gaithersburg, MD. USA. 32 pp.
- ◆ Ortega, L. 1997. El Síndrome de Down. Trillas. México. 186 pp.
- ◆ Pangalos, C. Conover, C., Lewis, J., Adelsberger, A., Petersen, M., Serre, J., Rethoré, M., De Blois, M., Parent, P., Schinzel, A., Binkert, F., Boue, J., Corbin, E., Croquette, M., Gilgenkrantz, S., De Grouchy, J., Bertheas, M., Prieur, M., Raoul, O., Serville, F., Siffroi, J., Thepot, F., Leujene, J. y S. E. Antonarakis. DNA polymorphism analysis in families with recurrence of free trisomy 21. Am J Hum Genet. 1992, 51: 1015-1027.
- ◆ Petersen M. B., Frantzan M., Antonarakis S. E., Warren A. C., Van Broecheoven C., Chacravarti A., Cox T. K., Lund C., Olsen B., Poulsen H., Sand A., Tommerup N. y M. Mikkelsen. Comparative study of microsatellite and cytogenetic markers for detecting the origin of the non-disjoined chromosome 21 in Down syndrome. Am J Hum Genet. 1991, 51: 516-525.
- ◆ Pueschel, S. y J. Pueschel. 1994. Syndrome Down. Salvat Santander. España. 336 pp.
- ◆ Salamanca, F. 1990. Cuadros clínicos de los autosomas. Síndrome de Down. Cap. 12. En: Salamanca F. Citogenética humana. Editorial Médica Panamericana. México. 117-128 pp.
- ◆ Schad, C., Kuffel, D. G., Wyatt, W. A., Zinsmeister, A. R., Jenkins, R. B., Dewald, G. W y S. M. Jalal. Application of fluorescent *in situ* hybridization with X And Y chromosomes specific probes to buccal smear analysis. Am J Med Genet. 1996, 66: 187-192.
- ◆ Scriver, C.R. 1995. The metabolic and molecular base of inherited disease. Mc Graw-Hill. Inc. New York. 1: 749-794 pp.
- ◆ Swiger, R. R. y J. D, Tucker. Fluorescence *in situ* hybridization: A Brief Review. Enviromen Mol Mutagen. 1996, 27: 245-254.

- ◆ Therman, E. 1992. Human chromosomes. Springer-Verlag. New York. 1-300 pp.
- ◆ Thompson y Thompson. 1996. Genetic in Medicine. W. B. Saunders Company. Philadelphia. USA. 500 pp.
- ◆ Titenko-Halland, N. Measurement and characterization of micronuclei in exfoliated human cells by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe. *Mutat Res.* 1994, 00. 1-10.
- ◆ Uchida, I. y V. Freeman. Trisomy 21 Down syndrome. *Hum Genet.* 1986, 72: 118-122.
- ◆ Wilson, M., Towner, J. y Y Forsman. Decreasing mosaicism in Down's syndrome. *Clin Genet.* 1980, 17: 335-340.
- ◆ Wyrobek, A., Aardema, M., Eichenlaub-Ritter, U., Ferguson, L. y F. Marchetti. Mechanisms and targets involved in maternal and parental age effects on numerical aneuploidy. *Environm Mol Mutagen.* 1996, 28: 254-264