



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Medicina

División de estudios de Posgrado
Hospital Infantil de México Federico Gómez

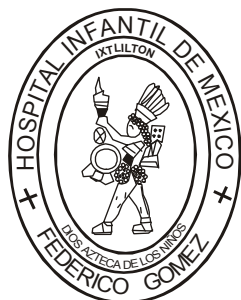
Análisis de alteraciones del cromosoma 18 en pacientes atendidos en el
Departamento de Genética del Hospital Infantil de México Federico Gómez de
1998 al 2008. Revisión de 2 casos.

Tesis que para obtener el Título de Especialista en Genética Médica

Presenta:
Dr. Francisco Gabino Zúñiga Rodríguez.

Directora de Tesis:
Dra. Verónica Fabiola Morán Barroso.

Asesores de Tesis:
Dra. Constanza García Delgado.
M en C Roberto Guevara Yáñez.
Dra. Rocío Sánchez Urbina.



México D.F. Febrero 2010



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.

Dra. Verónica Fabiola Morán Barroso
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. Rocío Sánchez Urbina
Investigadora en ciencias médicas A del Departamento de Genética
Hospital Infantil de México Federico Gómez

M. en C. Roberto Guevara Yáñez
Laboratorios Biogen

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

AGRADECIMIENTOS

- Subdirección de Enseñanza del Hospital Infantil de México Federico Gómez; en especial a los **Drs. Yolanda Rocío Peña Alonso, Aarón Pacheco Ríos y Claudia Gutiérrez Camacho**. Por su interés, dedicación y sus palabras por atender a mis comentarios, sugerencias e inquietudes desde hace 3 años.
- **Dra. Verónica Fabiola Morán Barroso**; jefa del Departamento de Genética del HIMFG. Por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de residentes, sus enseñanzas, dedicación en cada uno de los trabajos, esfuerzo y orientación en los momentos requeridos.
- **Dra. Constanza García Delgado** por su dedicación, interés, enseñanza y sus palabras de motivación, apoyo y jalones de orejas cuando fue necesario.
- **Dra. Rosa Isela Ortiz de Luna** por compartir sus enseñanzas, interés, dedicación, su apoyo, amistad y palabras de aliento.
- **Dr. Francisco Javier Flores Ramírez** por sus enseñanzas, dedicación e interés.
- **Dra. Roció Sánchez Urbina** por sus enseñanzas y dedicación en este trabajo para que la parte teórico-práctica se pudiera realizar.
- **M. en C. Roberto Guevara Yáñez**; parte fundamental en la realización de este trabajo, su empeño, dedicación y tiempo invertido para la orientación y discusión. Muchas gracias!
- **M. en C. Alicia Cervantes Peredo** por transmitirme sus enseñanzas, dedicación y esfuerzo por guiarme en el camino de la Citogenética y la Biología Molecular a lo largo de estos 3 años, gracias infinitas maestra!
- A mis compañeras y amigas **Ely Bahena y Dany Medina**; por los momentos alegres, difíciles y tristes a lo largo de estos 3 años que hemos pasado por tantas cosas en la residencia.
- A mis ex compañeros. Drs. **Victor Bárcenas, Arturo Flores, Iliana Peña y Mariana Torres** con quienes compartimos los primeros años de esta residencia, llenos de alegrías, tristezas y enseñanzas. Se les extraña amigos!!
- A mis compañeros. Drs. **Melania Abreu, Ocelotl Azotla, Luz Márquez, Enrique Martínez, Jimena Barraza y Ulises Mireles**. Por su apoyo, amistad y todos los gratos momentos. Se les extrañara.
- Al personal de Citogenética del HIMFG; **QFB. Ana Yolotl Aparicio Onofre, Judith Villa Morales y Biol. Idalia Pérez**. Por compartir sus enseñanzas, experiencia, amistad y ser parte fundamental en la realización de este trabajo también.
- Laboratorio de Tamiz Metabólico. **M. en C. Patricia Baeza Capetillo** por su entusiasmo, compartir sus conocimientos en el área y amistad.
- Laboratorio de Biología Molecular. **Maestro en Ciencias Benjamín Rodríguez y Adriana Sánchez Boiso** por sus enseñanzas y amistad.
- **Srita. Silvia Basurto y Sr. José Guadalupe Mejía (Don Jo)** parte fundamental en la operatividad del departamento de Genética.
- **A todo el personal de la Hemero-biblioteca del HIMFG**
- **Departamento de Archivo clínico y Estadística**. Por la facilidades otorgadas para el análisis de los expedientes y estadística.
- **CEMESATEL**. Gracias por su apoyo y amistad a lo largo de estos 3 años.

DEDICATORIA

- A Dios por permitirme llegar hasta este momento, por traerme antes a este mundo, cuidar de mí y los míos y por darme una nueva oportunidad después de aquel día de Junio....La misión continua. S.C.J.V.C.
- A la memoria de mi abuela Petra (Petrita) por buscar siempre lo mejor para nuestra familia, sacrificarlo todo y llenar nuestras vidas de incuantificable amor. Te extrañare por siempre.
- Mi Madre: Ube...Gracias por tu amor, comprensión, apoyo incondicional y cuidar de mi desde antes de que mi tiempo llegara y no darte por vencida en las situaciones difíciles.
- Mi Padre: José Luis...Gracias por tu amor, apoyo incondicional, tus enseñanzas tan importantes en mi vida, tus sabios consejos y esa congruencia...Mi primer y mejor maestro en la medicina. Cazadores de microbios por siempre!
- Dante mi hermano mayor, por su cariño, apoyo y consejos en todo momento.
- Paty mi única y querida hermana, por cuidar de mi, apoyarme en todo en esta vida...por siempre agradecido! T.Q.M.
- Beto (Manach) por tus consejos, cariño, apoyo en todo momento, complicidad y toda la serie de vivencias..... Juntos hasta el fin.
- A mis sobrinas y sobrino: Montse, Dante, Arantza, Mariana y Naomi. Han traído una gran felicidad a nuestra familia.
- A mi cuñado y cuñadas...Pepe, Marina y Liliana....Gracias por su apoyo en todo momento.
- A mi familia por ambas ramas..Zúñiga y Rodríguez..Gracias por todo su apoyo y cariño.
- Familia Zúñiga Álvarez...Por cuidarme, quererme y ese gran apoyo que me han dado en todo desde mi llegada a esta ciudad.
- Kendy López por tu amor, cariño, comprensión y ese gran apoyo y motivación que me das para continuar día a día. JUNTOS A PESAR DEL VIENTO Y LA DISTANCIA EN CONTRA. TE AMO! Familia López Hernández muy agradecido por su cariño y apoyo.
- A mi amigo...Miguel Ángel (woodie) Mora Moreno y familia...Gracias por todo en este tiempo y amistad desde que inicio el viaje.
- Mis amigos y amigas: Jairo Flores y familia, Amaury Aguilera, Rodrigo Silva, Alfredo Hernández, Rosa María Guerrero, Jenny y José Hernández, Efraín Dávalos, Morelos Villaseñor, Carlos Ortiz, Roberto Suarez, Amalia Reyes.
- Drs. Juan Abraham Bermúdez, Felipe de Jesús Domínguez Chávez, Alfredo Villareal Amaro...Por sus enseñanzas y creer en mí.
- Dr. Juan Gerardo García González y Familia...Gracias por su apoyo, enseñanzas, motivación y AMISTAD...ahí estamos Master!
- A ti que siempre has estado a mi lado...

“RESPECTO POR LA TIERRA Y LA GENTE QUE LLEGO ANTES QUE YO, LAS QUE VIVEN CONMIGO Y LAS QUE FALTAN POR LLEGAR....ORAR POR LOS DIOS Y LUCHAR POR MI GENTE”

Proverbio Hawaiano

Índice

1. Introducción	
1.1 Bases moleculares de la herencia.....	1-2
1.2 Bases cromosómicas de la herencia.....	2-4
1.3 Procesos de división celular.....	4
1.3.1 Mitosis.....	4-5
1.3.2 Meiosis.....	5
1.4 Clasificación de los cromosomas humanos.....	6
1.5 Aberraciones cromosómicas.....	7
1.5.1 Alteraciones numéricas.....	7
1.5.2 Aberraciones estructurales.....	7-9
1.6 Técnicas de citogenética convencional y molecular.....	10
1.7 Indicaciones para estudio cromosómico.....	11
1.8 Estructura del cromosoma 18.....	12
1.8.1 Síndromes por alteraciones numéricas y estructurales del cromosoma 18.....	13
1.8.1.1 Trisomía 18.....	13-14
1.8.1.2 Síndrome por delección 18p.....	14-15
1.8.1.3 Síndrome por delección 18q.....	15-16
1.8.1.4 Anillo del cromosoma 18 (r18).....	16
1.8.1.5 Síndrome por isocromosoma del brazo corto i(18)(p)....	16
1.8.1.6 Síndrome por isocromosoma del brazo largo i(18)(q)....	16-17
2. Planteamiento del Problema.....	18
3. Justificación.....	19
4. Objetivo General.....	20
4.1. Objetivos particulares.....	20
5. Material y métodos.....	21
5.1 Descripción de la metodología.....	21
5.2 Criterios de inclusión.....	22
5.2.1 Primera fase del estudio. Análisis de casos con alteración del cromosoma 18 de 1998-2008.....	22
5.2.2 Segunda fase del estudio. Análisis de casos clínicos con alteración del cromosoma 18 que puedan beneficiarse de otros estudios citogenéticos.....	22
5.2.3 Tercera fase del estudio. Aplicación de los estudios moleculares....	22
5.3 Criterios de Exclusión.....	22
5.3.1 Primera fase del estudio.....	22
5.3.2 Segunda fase del estudio.....	22
5.3.3 Tercera fase del estudio.....	22
5.4 Criterios de Eliminación.....	23
5.4.1 Primera fase del estudio.....	23
5.4.2 Segunda fase del estudio.....	23
5.4.3 Tercera fase del estudio.....	23
5.5 Análisis de la información.....	23

5.5.1 Primera fase del estudio.....	23
5.5.2 Segunda fase del estudio.....	23
5.5.3 Tercera fase del estudio.....	23
6. Resultados.....	24
6.1 Resultados de la primera fase del estudio: Revisión de la frecuencia y tipo de alteraciones del cromosoma 18.....	24
6.2 Resultados de la segunda fase del estudio.....	26
6.2.1 Caso 1.....	27-28
6.2.2 Resultados de análisis cromosómico con bandas GTG y FISH del caso 1 familiar.....	29-32
6.2.3 Discusión del caso 1.....	33-35
6.2.2 Caso clínico 2.....	36-42
6.2.2.1 Discusión del caso 2.....	43-44
7. Discusión.....	45-47
8. Referencias bibliográficas.....	48-50
9. Anexos.....	51-58

1.- INTRODUCCION

La información genética está codificada en el ADN el cual fue descubierto por Miescher en 1869 y caracterizado por Watson y Crick en 1953, quienes apoyados en los trabajos de Chargaff, Franklin y Wilkins, establecieron su estructura.(1, 2, 3) Cada organismo consta de su propio genoma con la capacidad de transmitir esta información de una generación a la siguiente.(4) El desarrollo normal de un organismo depende de la integridad de esta información tanto en cantidad como en su estructura a nivel molecular y a nivel cromosómico.

1.1 Bases moleculares de la herencia

El genoma nuclear humano contiene alrededor de 3000 millones de pb, se estima que solo del 1.5 a 2% de la secuencia es codificante. La secuencia de ADN en eucariotas puede corresponder a genes de copia única, secuencias repetidas y secuencias espaciadoras.(5) El ADN nuclear humano esta empaquetado en 23 pares de cromosomas: 22 pares de autosomas y los cromosomas sexuales X y Y. Cada uno de los 46 cromosomas humanos contiene un dúplex de ADN que se extiende entre dos telómeros. La compactación del ADN en un cromosoma en metafase es de hasta 1/10,000 de su longitud en extensión y se logra por diferentes niveles de compactación; que se correlaciona con los niveles de organización del ADN, iniciando con el nucleosoma y en orden creciente de empaquetamiento el siguiente nivel es la fibra de cromatina de 30nm, asas, bandas y cromómeros hasta que alcanza el nivel máximo de empaquetamiento en los cromosomas en la división celular.(4)

La asociación del ADN con proteínas y RNA conforma a la cromatina, la cual corresponde a heterocromatina o eucromatina. La heterocromatina representa las regiones más condensadas de la cromatina, replica de manera tardía durante la fase de síntesis y tiene una acetilación de histonas baja. Existen dos tipos de heterocromatina: constitutiva y facultativa. La constitutiva se caracteriza por ser casi siempre inactiva y condensada y se encuentra en centrómeros, telómeros y en el cromosoma Y. La facultativa puede existir en una forma descondensada y genéticamente activa o condensada e inactiva. La eucromatina representa a la cromatina "relajada" y transcripcionalmente activa; está constituida tanto por ADN de copia única como por secuencias repetidas intermedias dispersas, alta acetilación de histonas y replica a lo largo de la fase de síntesis.(6)

Las histonas son proteínas básicas de peso molecular bajo, hay 5 tipos principales (H2A, H2B, H3 y H4). El nucleosoma representa el primer nivel de empaquetamiento, el ADN de 147pb se enrolla alrededor de un octámero de histonas (2 de cada H2A, H2B, H3 y H4) formando el núcleo central o *core* del nucleosoma de 5.7nm. Esta estructura representa una compactación de alrededor de 9 veces el ADN. Los nucleosomas están unidos por cadena de nucleótidos de aproximadamente 60pb; que es un tramo corto de ADN espaciador por lo que el ADN asociado a los nucleosomas es de aproximadamente 200pb. La histona H1 se encuentra en la posición de entrada y salida del ADN de unión. El empaquetamiento del ADN e histonas forma la fibra de 10nm. Los nucleosomas a continuación los nucleosomas unidos por el ADN de unión se enrollan en una fibra de 30nm; produciendo una compactación 6 veces mayor del ADN. Para explicar la estructura de la fibra de 30nm, se han propuesto varios modelos como el solenoide propuesto por Klung y colaboradores; en el cual los nucleosomas se encuentran uno después del otro en una fibra que se pliega en una hélice de inicio único. En el otro modelo propuesto los nucleosomas están acomodados en zigzag

de tal manera que hay dos cadenas de nucleosomas, el ADN de unión se intercala entre los acumulos de nucleosomas y esto produce una estructura de doble hélice (hélice de doble inicio)(7)(Fig.1).

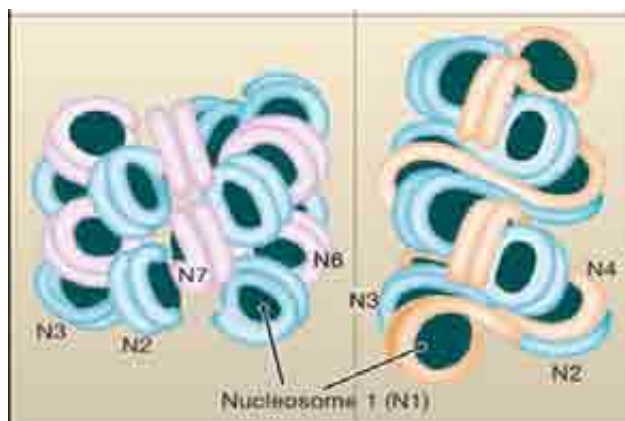


Figura 1. Modelos de la fibra de 30nm; el primero del solenoide con una sola hélice de inicio y el segundo modelo del zig-zag que tiene dos hélices de inicio. Tremethick D. Cell 128, 2007. (7)

El siguiente nivel de empaquetamiento permite la formación de una fibra más gruesa de 130-300nm de diámetro. La estructura que continúa en su organización ahora forma las asas o cromómeros; se encuentran unidas al armazón proteico central; intervienen también las regiones llamadas SAR (del inglés *scaffold attachment regions*). Posteriormente esta estructura interactúa con complejos multiproteicos llamados condensinas que llevan a cabo la condensación de las fibras de cromatina para formar el último nivel de compactación que son los cromosomas.(8)

1.2.- BASES CROMOSÓMICAS DE LA HERENCIA

Los cromosomas constan de 4 partes: el **centrómero** o región de constricción primaria, un brazo corto o “p”, un brazo largo o “q” y los telómeros, que corresponden a los extremos de los cromosomas. De acuerdo a la localización del centrómero, los cromosomas se clasifican en metacéntricos (con brazos largos y cortos de longitud semejante), submetacéntricos (el centrómero se encuentra cercano a un extremo originando brazos p y q de longitud diferente) y acrocéntricos (cuando el centrómero se encuentra más cercano hacia uno de los extremos, con brazos cortos muy pequeños) (10)(Fig.2).

En 1997 Choo y Lee (3) describieron que los centrómeros poseen grandes cantidades de ADN de secuencia única o secuencias altamente repetitivas, la más abundante es el ADN alfa satélite la cual son múltiples copias de una secuencia de 171pb altamente condensadas formando heterocromatina. La longitud total de los centrómeros varía de cromosoma en cromosoma de 300 hasta 5000 kb.(3,4) El **cinetocoro** es la estructura proteica localizada en los centrómeros que median la unión de los microtúbulos del huso y el movimiento de los cromosomas en metafase y anafase. Tiene dos estructuras planas densas, una interna y otra externa separadas por una parte menos densa, llamada interzona. Los microtúbulos del huso se insertan en la placa externa o la corona fibrosa que lo rodea.(3)

Los cinetocoros forman uniones con las fibras del huso acromático durante la división celular y contienen a la proteína dineína involucrada en el impulso de los cinetocoros y su unión a los cromosomas a los polos del huso. Interviene en esta estructura la proteína de heterocromatina 1 (HP1) que se une firmemente a la heterocromatina centromérica y a otras proteínas específicas. Los cinetocoros pueden ser divididos en subunidades y varían en tamaño. Los cromosomas con cinetocoros pequeños parecen estar más involucrados en alteraciones de no disyunción.(3)

Existen 7 proteínas centroméricas o CENP con diferentes características, entre ellas CENP-A: (presente en los nucleosomas centroméricos en lugar de la H3), CENP-B (que se une a una secuencia conservada de 17pb del ADN satélite; la “caja de CENP-B” que se encuentra en muchos repetidos alfa satélites en el repetido de 171 pb presente en todos los centrómeros) y CENP-C: se localiza en la placa interna del cinetocoro) CENP-D: podría ser la proteína RCC1; un regulador de la condensación cromosómica. CENP-E: se encuentra en los centrómeros activos; al igual que la dineína está cercano a la superficie del plato externo del cinetocoro; tiene un rol en la unión de los microtubulos cruzados, CENP-F: tiene un rol poco conocido en la unión de los microtúbulos a la placa externo del cinetocoro, CENP-G: se una a la misma familia alfa satélite al igual que CENP-B. (12)Existen otras proteínas presentes en el cinetocoro tales como la tubulina; la dineína citoplásmica; la proteína MCAK y el antígeno 3F3/2.(3)

Telómeros. Localizados en los extremos de cada cromosoma tienen una secuencia repetida en tándem TTAGGG hasta miles de veces para dar lugar a una longitud de 10kb de ADN en cada extremo de cada cromosoma. Requieren de la enzima telomerasa para que se puedan replicar (4) y tienen un papel esencial en el apareamiento de los cromosomas homólogos en la profase I de la meiosis.(3) Los telómeros tienen la función de mantener y dar estabilidad a los extremos de los cromosomas; también son necesarios para asegurar la replicación completa de los extremos de la molécula de ADN.

Durante cada ronda de la división de las células somáticas los telómeros se acortan por 50-200pb; esto porque la polimerasa de ADN puede sintetizar el ADN del extremo 5' al 3' únicamente. Durante la síntesis del ADN la cadena aislada se proyecta sobre el extremo 3', esto no permite que extremo final de la cadena se replique. Este fenómeno permite la pérdida gradual de las secuencias repetidas teloméricas y como resultado este acortamiento sirve como un reloj mitótico y se piensa que controla el envejecimiento celular y la senescencia celular.(11)

Las células que proliferan activamente tales como las germinales, embrionarias o células madre mantienen la longitud de sus secuencias teloméricas. Algunas células cancerosas no pierden sus secuencias teloméricas durante cada división celular y se convierten inmortales.(11)

Estas estructuras requieren de una enzima telomerasa para que se puedan replicar. Esta enzima tiene un componente de ARN que así mismo sirve como molde y puede elongar el repetido de manera que no depende de la cadena de ADN. (4). También tienen un papel esencial en el apareamiento de los cromosomas homólogos en la profase de la meiosis. Los telómeros están protegiendo del ataque de exonucleasas que van sobre los extremos libres del ADN por una

proteína que se une específicamente a la cola de cadena sencilla. Otras de las proteínas específicas de los telómeros podrían jugar un papel durante la meiosis en la asociación de los telómeros con envoltura nuclear.(3)

Inmediatamente de manera proximal al repetido en tándem TTAGGG se encuentra la región subtelomérica; estas usualmente muestran homología entre los subtipos de los diferentes cromosomas. Los repetidos de la región subtelomérica de los cromosomas humanos son básicamente mosaicos del ADN repetido compartido y otras secuencias compartidas homólogas.(11)

El subdominio distal más cercano al repetido TTAGGG contiene un mosaico de secuencias muy cortas compartidas por diversos cromosomas; estas secuencias no son más allá de 2kb de longitud sugiriendo la ocurrencia de intercambios frecuentes entre todos los telómeros. El subdominio proximal comprende segmentos mayores de 10 a 40kb de secuencias homólogas compartidas que se originaron de unos pocos cromosomas indicando duplicaciones recientes en este dominio; estas duplicaciones podrían haber sido el resultado de translocaciones no balanceadas que ocurrieron entre los telómeros durante la evolución de los primates.(11)

1.3.- PROCESOS DE DIVISIÓN CELULAR

Todos los organismos son el producto de ciclos repetitivos de crecimiento y división celular. Una célula se reproduce por una secuencia ordenada de eventos en la cual duplica su contenido y después se divide para generar dos células hijas, hecho conocido como ciclo celular.(1) El cual consta de dos fases funcionales importantes: La fase S o de síntesis del ADN donde ocurre la replicación cromosómica y posteriormente la fase M o de mitosis donde la célula se divide. Estas dos fases son precedidas por la fase G1 y la fase G2 respectivamente. Existe otra fase llamada G0; en la cual algunas células pueden “salir” del ciclo celular y permanecer sin tener un proceso posterior de proliferación.(1, 12)

En el ser humano existen dos tipos de división celular: la mitosis y la meiosis, el objetivo de la primera es otorgar a las células hijas información genética similar a la célula de origen, mientras que la de la segunda es participar en la formación de los gametos que darán origen a un nuevo organismo.

1.3.1 MITOSIS

La mitosis se realiza en las células somáticas y germinales, en todas las células y es un proceso continuo con cinco etapas: profase, prometafase, metafase, anafase y telofase y citocinesis.(13)

Profase: se caracteriza por la condensación gradual de los cromosomas mediada por la topoisomerasa II que tiene su pico de mayor actividad durante el paso de G2 a mitosis, se une a sitios ricos en AT llamados “regiones de unión al armazón” o SAR. Hay desintegración y desaparición del nucléolo y el comienzo de la formación del huso mitótico. **Prometafase:** La membrana nuclear se rompe, los cromosomas se dispersan y se acoplan a los microtúbulos del huso mitótico. **Metafase:** Los cromosomas alcanzan su máxima condensación y se disponen en el plano ecuatorial de la célula. **Anafase:** Comienza de forma abrupta cuando los cromosomas se separan por su centrómero. Las cromátides hermanas de cada cromosoma se convierten en cromosomas independientes que se desplazan hacia los polos opuestos de la célula. **Telofase:** Los

cromosomas comienzan a descondensarse, se forma una membrana nuclear alrededor de cada núcleo hijo y cada núcleo vuelve de forma gradual a su estado de interfase.(13) Para completar el proceso de la división, el citoplasma se escinde por un proceso denominado citocinesis, que comienza cuando los cromosomas se acercan a los polos del huso.(Fig.3)

1.3.2 MEIOSIS

La meiosis ocurre en las células diploides de la línea germinal y originan gametos haploides. La meiosis consiste en una ronda de síntesis de ADN seguida de dos rondas de segregación cromosómica y división celular (meiosis I o división reduccional y meiosis II o división ecuacional), involucra el apareamiento de cromosomas homólogos.(13)

La **Profase I** consta de 5 etapas: 1) **Leptoteno**: Los cromosomas se hacen visibles como finos filamentos que empiezan a condensarse. 2) **Cigoteno**: los cromosomas homólogos se alinean y permanecen juntos por el complejo sinaptonémico. 3) **Paquiteno**: cada par de homólogos aparece como un bivalente (también llamado tétrada) y se lleva a cabo el entrecruzamiento. 4) **Diploteno**: Desaparece el complejo sinaptonémico y los dos componentes de cada bivalente empiezan a separarse uno del otro y sólo permanecen unidos en los quiasmas. 5) **Diacinesis**: Los cromosomas alcanzan su máxima condensación y es seguida por la **Metafase I**, **Anafase I**, y **Telofase I**.

La **Meiosis II** es similar a una mitosis normal excepto en que el número de cromosomas de la célula que entra a esta fase es haploide. El resultado final son cuatro células, cada una con 23 cromosomas (número haploide).(13)(Fig. 3)

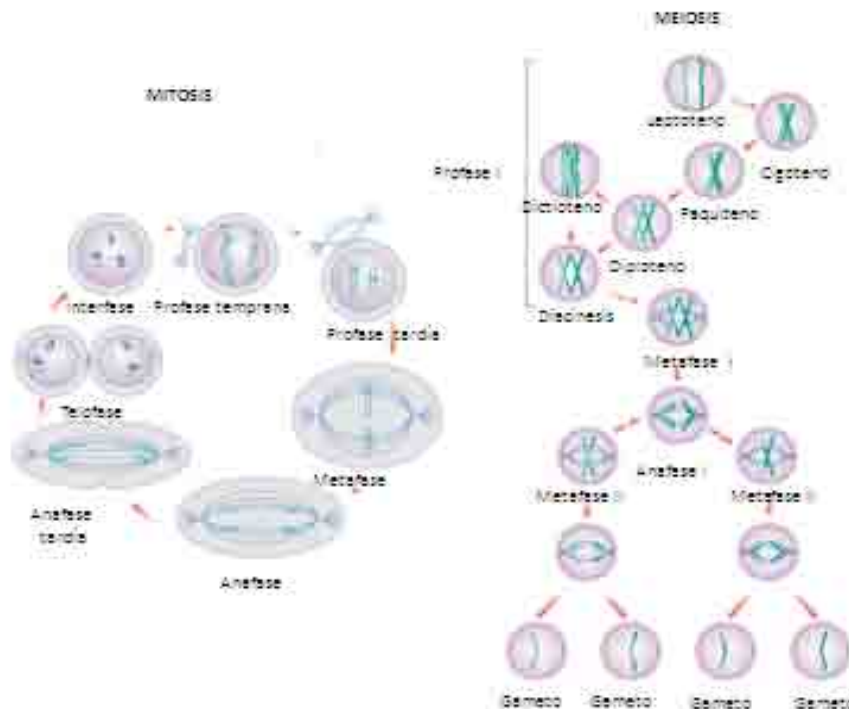


Fig3. Proceso de división celular, en el que se observan las fases tanto de la mitosis como de las dos divisiones meióticas, en las que se puede observar la generación de 2 células hijas en la mitosis con un complemento diploide en comparación con la meiosis donde solo obtienen un complemento haploide y se generan 4 células hijas. Tomado de Moore C, Best R: ELS, 2007.

1.4 CLASIFICACION DE LOS CROMOSOMAS HUMANOS

Los cromosomas se clasifican según el tamaño y por la posición del centrómero, siendo cromosomas metacéntricos, submetacéntricos y acrocéntricos. Además cada banda y sub banda cromosómica que se obtiene derivadas de la tinción generalmente por bandas GTG tienen una designación que identifica el brazo del cromosoma y la región, esta clasificación fue publicada por el *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN) de acuerdo a como se muestra en la tabla 1.(10, 14)

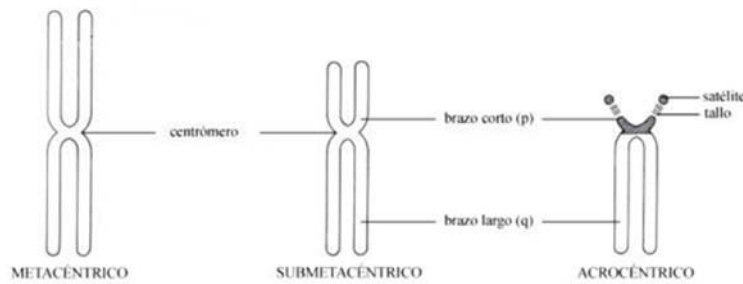


Figura 2. Clasificación de los cromosomas donde se observa la posición del centrómero y los brazos tanto corto como largo; en los acrocéntricos la presencia de los satélites. Tomado de Lizcano F. Fundamentos de biología molecular. 2001.[1]

TABLA 1. Clasificación de los cromosomas

Grupo	Número de cromosoma	Tamaño	Posición del centrómero
A	1, 2, 3	Grandes	Metacéntricos
B	4 y 5	Grandes	Submetacéntricos
C	6 – 12, X	Medianos	Metacéntricos o submetacéntricos
D	13, 14, 15	Medianos	Acrocéntricos con satélites
E	16, 17, 18	Pequeños	Metacéntricos o submetacéntricos
F	19, 20	Pequeños	Metacéntricos
G	21, 22, Y	pequeños	Acrocéntricos, con satélites, excepto el Y

Tabla 1. Clasificación de los cromosomas según el tamaño y posición del centrómero.(14)

1.5 ABERRACIONES CROMOSÓMICAS

Las aberraciones cromosómicas se clasifican en numéricas y estructurales, las cuales se describen a continuación.

1.5.1 ALTERACIONES NUMÉRICAS

Estas alteraciones se dividen en euploidías o poliploidías y aneuploidías dependiendo de que sean o no múltiplos exactos del número haploide (23 cromosomas). (10) Ejemplos de euploidías son las triploidías y tetraploidías y de las aneuploidías son las monosomías y las trisomías, de las cuales los síndromes cromosómicos no mosaicos de cromosomas enteros con sobrevivida postnatal son la Trisomía 21 (T21), la T18 y la T13 por orden de frecuencia.(16) Las aneuploidías frecuentemente están asociadas con la edad materna y constituyen una porción significativa de las anomalías observadas en los abortos espontáneos y en fetos diagnosticados prenatalmente. Las poliploidías en conjunto son condiciones letales frecuentemente observadas en los abortos espontáneos y raramente en nacidos vivos.(10)

Las alteraciones citogenéticas se detectan hasta en 0.6% de los recién nacidos vivos y en un 50 a 60% en los abortos espontáneos de primer trimestre. Las alteraciones cromosómicas balanceadas se han encontrado en 1 de cada 500 en población en general y las alteraciones no balanceadas hasta en un 3% de las alteraciones citogenéticas reconocidas(17). Las aneuploidías se detectan hasta en 26% de los abortos espontáneos y en las muertes fetales in útero y hasta en 0.3% de los recién nacidos vivos. En las células germinales las aneuploidías son el resultado de la no disyunción durante la meiosis. En las trisomías de autosomas en las que los fetos son viables, como las trisomías 21, 18 y 13, la contribución paterna puede ser de hasta 10%.(15)

1.5.2. ABERRACIONES CROMOSÓMICAS ESTRUCTURALES

Tienen una frecuencia combinada en el ser humano de 1 en 500 de población en general (15) e incluyen a las deleciones, duplicaciones, translocaciones (recíprocas y robertsonianas), cromosomas en anillo, isocromosomas y las inversiones.

Los rearrreglos cromosómicos involucran rupturas y reuniones a lo largo ya sea de un solo cromosoma o varios, teniendo esto como resultado cariotipos balanceados o no balanceados. Los rearrreglos son balanceados si no hay un cambio en el material genético y desbalanceados si hay tanto una ganancia (una trisomía parcial) o pérdida (monosomía parcial) del material cromosómico. En la Fig 4. se ejemplifican las diferentes alteraciones cromosómicas estructurales.(10)

Las deleciones resultan por la pérdida de material de un solo cromosoma y pueden ser teloméricas (terminales) (Fig 4.b) o intersticiales (Fig 4. c) las cuales involucran una doble ruptura en el brazo de un mismo cromosoma ocasionando pérdida del material cromosómico entre las rupturas. Los cromosomas en anillo (Fig 4. i) son ocasionados por rupturas en ambos brazos con pérdida del material distal y una reunión subsecuente de ambos extremos.(10, 16)

Las duplicaciones (Fig 4. f) cromosómicas ocurren por un entrecruzamiento desigual ya sea entre cromosomas homólogos o cromátides hermanas; también pueden generarse por una segregación

meiótica anormal de una translocación o en un entrecruzamiento meiótico de un portador de una inversión.

Las translocaciones recíprocas (Fig 4. K) resultan del intercambio entre segmentos cromosómicos de dos o más cromosomas no homólogos. Los portadores de translocaciones balanceadas recíprocas son fenotípicamente normales, pero tienen un riesgo incrementado de tener descendencia no balanceada. El riesgo actual está asociado con la segregación de los componentes translocados, la posición de los puntos de ruptura y la localización del centrómero. En general las manifestaciones clínicas y la sobrevivencia dependen del tamaño del segmento no balanceado.(10, 17)

Las translocaciones robertsonianas (Fig 4. j) involucran a dos cromosomas acrocentricos, frecuentemente este cromosoma resultante de la fusión céntrica es un cromosoma dicéntrico. Los portadores de translocaciones Robertsonianas balanceadas tienen solo 45 cromosomas incluyendo el cromosoma dicéntrico y son fenotípicamente normales, pero tienen un riesgo incrementado de tener descendencia no balanceada y en los hombres se ha encontrado que tienen problemas de fertilidad. La translocación robertsoniana entre los cromosomas 13 y 14 es el rearrreglo cromosómico recurrente más frecuente y se encuentra en 1 de cada 1000 individuos.(10, 17)

Un isocromosoma (Fig 4. h) está constituido por dos copias idénticas de un mismo brazo cromosómico, Son resultado del intercambio entre homólogos durante la meiosis o por ruptura y unión cercana al centrómero de cromatides hermanas, otra de las posibles causas es una falta de división del centrómero durante la meiosis II o mitosis. El isocromosoma más común involucra al brazo q del cromosoma X, frecuentemente observado en pacientes con Síndrome de Turner. La mayoría de los isocromosomas del X son dicéntricos, la inactivación de uno de los centrómeros hace que este cromosoma anormal sea más estable durante la división celular. Los isocromosomas no balanceados siempre son asociados con anomalías clínicas debidas a su desbalance genético heredado. En una persona con 46 cromosomas, la presencia de un isocromosoma resultaría en una trisomía parcial y una monosomía parcial.(10, 17)

Las inversiones balanceadas son rearrreglos en los que se involucra a un cromosoma que resulta de dos rupturas y una rotación de 180° del segmento involucrado previa a la reconstitución. Las inversiones se clasifican como pericéntricas en la que solo tienen una ruptura en cada uno de los brazos, éstas frecuentemente producen un cambio relativo en la longitud de los brazos cromosómicos. La paracéntrica se produce por dos rupturas en el mismo brazo y éstas son identificadas por un cambio en el patrón de bandas del cromosoma afectado. Los portadores de inversiones son comúnmente fenotípicamente normales, pero tienen un mayor riesgo de tener descendencia con monosomías parciales y trisomías parciales por aneusomía de recombinación.(10)

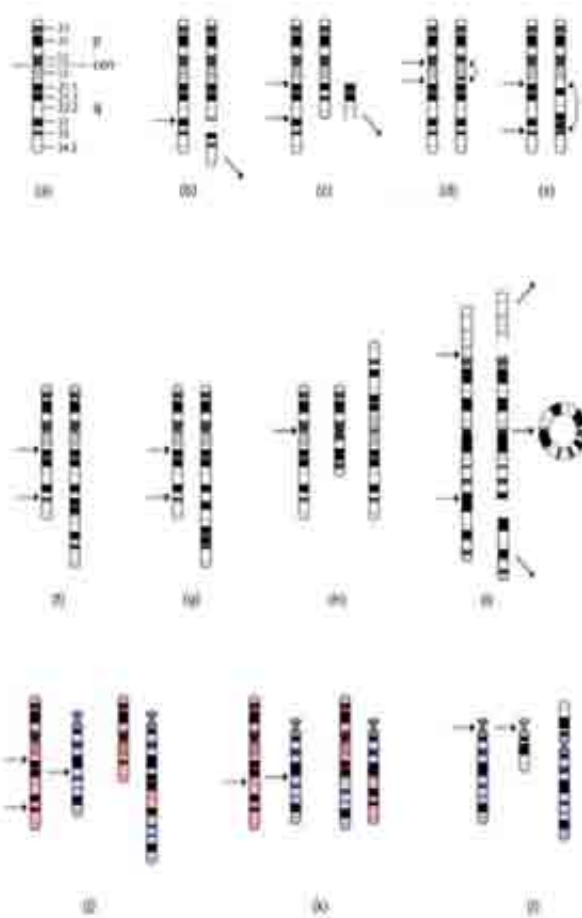


Fig. 4 Aberraciones cromosómicas estructurales. a) ideograma normal, b) deleción terminal, c) deleción Intersticial; con pérdida de fragmento acrocentrico, d) Inversión pericentrica, e) Inversión paracentrica, f) duplicación, g) duplicación invertida, h) isocromosoma de brazos cortos, i) cromosoma en anillo con 2 segmentos acéntricos j) inserción, k) translocación recíproca, l) translocación robertsoniana de 2 cromosomas acrocentricos. Tomado de Luthardt F, Kaitzes E. ELS. 2001.

1.6. TÉCNICAS DE CITOGENÉTICA CONVENCIONAL Y MOLECULAR

El bandeo de los cromosomas humanos fue descubierto por Caspersson y colaboradores en 1970, método que permitió que cada cromosoma fuese distinguido por su patrón de bandas claras y oscuras, mediante la técnica de bandas Q.(3) La resolución del bandeo cromosómico puede incrementarse mediante el análisis de cromosomas menos condensados, como por ejemplo los cromosomas en prometafase. Los procedimientos típicos de bandeo de alta resolución para cromosomas humanos pueden proporcionar un total de 400, 550 u 850 bandas.(18)

Otros métodos de tinción que pueden emplearse para el análisis cromosómico son: **BANDAS Q** que utiliza la tinción con mostaza de quinacrina y microscopía de fluorescencia. Los cromosomas se tiñen con un patrón específico de bandas brillantes y oscuras. Las bandas Q brillantes se corresponden casi exactamente con las bandas G oscuras.(9) **BANDAS R** que crea un patrón de bandeo opuesto a las bandas G y bandas Q, se les conoce como bandas reversas.(9) **BANDAS C**, ésta técnica tiñe específicamente la región centromérica de cada cromosoma y otras regiones que contienen heterocromatina. **BANDAS T** que identifica un subgrupo de bandas R que están concentradas sobre todo en los telómeros. **BANDAS NOR o AG** que corresponden a las regiones organizadoras nucleolares. **CARIOTIPO CON BANDAS DE ALTA RESOLUCION** que permiten un análisis más detallado o la observación de un número mayor de bandas al utilizar cromosomas menos condensados de las bandas cromosómicas en cromosomas prometafásicos.

Además de lo anterior se cuenta con técnicas citogenéticas moleculares como la **HIBRIDACION IN SITU CON FLUORESCENCIA (Ó FISH)** en la que se utilizan como sondas secuencias específicas de ADN marcadas con fluorocromos (9, 19). Se han desarrollado varios tipos de sondas: A) **Sondas locus específico**.- éstas hibridan con una secuencia única de DNA, y se les conoce como sondas LSI (*locus specific identifier*). B) **Sondas centroméricas**, C) **Sondas subteloméricas y Sondas de pintado cromosómico**.(20) mediante esta técnica se pueden identificar anomalías estructurales submicroscópicas; tales como microdeleciones y microduplicaciones.(Fig. 5). Otra técnica es la hibridación genómica comparativa o CGH que permite identificar ganancias o pérdidas de material genético comparando contra un control normal.(21)

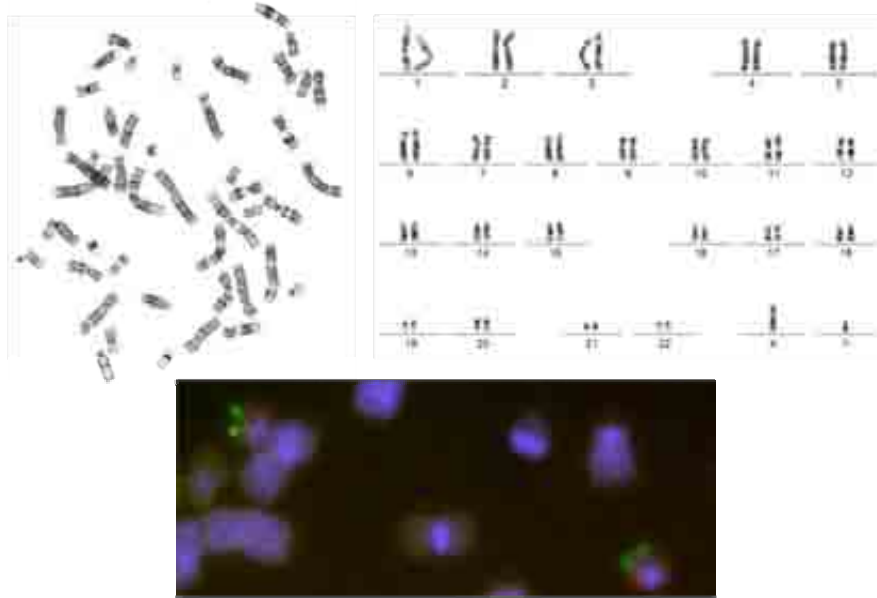


Figure 3. Metáfase bandeada, cariotipo con bandas GTG 46,XY y FISH negativo para del22q11. Realizado por QFB. Ana Yoleli Aparicio Ochoa y Dra. Rocío Sánchez Urbina.

1.7 INDICACIONES PARA ESTUDIO CROMOSÓMICO

El análisis cromosómico está indicado como procedimiento diagnóstico sistemático para una serie de fenotipos y de una serie de situaciones clínicas inespecíficas en los que conviene hacer este estudio. Las indicaciones para realizarlo se enumeran a continuación.(9, 22)

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. Una muestra sanguínea muchas veces es necesaria para esta prueba, pero también se puede realizar en tejido obtenido de una biopsia o de una autopsia.
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

1.8 ESTRUCTURA DEL CROMOSOMA 18

Las alteraciones cromosómicas representan una solicitud de consulta frecuente al médico genetista ya sea por tratarse de fenotipos clínicos bien definidos y conocidos o por alguna de las causas mencionadas incluyendo infertilidad. Uno de los cromosomas frecuentemente encontrado implicado en los estudios realizados es el cromosoma 18, ya sea por presentación clínica de T18 o por alteraciones estructurales balanceadas y desequilibradas.

El cromosoma 18 está clasificado como submetacéntrico, pertenece al grupo E (Fig. 6) y está constituido por 80 Mb, 20Mb en el brazo corto y 65Mb en el brazo largo, tiene una densidad génica promedio de 4 genes/Mb y un total de 283 genes, 243 secuencias marcadas expresadas, 36% de secuencias repetidas, 611 SNP/Mb, 40% C+G, 510 islas CpG y contiene entre 2 y el 6% del material del genoma. Tiene 171 *loci* de pseudogenes y 49 secuencias codificantes de un gen. Algunas de las familias génicas que están contenidas en este cromosoma son: sintasa de ATP y precursores de cerebelina.(23, 24)

Algunas de las enfermedades relacionadas con mutaciones en los genes contenidos en este cromosoma son la holoprosencefalia 4 (OMIM#602630), enfermedad de Niemann – Pick tipo C1 (OMIM#257220), epidermolisis bulosa tipo Herlitz(OMIM#600805), amiloidosis tipo I-III (OMIM#176300) y enfermedad de Byler(OMIM#602397), la deficiencia de carnosinasa (OMIM#212200), la metahemoglobinemia(OMIM#250790) y la displasia hereditaria polioestótica osteolítica(OMIM#603449). Contiene genes relacionados a susceptibilidad a cáncer de páncreas y el síndrome de poliposis juvenil que se han asociado a mutaciones en el gen *MADH4*. Este cromosoma se ha encontrado implicado en translocaciones que involucran padecimientos oncológicos; tales como el sarcoma sinovial por t(X,18)(p11;q11)(OMIM#600192), en el linfoma folicular se han reportado t(14;18)(q32;q21.3), el linfoma MALT- linfoma asociado a tejido de mucosas- por t(11;18)(q21;q21)(OMIM#604860).(23, 24)

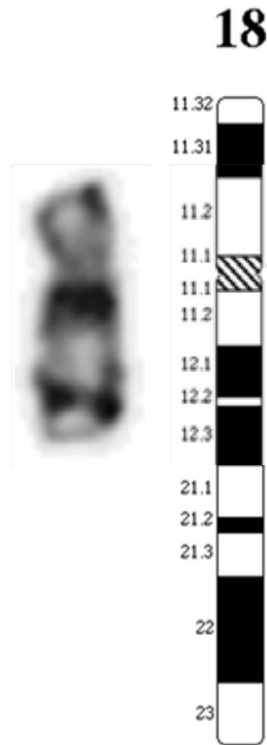


Figura 6. Cromosoma 18 humano con bandas GTG e idiograma. Realizado por QFB. Ana Yolotl Aparicio Onofre y tomado de *ISCN 2005*. (14)

1.8.1. SÍNDROMES POR ALTERACIONES NUMÉRICAS Y ESTRUCTURALES DEL CROMOSOMA 18

1.8.1.1 TRISOMÍA 18

Fue descrita en 1960 por Edwards y colaboradores. El fenotipo está caracterizado por un síndrome dismórfico severo, ocasionando la muerte en las primeras semanas a meses de vida. Con una frecuencia de 1 en 8,000 RNV, relación de 4 mujeres por 1 varón, los embarazos suelen ser postérmino, con poca actividad fetal, polihidramnios, placenta pequeña y una arteria umbilical única frecuente.(25)

El retraso en el crecimiento es muy severo, pobre succión, al principio los pacientes son hipotónicos posteriormente son hipertónicos, cursa con retraso mental grave. Tienen dolicocefalia. Las fisuras palpebrales se encuentran horizontales y cortas, con epicanto bilateral, hipoplasia de los puentes orbitarios, opacidades corneales, microoftalmia. La boca es pequeña con paladar estrecho y micrognatia. El puente nasal es delgado y prominente. Los pabellones auriculares de implantación baja y dismórficos. El esternón es corto, con reducción de puntos de osificación, pezones pequeños, hernias inguinales, umbilicales y diastasis de rectos. La pelvis es estrecha.(25, 26)

En manos los puños están cerrados, el dedo índice se sobrepone al tercer dedo y el quinto dedo sobre el cuarto, las uñas son hipoplásicas. Existe limitación a la abducción o luxación congénita de la cadera, pie en mecedora y el primer orjejo es corto y en dorsiflexión. La sindactilia está presente entre el segundo y el tercer dedos. Es frecuente la criptorquidia e hipotrofia del clítoris y de los labios mayores. Se pueden encontrar anomalías perineales y ano imperforado.(25)

Las malformaciones viscerales ocurren en más del 95% de los casos, las cardíacas son los defectos septales ventriculares y la persistencia de conducto arterioso, gastrointestinales como el divertículo de Meckel, tejido pancreático y esplénico ectópicos, estenosis pilórica. Renales como riñón ectópico o en herradura.(25, 26)

En el 80% de los casos se trata de una trisomía 18 libre 47,XY(X),+18. En el 10% de los casos se trata de un mosaico con una línea celular normal y una población trisómica. En el 10% restante de los casos hay dobles aneuploidías tales como 48,XXY,+18, o se relacionan a una traslocación heredada o de novo.(25)



Figura 7. Pacientes con síndrome de Edward; la primera de 10 días de vida con dismorfia de pabellones auriculares, dolicocefalia, mano con empujamiento característico, pie en mecedora y paciente masculino con el mismo diagnóstico de 2 años de edad. Fotos tomadas con consentimiento informado.

1.8.1.2 SÍNDROME POR DELECIÓN 18p

Descrito en 1963, siendo la primera delección observada en los humanos, en el 84% de los casos no se encuentra un fenotipo evocativo, el retraso psicomotor es más o menos severo. En 16% de los casos hay malformaciones del cráneo y de la cara. La delección frecuentemente ocurre *de novo*, con una relación de 3 mujeres por 2 hombres. El embarazo tiene una duración normal con peso normal. Los pacientes son pequeños y en bipedestación con las piernas muy abiertas e inclinándose.(25,27,28)

La cara es redonda y las fisuras palpebrales horizontales, con epicanto bilateral, ptosis palpebral y estrabismo. El puente nasal es plano y da la impresión de hipertelorismo. El labio superior es corto

y prominente, el *filtrum* es ancho, el margen del labio es plano y ancho, el labio inferior está evertido.(25, 27, 28)

Hay microrretrognatia que se normaliza durante el crecimiento, caries frecuentes y ausencia de incisivos laterales. Los pabellones auriculares con implantación baja y rotados posteriormente y dismórficos. El cuello es corto, en las mujeres frecuentemente es alado, la línea de cabello puede estar baja. El tórax es ancho y deprimido, con teletelia. Existe diástasis de músculos rectos así como hernias umbilicales o inguinales como muestra de la hipotonía.(25, 27, 28)

Las manos son anchas y cortas, clinodactilia del quinto dedo. En las extremidades inferiores se han observado orfejos palmeados, pie plano, pie cóncavo o pie en mecedora excepcionalmente.

El 16% tiene malformaciones cefálicas muy severas, la más frecuente es la cebocefalia, puede haber ciclocefalos con probosis, arrinencefalia, así como microoftalmia. A nivel ocular se observa nistagmus, degeneración retiniana y catarata.(27)El retraso mental es variable, el IQ alrededor de 50. Hay alteraciones en la conducta y sordera. Las crisis convulsivas o los trastornos eléctricos cerebrales son comunes.(25, 27, 28)En dos tercios de los casos hay una delección de novo. Se han reportado casos en mosaico.(27)

1.8.1.3 SÍNDROME POR DELECCIÓN 18q

Descrito en 1964. En la mayoría de los casos la delección ocurre de novo, relación de 3 mujeres por 2 hombres.(25, 29) En los infantes la hipotonía se presenta de manera constante e intensa. Con posición de rana, con los miembros inferiores flexionados, rotación externa y en hiperabducción. El retraso estaturoponderal se va incrementado conforme a la edad, raramente la talla alcanza 1.50mts.(25)

El cráneo es redondo, con microcefalia moderada. Existe una depresión mediofacial entre una frente normal y una aparente protusión mandibular. Las fisuras palpebrales son horizontales y los ojos profundamente incluidos en las orbitas. Cuando el infante llora hay una contracción de los músculos subcutáneos que forman una protuberancia triangular en la punta central de las cejas. Se han observado malformaciones menores como nistagmus, epicanto, estrabismo y ptosis. La forma de la nariz es normal, el eje mayor de la nariz es alargado hacia arriba y hacia afuera, las alas nasales están implantadas de manera que se observa un pequeño triángulo con su base externa.(25, 29)

El labio superior es corto, los pilares del *filtrum* no están definidos, el labio superior tiene forma de un arco, con el lado de la mucosa orientado hacia el frente, el labio inferior está evertido y se proyecta más allá del labio superior, de "carpa". Hay nódulo subcutáneo en las mejillas, la barbilla está ligeramente protuberante.(25)Los pabellones auriculares están bien implantados con el hélix y el antehelix muy desarrollados y delimitan un surco profundo, el antitragus es prominente, la concha es profunda, el conducto auditivo externo puede estar atrésico.(25)

Teletelia y fosetas subacromiales uni o bilaterales, las fosetas están presentes en las regiones epitrocleares, en las regiones posteriores de las manos y las caras laterales de las rodillas. Las manos son largas, delgadas, dedos espatulados y puntas digitales prominentes. La implantación de los orfejos es desordenada, hay clinodactilia, palmaturas y pie equino varo.(25)

Los órganos reproductores son la mayoría de las veces anormales, en los hombres hay ectopia testicular, escroto hipoplásico, hipospadias y pene pequeño, en las mujeres hay hipoplasia de los labios menores. Las malformaciones oculares incluyen la ambliopía, con o sin presencia de nistagmus, atrofia óptica, coloboma, anomalías corneales. Las malformaciones osteoarticulares están presentes en la mitad de los casos. Son raras las malformaciones cardíacas, renales y cerebrales.(25)

El grado de retraso mental es muy variable, el 25% tienen un IQ de 30, el 25% de los pacientes tienen un IQ entre 30 y 50, el otro 25% entre 50 y 70 y el otro 25% arriba de 70.(27, 38) El comportamiento psicótico es frecuentemente observado, con alteraciones en el lenguaje con voz ronca, hay crisis convulsivas. (25, 29)En el 10% de los casos los pacientes fallecen en la infancia durante los primeros meses de vida. De otra manera la expectativa de vida parece ser normal.(25, 29)

En el 80% de los casos la delección ocurre de novo. El punto de ruptura frecuentemente se localiza en 18q21. En el 10% de los casos la delección se encuentra en mosaico. En el 10% la delección resulta de una inversión pericéntrica o de una translocación balanceada presente en alguno de los padres.(25, 29)

1.8.1.4- ANILLO DEL CROMOSOMA 18 (r18)

Descrito en 1962, comparte datos con el síndrome de 18p- y 18q-. Hay una relación de 3 mujeres por 2 hombres.(25)Tienen talla baja, la microcefalia se observa en 60% de los casos. Las dismorfias faciales pueden evocar al síndrome de 18q- por la depresión mediofacial y por la boca de carpa. Hay hipertelorismo y epicanto bilateral en 50% de los casos. El 30% de los casos tienen malformaciones oculares tales como estrabismo, ptosis, coloboma, anomalías en el fondo de ojo y nistagmus.(25)

Los pabellones auriculares están plegados, el paladar alto y arqueado o hendido en 50% de los casos. La presentación de anomalías como el cuello alado, corto y tórax ancho pueden semejar al síndrome de Turner. Se ha observado micromelia, clinodactilia del quinto dedo e implantación desordenada de los ortejos.En 20% de los casos los genitales externos son anormales. Se han reportado malformaciones como cebocefalia con arrinencefalia en el 7% de los casos y microftalmia en el 2% de los casos. El retraso mental es una constante de intermedio a severo, entre lo observado en los síndromes de 18q- y 18p-. La expectativa de vida es normal.(25)En casi todos los casos el anillo del cromosoma 18 ocurre de novo, en un caso la anomalía fue transmitida de una madre a su hijo. Hay 10% de casos en mosaico.(25)

1.8.1.5 SÍNDROME POR ISOCROMOSOMA DEL BRAZO CORTO i(18)(p)

Descrito en 1963, la mayoría de los casos son *de novo*, con pocos casos reportados no mosaicos, que tienen sobrevivida no mayor a dos años. Con una incidencia de 1 en 140,000.(30) Resulta en una tetrasomía de 18p; la cual se expresa como retraso mental de moderado a grave, retraso en el lenguaje, pobre o nula capacidad de alimentarse por sí mismos, retraso en la deambulación, microcefalia y cardiopatías congénitas.(30)

Tienen cara ovalada, implantación baja y/o malformación de pabellones auriculares, cejas altas, fisuras palpebrales cortas y desviadas hacia arriba, estrabismo, nariz pequeña, filtrum largo, sobrelapamiento del centro del labio superior con el labio inferior, boca pequeña.(30)En 5 pacientes encontraron talla baja, microcefalia, talla en la P3 o por debajo, el resto de los pacientes se encontraron en la P10 o por debajo de ella y el perímetro cefálico estaba en la P3 o inferior a ella en 7 de los pacientes. Tanto el retraso en el desarrollo moderado y la espasticidad de las extremidades estuvo presente en la totalidad de los pacientes. En 5 pacientes se encontraron crisis convulsivas.(30)

1.8.1.5 ISOCROMOSOMA DEL BRAZO LARGO DEL CROMOSOMA i(18)(q)

Se han reportado como un síndrome de Edwards. Las características morfológicas son muy variables y tienden a sobrelaparse con las del síndrome 18p- , las de la T18 o con las de la monosomía 18p.(32)Se han descrito pacientes con holoprosencefalia, cebocefalia y la ciclopia; la mayoría de estos hallazgos se han reportado en fetos. En algunos casos de esta alteración que han tenido una sobrevida mayor se encontraron cariotipos en mosaico con una línea normal.(32)

Se diagnóstica como síndrome de Edwards por la triplicación completa del brazo q; pero la triplicación de varios segmentos de ese brazo no producen el mismo fenotipo. Por ejemplo, el síndrome de Edwards parcial debido a la trisomía del tercio distal hasta el tercio medio del brazo largo tiene una sobrevida mayor y retraso mental menos profundo y tiene una amplia variedad de fenotipos que van desde dismorfias faciales leves hasta malformaciones orgánicas graves.(32)

En la presente tesis se realizó un estudio estadístico acerca de las anomalías numéricas y estructurales del cromosoma 18 que se diagnosticaron citogenéticamente por técnica de bandas GTG en pacientes atendidos en nuestra Institución cuyo cariotipo fue realizado en laboratorio de Citogenética del Departamento de Genética del Hospital Infantil de México Federico Gómez durante el periodo de 1998 al 2008. Los casos identificados fueron analizados para seleccionar aquellos que pudieran beneficiarse de estudios especializados de citogenética molecular para brindar un asesoramiento genético y atención multidisciplinaria que pudieran ameritar estos pacientes. Se identificaron dos casos clínicos de pacientes con alteraciones estructurales del cromosoma 18, en ambos casos se realizó estudio de citogenética molecular y se ofreció asesoramiento genético.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con fundamento en la observación de la alta frecuencia de pacientes que acuden a nuestra Institución que requieren evaluación con cariotipo con bandas GTG y en particular en relación a la alta frecuencia de alteraciones tanto estructurales como numéricas del cromosoma 18 reportadas en nuestra población de atención, nos planteamos determinar cual es la frecuencia y que tipo alteraciones del cromosoma 18 que se han reportado en nuestra población en los últimos 11 años y con base en este análisis poder identificar aquellos casos que podrían beneficiarse de los estudios de citogenética molecular para otorgar un asesoramiento genético.

3. JUSTIFICACIÓN

El HIMFG es un centro asistencial y de referencia de tercer nivel en donde se atienden a pacientes provenientes de todo el país y principalmente de la región central y sur. Una parte importante de la atención asistencial corresponde a pacientes con criterios clínicos para realizar evaluación citogenética, ya sea por presentar características clínicas de síndromes cromosómicos bien establecidos (como el caso de la T18), malformaciones congénitas múltiples no habituales o retraso mental. Entre las alteraciones detectadas en los resultados de estudios realizados a nuestros pacientes ha llamado la atención la presencia de alteraciones del cromosoma 18. Se ha considerado que el conocer la incidencia de alteraciones de este cromosoma y los síndromes clínicos o alteraciones morfológicas o del desarrollo asociados, nos permitirá establecer la frecuencia de alteraciones en la población que atendemos, lo que a su vez permitirá identificar las necesidades y oportunidades que se tienen para poder mejorar la atención y el asesoramiento genético de los pacientes.

Los análisis realizados en nuestros pacientes durante el periodo en estudio (1998-2008) fueron llevados al cabo principalmente con técnica de bandas GTG y dado el avance en años recientes de técnicas de citogenética molecular como FISH o CGH, se consideró que algunos de los casos identificados podrían beneficiarse del empleo de estos estudios para su diagnóstico y asesoramiento genético.

4. OBJETIVO GENERAL

- Identificar las alteraciones reportadas del cromosoma 18 en los estudios realizados a pacientes por cariotipo con bandas GTG en el laboratorio de citogenética del Departamento de Genética del HIMFG en los años de 1998 a 2008.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar y clasificar el tipo de alteraciones numéricas y estructurales del cromosoma 18 reportadas durante el periodo mencionado.
- Determinar la frecuencia de las alteraciones identificadas.
- Comparar nuestros datos con lo reportado en la literatura y establecer similitudes y diferencias con respecto a nuestra población.
- Identificar y analizar casos cuyo diagnóstico y asesoramiento genético pudiesen beneficiarse de los avances de técnicas de citogenética y moleculares.
- Aplicar técnicas citogenéticas moleculares en algunos de los casos identificados para caracterizarlos y poder brindar un asesoramiento adecuado.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Se trata de un estudio descriptivo, retrospectivo, observacional.

5.1 DESCRIPCIÓN DE LA METODOLOGÍA.

El análisis presentado en esta tesis se realizó en tres etapas:

- 1.- Identificación y análisis de los resultados reportados con alteración del cromosoma 18 de 1998 al 2008 en el Departamento de Genética del HIMFG.
- 2.- Identificación de casos que podrían beneficiarse de la realización de estudios por citogenética o biología molecular tales como FISH, CGH u otros.
3. Aplicación de técnicas de citogenética molecular en dos de los casos identificados

La fuente de obtención de datos de fórmulas cromosómicas fueron las libretas de reporte de resultados de cariotipo del laboratorio de Citogenética del Departamento de Genética de los años 1998 a 2008. Con el reporte cromosómico que establecía alteración numérica o estructural del cromosoma 18 se procedió a revisar el expediente clínico correspondiente para establecer cuales podrían beneficiarse de estudios citogenéticos y moleculares complementarios, según las características particulares del paciente y la factibilidad de realizarlos. Los datos reportados fueron derivados de los estudios realizados en diferentes momentos del periodo analizado por las citogenetistas Biol. Elda Lucía González Rivera, QFB. Ana Yolotl Aparicio Onofre y QC Judith Villa.

5.2 CRITERIOS DE INCLUSION

5.2.1 PRIMERA FASE DEL ESTUDIO. ANÁLISIS DE CASOS CON ALTERACIÓN DEL CROMOSOMA 18 DE 1998-2008.

- Reporte de cariotipo con bandas GTG (y ocasionalmente bandas C y alta resolución) que identificara alteración numérica o estructural del cromosoma 18.
- Reporte de cariotipo registrado entre 1998 y 2008.
- Reporte de cariotipo legible y sin ambigüedad en su nomenclatura.

5.2.2 SEGUNDA FASE DEL ESTUDIO. ANÁLISIS DE CASOS CLINICOS CON ALTERACION DEL CROMOSOMA 18 QUE PUEDAN BENEFICIARSE DE OTROS ESTUDIOS CITOGENÉTICOS.

- Expediente clínico disponible para revisión del caso.
- Pacientes con alteración numérica o estructural del cromosoma 18 cuyo análisis se pudiese complementar con FISH, CGH u otras técnicas de biología molecular.

5.2.3 TERCERA FASE DEL ESTUDIO. APLICACIÓN DE LOS ESTUDIOS MOLECULARES.

- De los casos identificados se incluyeron a aquellos pacientes que aceptaron la realización de los estudios con consentimiento informado.

Los casos identificados para realizar estudio molecular se incluyeron como una enmienda agregada en el protocolo HIM/2007/011 Ssa.738. “Determinación de puntos de ruptura por técnica de FISH en casos de rearrreglos cromosómicos complejos en 9 pacientes del Hospital Infantil de México Federico Gómez” cuyo investigador responsable es la Dra. Rosa Isela Ortiz de Luna, médico adscrito al Departamento de Genética del HIMFG y su análisis también contó con la autorización Institucional y del Comité de tesis.

5.3 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

5.3.1 Para la primera fase del estudio se consideraron los siguientes:

- Reporte de resultado de cariotipo no concluyente.
- Reporte de resultado no legible.

5.3.2 Para la segunda fase del estudio se consideraron los siguientes:

- Expediente incompleto o no disponible.
- Casos en que no se consideró factible la realización del estudio por ejemplo por no ofrecerse beneficio.

5.3.3 Para la tercera fase se consideró el siguiente:

- Pacientes que no aceptaran participar.

5.4 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

5.4.1 En la primera fase del estudio se consideró que el resultado registrado no tuviera una fórmula cromosómica concluyente.

5.4.2 En la segunda fase que el registro hospitalario del expediente del paciente no correspondiera al registro en la libreta de resultados y que no se contara con el expediente.

5.4.3 En lo referente a la tercera fase del estudio se eliminaría a aquellos pacientes cuya muestra no fuera adecuada, insuficiente para análisis o resultado no concluyente.

5.5 ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

5.5.1 Para la primera fase del estudio se realizó análisis estadístico descriptivo y en porcentajes.

De los reportes identificados con alteraciones incluyendo al cromosoma 18, se analizaron las fórmulas cromosómicas correspondientes y se clasificaron de acuerdo a la nomenclatura internacional como alteraciones numéricas o estructurales, trisomía, mosaico, deleción, translocación, etc. Los reportes cromosómicos fueron revisados conforme a la normatividad actual para reporte de fórmulas cromosómicas cuando fue necesario bajo la asesoría de la M. en C. Alicia Cervantes Peredo.

5.5.2 Para la segunda fase del estudio, se identificaron a los pacientes que pudieran beneficiarse del estudio citogenético molecular especializado, que estuviera disponible el expediente clínico y que continuaran asistiendo a nuestro Hospital y que posteriormente se estudiaron en detalle en la tercera fase.

5.5.3 Para la tercera fase del estudio, con consentimiento informado, aprobación institucional y del comité de tesis se analizaron en detalle dos de los casos identificados para realizar estudios por citogenética o biología molecular, se realizó técnica de FISH de acuerdo a las características específicas de cada caso. Se realizó la correlación cariotipo-fenotipo y se otorgó asesoramiento genético.

6. RESULTADOS

6.1 RESULTADOS DE LA PRIMERA FASE DEL ESTUDIO: REVISIÓN DE LA FRECUENCIA Y TIPO DE ALTERACIONES DEL CROMOSOMA 18.

Se analizaron las libretas de reporte de resultados de cariotipo con bandas GTG correspondientes al periodo de 1998 a 2008. De acuerdo con los criterios establecidos se identificaron un total de 37 reportes que incluían alteraciones del cromosoma 18 tanto numéricas como estructurales. Los reportes incluían a 35 pacientes y a 2 padres quienes eran portadores balanceados de una translocación involucrando al cromosoma 18. Sin embargo, considerando los criterios de exclusión, cuatro de los resultados de los pacientes no fueron concluyentes y por lo tanto fueron eliminados.

Los casos eliminados correspondieron a las siguientes fórmulas cromosómicas:

- 1) 46,XY,del(5)(p?),der(7)del(7)(p?)add(7)(q?),add(18)(p?).
- 2) 46,XX,add(18)(p?). Este caso fue eliminado ya que al realizarse FISH con sonda subtelomérica del brazo corto y brazo largo del cromosoma 18, el material adicional no correspondió a la alteración inicialmente considerada que involucraba al cromosoma 18.
- 3) 46,XX,+mar,-18.
- 4) 47,XX,+18. En este caso solo se analizaron 5 metafases.

De esta manera el análisis de los 11 años incluyó a un total de 33 casos (31 pacientes y 2 padres), sobre este número se realizó el análisis final (tabla 2).

TABLA 2. CLASIFICACIÓN DE LAS ALTERACIONES DEL CROMOSOMA 18 Y SUS PORCENTAJES.

Alteración	Casos totales	Porcentaje	M	F	Fórmula cromosómica
Trisomía libre	22	67%	6	16	47,XY,+18 ó 47,XX,+18
Delección p	1	3%	0	1	46,XX,del(18)(p?)
Delección q	3	9%	2	1	46,XY,del(18)(q?) 46,XY,del(18)(q21.1)[25] 46,XX,del(18)(q21)
Translocaciones	5	15%	1	4	45,XX,der(18)t(18;21)(p11.2;q11.2) 46,XX,t(10;18)(q22;q21) 46,XX,der(18)t(11;18)(q?;q?)mat,21pstk+* 46,XX,t(11;18)(q23;q21),21pstk+ [25]** 46,XY,der(5)t(5;18)(p14;q12),-18,+mar***
Mosaico	2	6%	0	2	47,XX,+18[30]/47,XX,+mar[33]/46,XX[37] 47,XX,-18,+i(18)(p10),+i(18)(q10)[33]/45,X[17]
TOTAL	33	100%	9	24	

En la primera columna se especifica el tipo de alteración cromosómica. En la segunda columna se indica el número de casos que corresponden a cada tipo. En la tercera columna se indica el porcentaje que corresponde a cada una de las alteraciones. En la cuarta y quinta columna se especifica el número y género de los casos. La última columna especifica la fórmula cromosómica correspondiente. Se presenta un caso familiar estudiado en la tercera etapa de esta tesis (caso 1): fórmula cromosómica de la propósitus con síndrome por delección 18q (*) secundario a translocación materna (**). La última translocación registrada en la tabla (***) corresponde a una alteración desbalanceada y no puede descartarse aún que se trate de un derivado de la translocación del cromosoma 18 involucrado.

Se identificaron 22 casos con reporte de T18 libre, 16 de ellos de pacientes femeninos y 6 masculinos. Llamó la atención un caso que sí se incluyó en el análisis estadístico de la tabla 2 el cual correspondió a un paciente con características clínicas de síndrome de Edwards cuyo cariotipo en sangre al nacimiento demostró un complemento cromosómico correspondiente a una T18 libre (47,XY,+18). Este paciente ha estado en seguimiento por 6 años, debido a ésta situación de evolución inusual, se tomó nueva muestra en sangre la cual mostró un resultado 46,XY normal en 100 metafases. En este caso no se descarta que se pudiera tratar de un mosaico, pero no contamos con análisis cromosómico en otro tejido para corroborar o descartar esta situación. Una situación a considerar en nuestro paciente es que en los mosaicos al paso del tiempo tiende a disminuir la línea anormal aumentando la sobrevida y esto nos explicaría la evolución de este caso en particular.

Se identificaron cinco casos con translocaciones involucrando a los cromosomas 5, 10, 11 y 21, cuatro de ellos femeninos y un caso en un paciente masculino. Tres de los casos tuvieron delección 18q correspondiendo a dos individuos masculinos y un femenino. Dos de los reportes identificaron una alteración en mosaico, uno de ellos incluía a un isocromosoma del 18, ambos casos correspondieron a pacientes femeninos. Se identificó un caso con delección 18p en un paciente femenino.

6.2.- RESULTADOS DE LA SEGUNDA FASE DEL ESTUDIO.

De los 33 reportes de pacientes con cariotipo con alteración numérica o estructural del cromosoma 18, se identificaron por lo menos 8 casos factibles de beneficiarse de estudios citogenéticos moleculares, algunos de ellos estaban ya en revisión. Los 8 casos mencionados corresponden en su mayoría a alteraciones estructurales del tipo de delecciones del brazo largo del cromosoma 18, las translocaciones y mosaicos involucrando a este cromosoma. Para esta tesis se escogieron 2 de los casos para realizar estudios de citogenética molecular o complementarios de los mismos, basados en los criterios de inclusión y que además continuaban acudiendo al HIMFG para su manejo y seguimiento.

Los dos casos elegidos fueron estudiados de acuerdo al abordaje diagnóstico para descartar alteración cromosómica. De cada uno de los casos se realizó historia clínica genética con árbol genealógico, estudio de cariotipo con bandas GTG, estudio de FISH. El primer caso corresponde a una paciente con fenotipo de síndrome por delección 18q secundaria a una t(11;18) materna y el segundo corresponde a una paciente con alteración en mosaico que incluye líneas celulares con alteración numérica y estructural incluyendo isocromosomas para cada brazo del cromosoma 18, los cuales se describen a continuación.

6.2.1 CASO 1

Paciente femenino actualmente de 6 años de edad, producto de la primera y única gesta de pareja joven, no consanguínea, con edades al momento de la concepción de 25 años para ambos padres, sin antecedentes heredofamiliares de importancia para el padecimiento actual. (Fig.8)

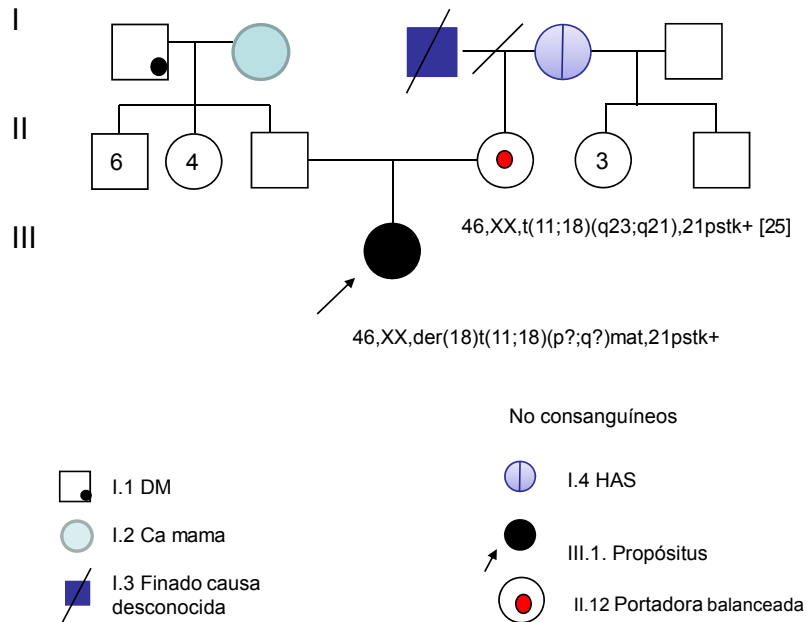


Figura 8. Árbol genealógico que consta de 3 generaciones en la que se observa la presencia de Diabetes Mellitus (DM), Cáncer de mama (Ca mama), Hipertensión arterial sistémica (HAS); así como las fórmulas cromosómicas tanto de la madre portadora como de la propósita.

Embarazo con control prenatal regular que cursó con hematoma retroplacentario en el 2do mes, el producto se obtuvo a término por cesárea secundaria a presentación pélvica, lloró y respiró al nacer, desconoce APGAR y talla, pesó 2800grs (P5), se desconoce el resto de la somatometría neonatal. Presenta retraso en el desarrollo psicomotor caracterizado por sostén cefálico a los 6m, sedestación a los 6m, bipedestación a los 10m, primeras palabras a los 3 años, aún no controla esfínteres y dice aproximadamente 10 palabras.

Fue valorada por primera vez en nuestro hospital a los 2 años y 11 meses por retraso psicomotor, talla y peso bajos para su edad. La exploración física en ese momento demostró braquicefalia, *telecantus*, implantación baja de pabellones auriculares, paladar alto, labio inferior prominente. Tórax y abdomen normales, limitación a la extensión de los dedos en manos (con excepción del pulgar), así como alteración de pliegues interdigitales.

En su última valoración (a los 6 años de edad), presentó buenas condiciones generales además de ser poco cooperadora, con frente amplia, perfil plano, epicanto y *telecantus*, fisuras palpebrales discretamente alargadas, hipoplasia malar, puente nasal deprimido, punta nasal bulbosa, filtrum corto, boca con tendencia a tener forma trapezoidal, labio superior delgado y proquelia de labio inferior, incompetencia labial, cuello corto y cilíndrico, tórax con teletelia, limitación a la extensión de dedos bilateral, estos son espatulados, pliegues palmares oblicuos, genitales femeninos y normales para su edad (Fig. 8). Dentro de su manejo institucional multidisciplinario, acude a los servicios de rehabilitación, foniatría y terapia de lenguaje, psicología y pediatría. Electroencefalograma realizado a los 3 años de edad, visión, perfil tiroideo y metabólico reportados como normales.(Fig. 9)



Figura 9.Fotografías clínicas de la propósita con secuencia de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo. 1.Fascies redonda, frente amplia, epicanto y *telecantus* con fisuras palpebrales discretamente alargadas, hipoplasia malar, puente nasal deprimido, punta nasal bulbosa, filtrum corto, boca con tendencia a ser trapezoidal, labio superior delgado y proquelia de labio inferior. 2. Perfil plano, pabellones auriculares con implantación baja y en retroposición. 3. Cuello corto y cilíndrico, tórax normolíneo con teletelia. 4. Manos con limitación a la extensión de 4to dedo bilateral, dedos espatulados. 5. Manos con pliegues palmares oblicuos.

6.2.2 RESULTADOS DE ANÁLISIS CROMOSÓMICO CON BANDAS GTG Y FISH DEL CASO 1 FAMILIAR.

En su primera consulta en base a los hallazgos físicos se consideró una cromosopatía del 18 y se solicitó cariotipo en sangre periférica. El cariotipo con bandas GTG fue reportado con la siguiente fórmula:

46,XX,del(18)(pter→q21:),21pstk+[25]

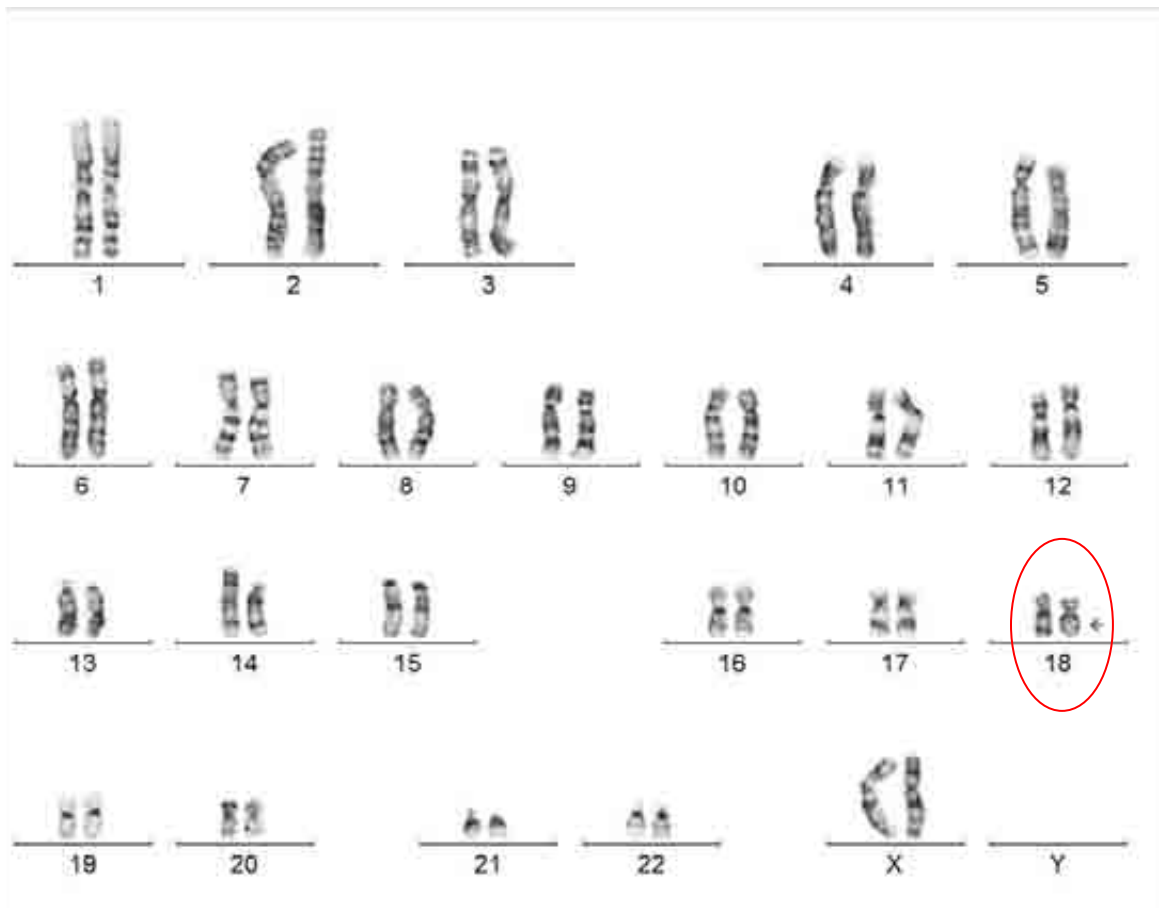


Figura 10. Cariotipo en sangre periférica con bandas GTG 46,XX,del(18)(pter→q21:),21pstk+[25] realizado por QFB. Ana Yolotl Aparicio Onofre.

Posteriormente se le solicitó cariotipo a los padres, el del padre fue **46,XY** masculino normal. En la madre se encontró la siguiente fórmula cromosómica:

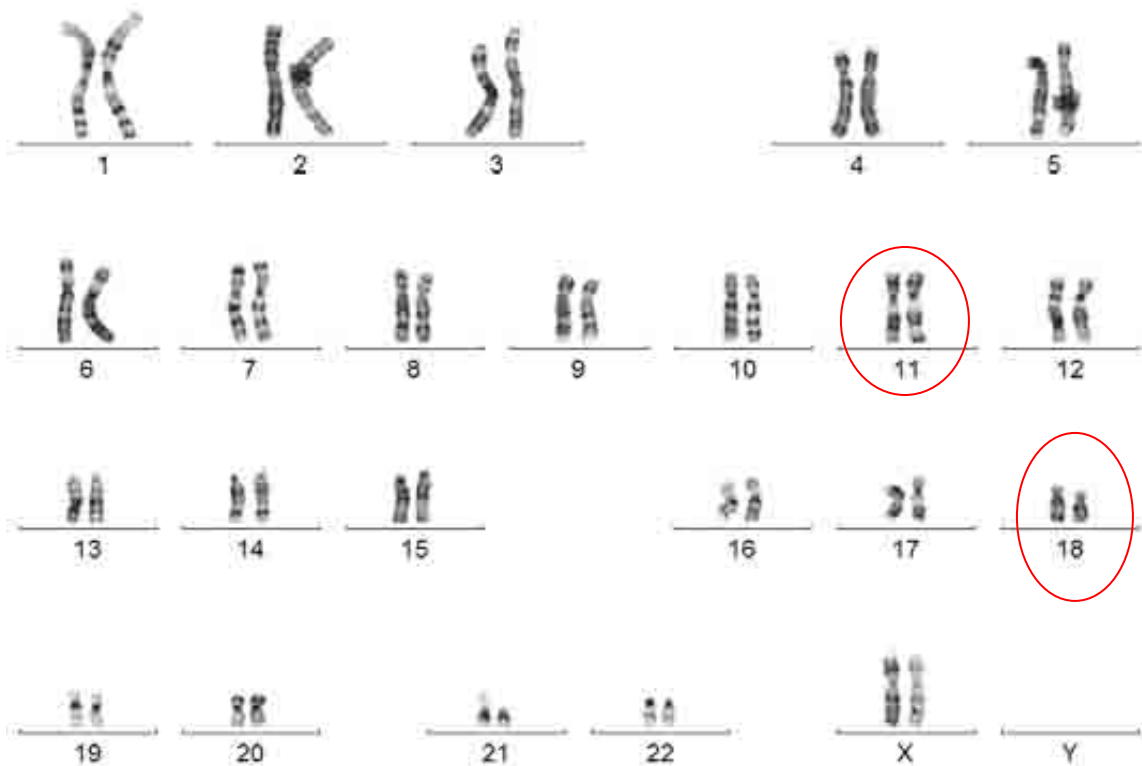


Figura 11. Cariotipo en sangre periférica con bandas GTG, 46,XX,t(11;18)(11pter→11q23::18q21→18qter;18pter→18q21::11q23→11qter) realizado por QFB. Ana Yolotl Aparicio Onofre.

46,XX,t(11;18)(11pter→11q23::18q21→18qter;18pter→18q21::11q23→11qter)(Fig. 11)

Con lo cual la formula cromosómica de la paciente se modifica a:

46,XX,der(18)t(11;18)(q23;q21)mat,21pstk+

Con lo anterior se estableció que la madre es portadora balanceada de una translocación t(11;18) y la paciente tiene un síndrome de deleción del brazo largo del cromosoma 18 proveniente de una segregación adyacente 1 por lo que debería tener también una trisomía parcial del cromosoma 11. Para confirmar las alteración cromosómicas, tanto de la deleción de 18q como la trisomía parcial de 11q, se realizó estudio de FISH tanto a la paciente como a la madre. Las sondas que se utilizaron para el análisis correspondieron a la sonda subtelomérica de 18q marcada con espectro naranja y número de catalogo 33-260018 (D18S1390) de Vysis, sonda para 18p marcada con

espectro verde 18p TelVysion espectro verde con número de catalogo 33-252018 (D18S552, GCB:229270) de Vysis y sonda LSI 11q MLL marcada con espectro naranja con número de catalogo 32-190083 (D11S349, D11S037, D11S485 and D11S1197) LSI11q23MLL de Vysis.

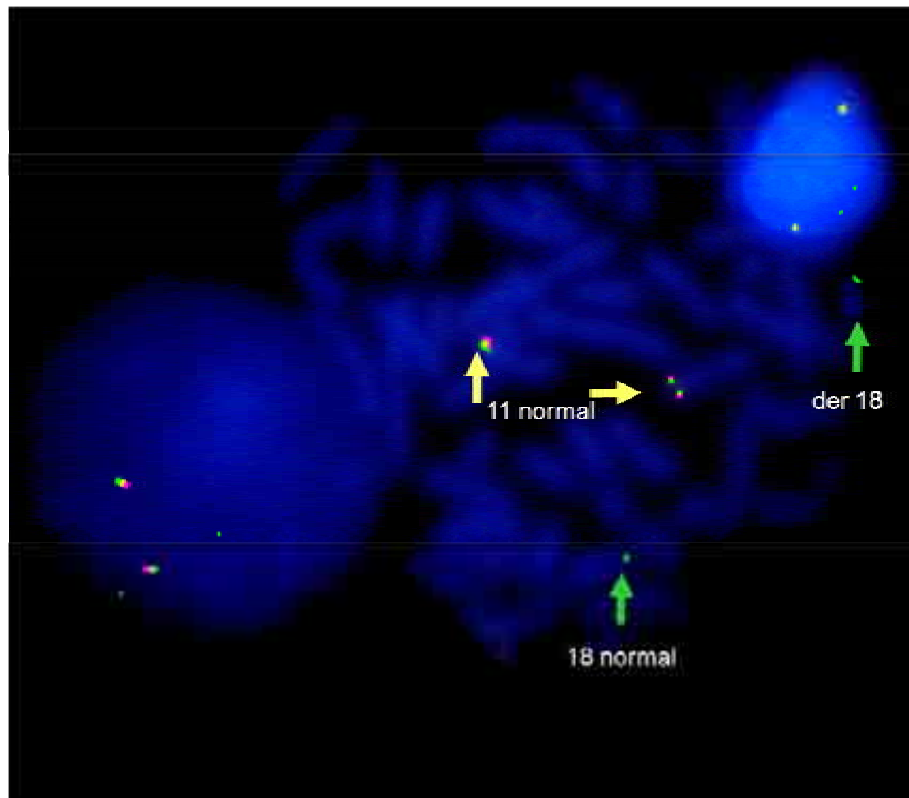


Figura 12. HIBRIDACION IN SITU FLUORESCENCIA (FISH) en metafase y núcleos de sangre periférica con sonda subtelomérica para 18q con espectro naranja, sonda subtelomérica para 18p con espectro verde y sonda de 11q23 con espectro naranja. Las flechas naranja señalan los cromosomas 11 y las verdes a los cromosomas 18.

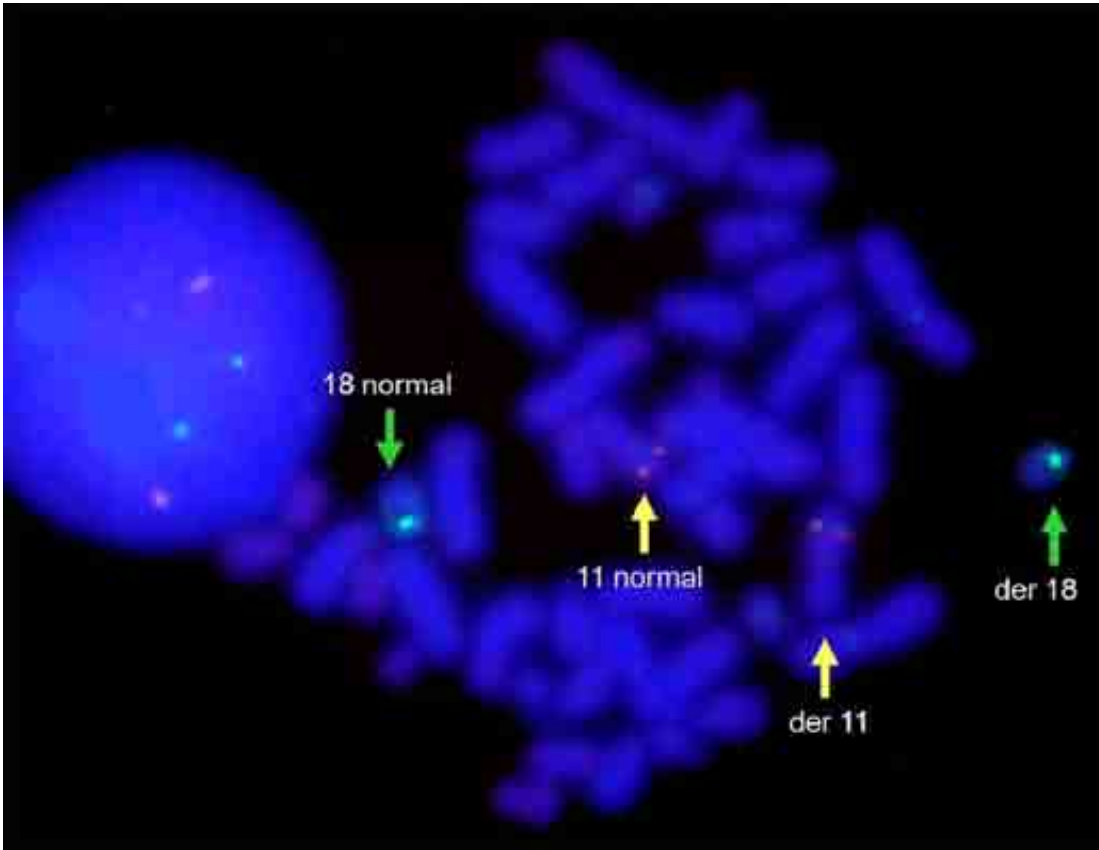


Fig
ura
13.
HIB
RID
ACI
ON
IN
SIT
U
FLU
OR
ESC
EN
CIA
(FIS
H)
en
me
taf
ase
y
núc
leo

s de sangre periférica de la madre del caso 1 con sondas LSI 11q23 espectro naranja y 18 pter en verde de Vysis. Se observan en la metafase un cromosoma 18 normal, un 11 normal y los derivados tanto del cromosoma 18 como del cromosoma 11. Con una fórmula: 46,XX,t(11;18)(q23;q22)[20].ish(t11;18)(LMM+;D18S552,GDB229270+)[20]

El resultado del estudio con FISH corroboró que la paciente tenía una deleción de 18q pero el sitio de ruptura no coincidió con el propuesto con bandas GTG ya que sí hubo hibridación de la sonda de la región 11q23 en el cromosoma 11 y no en el cromosoma 18 como se esperaba, lo que tiene implicaciones en los genes afectados en esta región.

6.2.3 DISCUSION DEL CASO 1.

Este caso corresponde a una paciente con delección 18q derivado de una t(11;18) materna de la cual la madre es portadora balanceada. Este caso también reportó información particular ya que se consideró inicialmente que los puntos de ruptura estaban en 18q21 y 11q21, sin embargo el análisis por FISH demostró que no fue así ya que se ocupó la sonda de copia única color naranja LSI11q23MLL(Vysis 32-190083) y como se observa en la Figura 12, al existir la translocación en este punto, la señal la veríamos en el derivativo 18, el cual se marcó con la sonda subteloamérica para brazo corto del 18 en verde (con numero de catalogo 32-252018 de la misma marca), por lo que se consideró que el punto de ruptura de la translocación pudiera ser más abajo en 11q23.

Con este resultado se orienta el diagnóstico de la paciente a una delección de 18q con una probable trisomía parcial de 11q derivada de una translocación materna t(11;18). La paciente fue referida para valoración por talla baja y retraso en el desarrollo psicomotor además de dismorfias. El síndrome de trisomía parcial de 11q23 ha sido descrito en muy pocos casos y tiene un fenotipo con microcefalia, dismorfias faciales, cardiopatía congénita y pueden tener alteraciones del diafragma y urogenitales. La mayoría de los casos son debidos a una translocación parental, tiene una relación 3:2; hombre: mujer, los productos son a término o prematuros y tienen retraso mental importante. La mayoría de los casos que se han reportados han fallecido en el periodo neonatal o antes del primer año de vida.(25)

En esta paciente debemos considerar que su fenotipo es resultado de la sumatoria de los efectos de las dos aberraciones cromosómicas que concurren en ella. Por una parte la paciente muestra la mayoría de los criterios para el síndrome 18q- como puede observarse en la tabla comparativa (Tabla 3). Por otra parte con el síndrome asociado a la trisomía parcial de 11q comparte datos menores como puede observarse en la misma tabla, considerándose que tiene un fenotipo modificado con más datos fenotípicos de del(18q).

La presentación del fenotipo del síndrome por del18q es más frecuente que la trisomía de 11q23. En este caso aún hace falta confirmar los puntos de ruptura, si como en el estudio de FISH suponemos que la regiones involucradas son 11q23 así como 18q22, habrá que considerar que posiblemente existen genes cuyo efecto en triple dosis o haploinsuficientes habrán alterado el desarrollo normal de la paciente (Fig. 9). De eso no hay duda el síndrome por delección 18q está bien definido clínicamente y parcialmente en forma molecular

Algunos de los genes que se localizan en 11q23 son *APOA1*, *APOC3*, *JBS*, *MLL*, *SDHD*, *CD3G*, *CD3E*, *TCPT*, *BRCA3*, *MTMR2*, *DRD2*, *FXYD2*, *G6PT1*, *GTS*, *HVEC*, *PORC*, *ZNF145*, *HMBS*, *ARHGEF12*, *SC5DL*, *KCNJ1*, *HJCD*, *GIF*, *FUCT1*. Los genes localizados en 18q21 son

ATP8B1, MALT1, MADH4, DCC, FECH, BCL2, CNSN, LMAN1, MC4R, TNFRSF11A y CYB5.(24, 33)

En cuanto a su manejo, es importante que la paciente continúe con sus valoraciones y tratamiento, además de considerar la posibilidad de realizar otros estudios más específicos como por ejemplo CGH para determinar la triple dosis o la haploinsuficiencia de las regiones involucradas. En cuanto al asesoramiento genético como se muestra en la figura 14, en la segregación meiótica de la translocación, podemos considerar los siguientes riesgos:

En relación a la segregación alterna, el riesgo de recurrencia para la pareja sería solamente de dos posibilidades: el 50% de productos fenotípicamente y cromosómicamente normales y el otro 50% serían portadores balanceados como la madre. Los productos de la segregación adyacente 1 serían cromosómica y fenotípicamente anormales porque serían monosomías o trisomías parciales; uno sería como el caso de la propósita quien tiene una monosomía parcial 18q y una trisomía parcial 11q y el otro producto tendría una trisomía parcial 18q y una monosomía de 11q.

Para los productos de la segregación adyacente 2 se considera que la supervivencia de los embriones sería difícil ya que presentarían tanto trisomías como monosomías casi completas; en la primera posibilidad, el producto tendría una trisomía casi completa del 11 y una monosomía casi completa del 18, el segundo producto tendría una trisomía casi completa del 18 y una monosomía casi completa del 11. Ambas situaciones son poco viables por tratarse de que ambos cromosomas involucrados son autosomas.

Del análisis de la segregación se tienen tres posibilidades: segregación alterna, adyacente 1 y adyacente 2, por ello los padres de esta paciente como pareja tendrían una posibilidad del 33% de tener hijos fenotípicamente normales, un riesgo del 33% de tener hijos fenotípica y genotípicamente anormales y 33% de productos no viables, lo cual podrían manifestarse como infertilidad o abortos de repetición. Teniendo en cuenta estas posibilidades la pareja podría beneficiarse del diagnóstico prenatal en futuros embarazos.

En cuanto a la vigilancia posterior tanto a la propósita como a la madre, si bien ambas son asintomáticas se ha reportado que la delección de 18q21 se ha presentado en casos de adenocarcinoma de colon.(24)

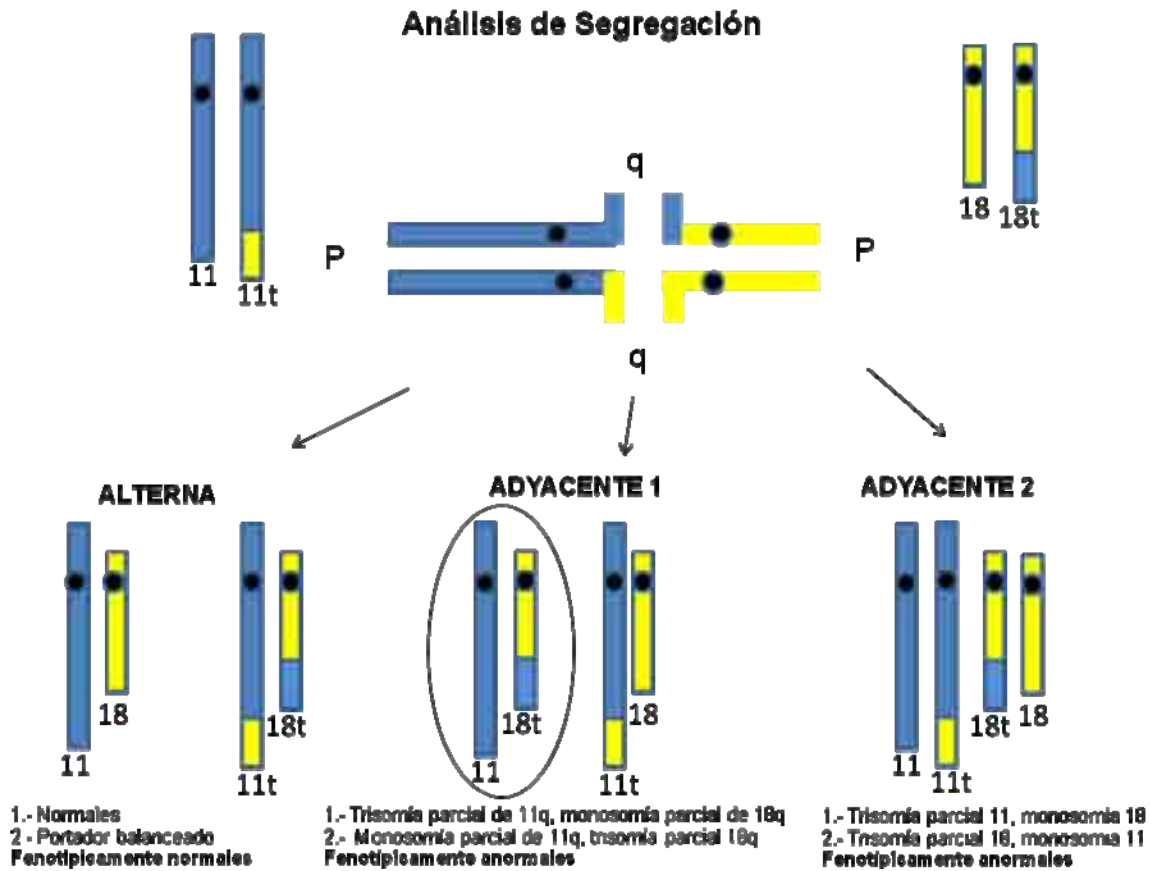


Figura 14. Se muestra el análisis de la segregación cromosómica de la translocación $t(11;18)$ en la que se observa que los productos de la segregación alterna son fenotípicamente normales. En la segregación adyacente 1 se obtienen productos fenotípicamente anormales, enmarcado con un círculo se observa la segregación que correspondería a la propórita; siendo una monosomía parcial del brazo largo del cromosoma 18 y una trisomía parcial del brazo largo del cromosoma 11. En la segregación Adyacente 2 se obtienen productos monosómicos y trisómicos que serían incompatibles con la vida.

6.2.2 CASO CLÍNICO 2

Se trata de paciente femenino de 10 años y 11 meses, producto de la primera gesta de pareja no consanguínea, con edades concepcionales de 17 años la materna y 45 años la paterna, padre con alcoholismo y múltiples toxicomanías. Madre con antecedente de ooforectomía hace 5 años, ignora indicación, G:IV, P: II, A: II, aparentemente sana. Sin antecedentes herofamiliares de importancia para el caso.(Fig. 15)

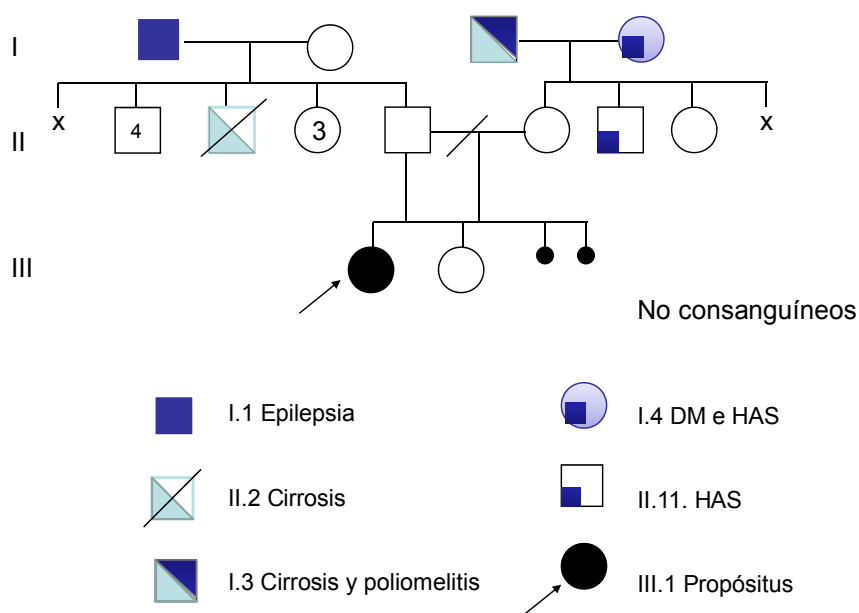


Figura 15. Arbol genealógico que consta de 3 generaciones en donde se observa por rama paterna un caso de epilepsia, un hermano finado por cirrosis. Por rama materna la presencia de cirrosis y poliomyelitis, así como Diabetes Mellitus (DM) e hipertensión arterial sistémica (HAS).

Embarazo con control prenatal regular con ingesta de multivitamínicos y otros medicamentos no especificados, cinco USG reportados normales, amenaza de parto prematuro secundario a traumatismo. El producto se obtuvo a término por parto eutócico, lloró y respiró al nacer, APGAR: 8/9, peso: 2,800gr (P5), desconoce talla. Al nacimiento se diagnosticó edema de vulva y displasia congénita de cadera bilateral. Cursó con cianosis perinatal, se ignoran datos. Desarrollo psicomotor normal, sedestación al año, bipedestación y deambulación al año y medio, cursa 4to año de primaria con regular aprovechamiento.

A los 7 años fue diagnosticada desviación medial de pierna izquierda que ameritó manejo quirúrgico en 3 ocasiones. Fue valorada por primera vez en nuestra Institución a los 8 años y 11 meses por probable Síndrome de Turner. La paciente regresó al hospital hasta los 10 años y 11 meses, en esa ocasión a la exploración física se encontró red venosa muy evidente y generalizada, talla de 122cm (P<5) y peso 27,300gr (P<5). Cráneo normocéfalo, implantación baja de cabello en región occipital, ojos simétricos con fisuras palpebrales ligeramente oblicuas hacia arriba, puente nasal normal, *filtrum* poco definido, paladar amplio, implantación baja de pabellones auriculares: el derecho con presencia de tubérculo de Darwin, cuello cilíndrico. Tórax normolíneo, con nódulo mamario palpable bilateral, cardiopulmonar sin compromiso, abdomen con presencia de mancha café con leche extensa de aproximadamente 5 cm de diámetro, extremidades superiores integras con *cubitus valgus* bilateral, manos con acortamiento de 4to y 5to metacarpianos, presencia de verruga vulgar en el dorso de la mano izquierda. Las extremidades inferiores con tibias varas, con presencia de cicatriz quirúrgica en pierna izquierda tanto en región proximal como distal, *hallux valgus* bilateral y braquidactilia del 3ero, 4to y 5to orjejos bilateral, genitales femeninos y acorde para su edad. Fig. 16.



Figura 16. Fotografías clínicas de la propósitos donde se observa red venosa notable, tórax normolíneo, mancha café con leche en flanco derecho, cubitus valgus bilateral. En la fotografía de la derecha se aprecia implantación baja de la línea posterior de cabello, implantación baja de pabellones auriculares, presencia de tubérculo de Darwin.

La paciente ha sido valorada por lo servicios de cardiología (sin alteraciones cardíacas) y de endocrinología, tiene indicado (sin iniciar) tratamiento con hormona del crecimiento (1U/kg/día). El USG pélvico fue normal, se le realizó crioterapia para verrugas vulgares. Desde su primera consulta se le solicitó estudio de cariotipo en sangre periférica con bandas GTG en donde se encontró el siguiente complemento cromosómico:

47,XX,-18,i(18)(q10),+i(18)(p10)[56]/45,X[44] (Fig. 17 y 18)

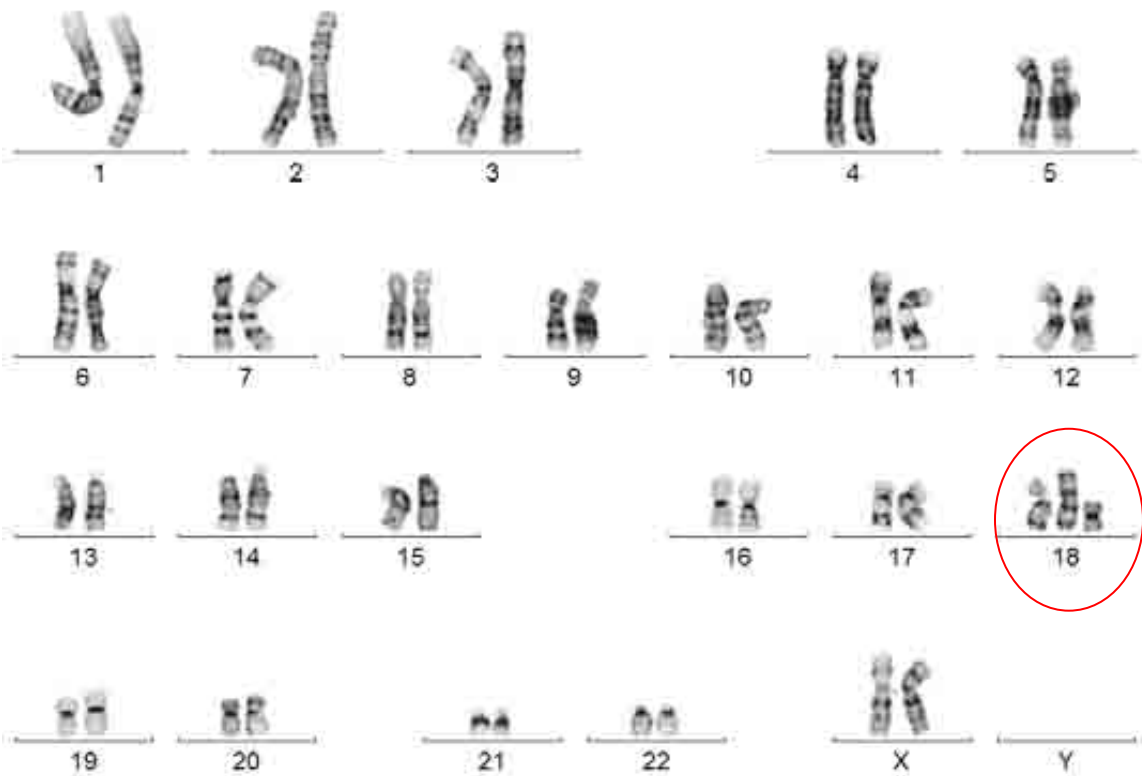


Figura 17. Metafase con complemento: 47,XX,-18,i(18)(q10),+i(18)(p10)[56] en donde se señalan los isocromosomas del cromosoma 18. Realizado por QFB. Ana Yolotl Aparicio.

Posteriormente se le solicitó cariotipo a la madre, quien tuvo un complemento 46,XX femenino normal, no fue posible realizar estudio al padre.

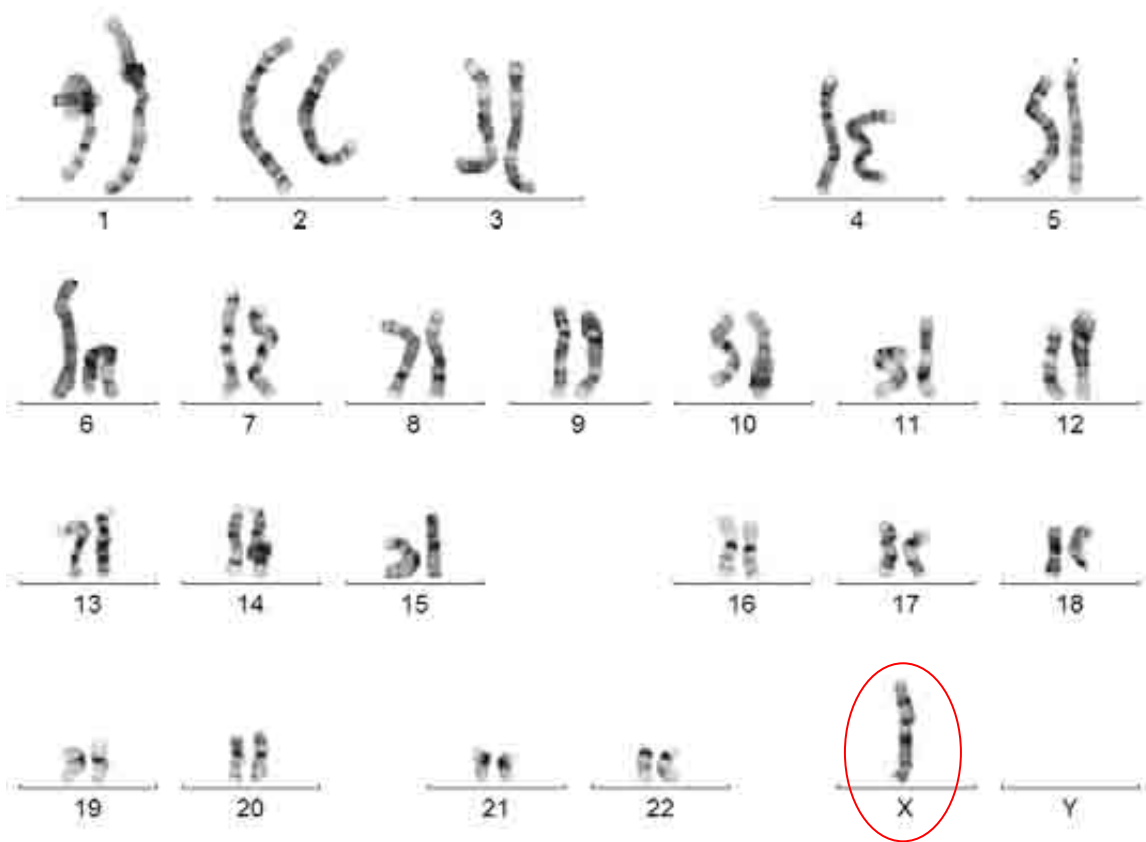


Figura 18. Metafase con complemento: 45,X[44]. Se señala la monosomía del cromosoma X. Realizado por QFB. Ana Yolotl Aparicio Onofre.

Se realizó estudio de FISH con sonda para región subtelo mérica tanto del brazo corto como del brazo largo del cromosoma 18 para corroborar la presencia de los isocromosomas tanto en sangre periférica (Fig. 19) como en fibroblastos de piel (Fig. 20). Las sondas utilizadas fueron la sonda de copia única dual color (Vysis 32-190083) para el brazo largo del 18 y la sonda sonda subtelo mérica para brazo corto del 18 en verde (con número de catalogo 32-252018 de la misma casa).

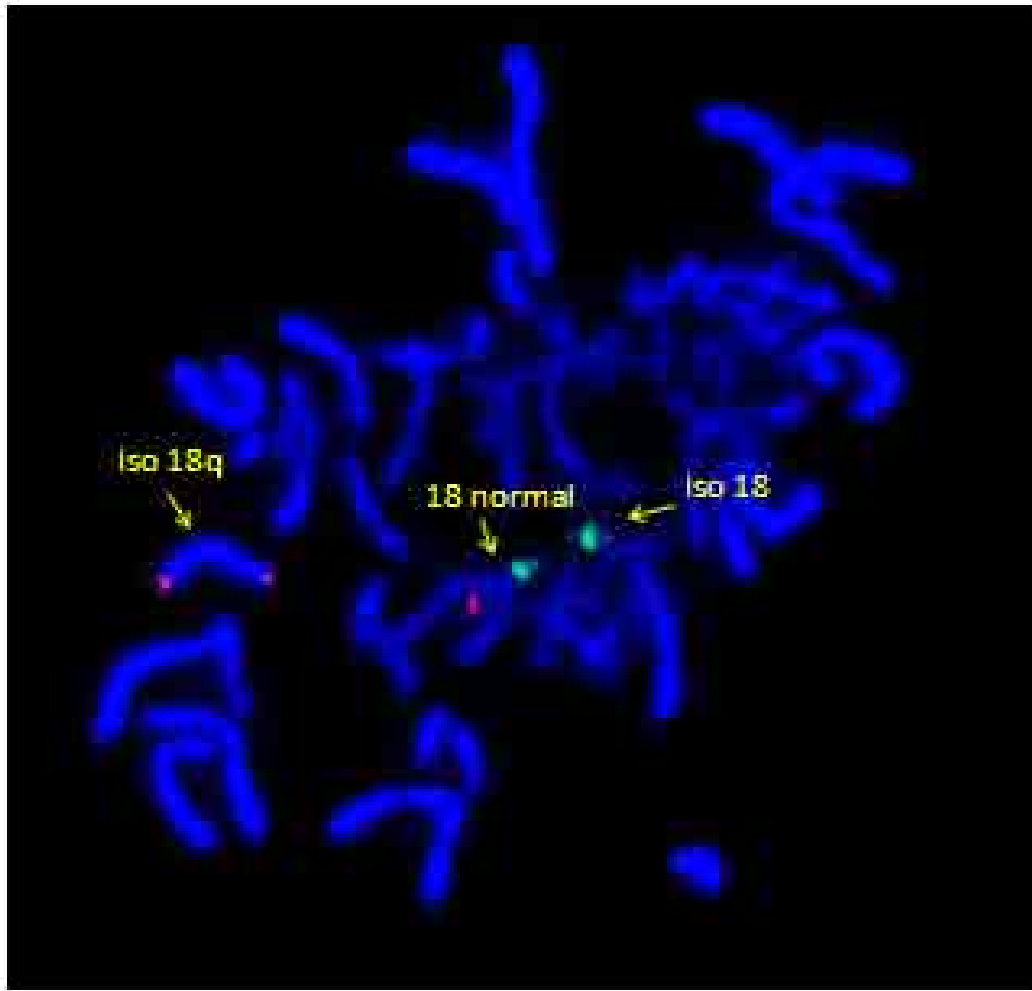


Figura 19. HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE (FISH) para 18p y 18q utilizando las sondas Television Vysis®. Television 18p señal verde, Television 18q señal naranja. Se observa las dos señales en naranja para el isocromosoma 18q, las dos señales verdes en el isocromosoma 18p y ambas señales en el cromosoma 18 normal.

El análisis con estas sondas corroboró que la paciente tenía el mosaico en ambos tejidos analizados y que además presenta una proporción inversa en las líneas celulares; siendo la línea 45,X la más abundante en fibroblastos mientras que en sangre periférica la línea celular más frecuente correspondió a los isocromosomas del 18. El número de metafases encontradas en sangre periférica con los isocromosomas fue de 56 y en fibroblastos se encontró de 37. La línea 45,X se encontró en 44 metafases en sangre periférica y en fibroblastos de 63.

Los isocromosomas fueron identificados por la hibridación de ambas sondas en las regiones subtelo méricas correspondientes tanto al brazo corto como al brazo largo del

cromosoma 18 (Fig. 19). Demostrando los siguientes complementos cromosómicos en ambos tejidos:

47,XX,+i(18)(p10),i(18)(q10)[37]/45,X[63].ish(X)(DXZ1+).ishtel(18)(D18S552,GDB.229270+)(D18S1390+)

Para corroborar que los centrómeros presentes en los isocromosomas del 18 correspondieran al mismo, se realizó estudio de FISH con sonda centrómerica del 18 y el resultado fue confirmatorio para esta región en los isocromosomas. Llamó la atención que en algunas de las metafases analizadas se observaron diferencias de intensidad de la sonda centromérica entre los cromosomas 18 normales y los isocromosomas, por lo que se realizarán más estudios confirmatorios.

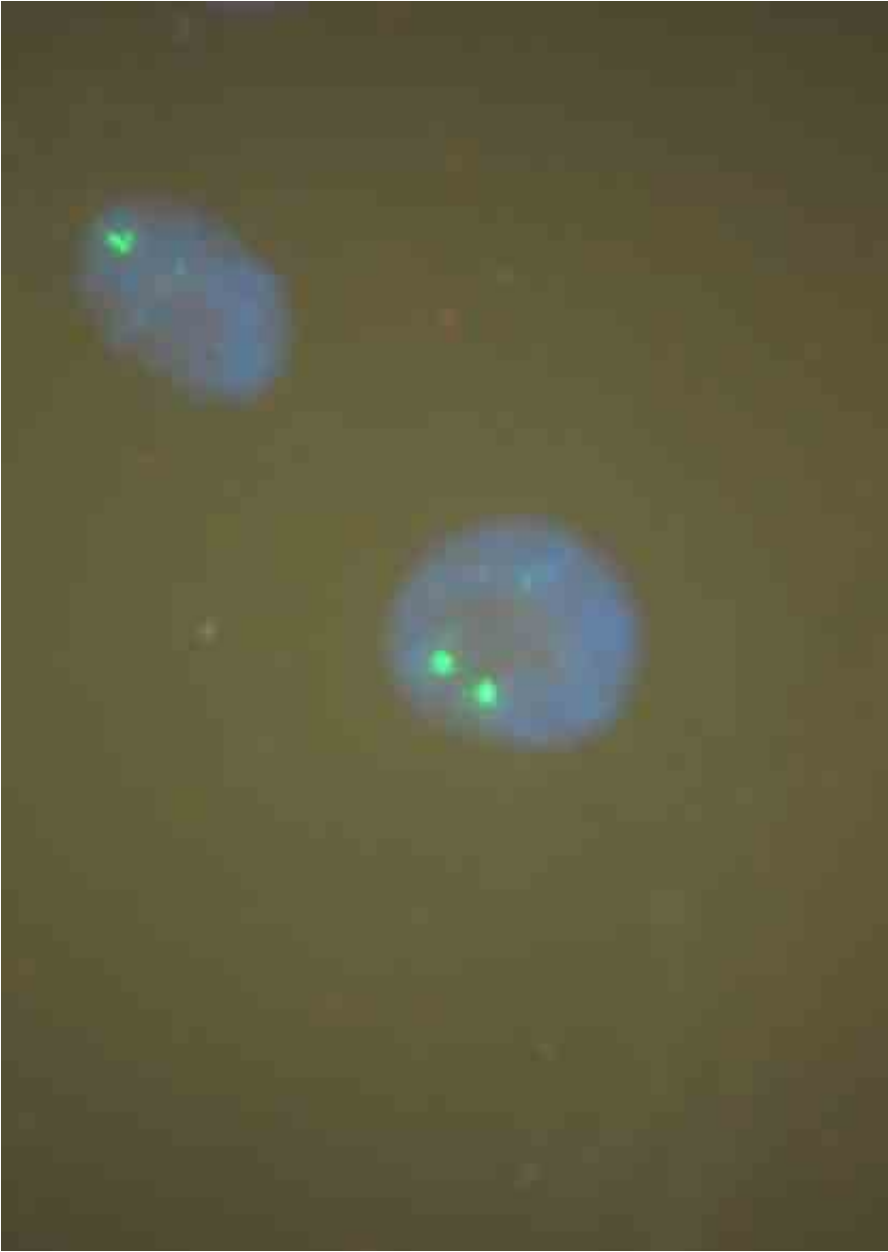


Figura 20. HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE (FISH) con sonda en fibroblastos de piel en núcleos interfásicos utilizando la sonda DXZ1 de Vysis en color verde para los centrómeros del cromosoma X. En uno de los núcleos se observa la presencia de ambas señales correspondientes al cromosoma X y en el otro se observan 3 señales correspondientes a ruido de fondo o hibridación cruzada.

6.2.2.1 DISCUSIÓN DEL CASO 2

La paciente es un mosaico para una línea celular con 47 cromosomas que tiene los isocromosomas de 18q, 18p, un cromosoma 18 normal y la otra línea con monosomía del cromosoma X, que no presenta los isocromosomas del 18. Fenotípicamente presenta características de síndrome de Turner, lo que está relacionado con la línea 45,X presente en ambos tejidos analizados y cuya proporción es mayor en fibroblastos que en linfocitos, en ambos tejidos se determinó la presencia de ambos isocromosomas del 18.

En la literatura la asociación de una alteración cromosómica estructural con una numérica es poco frecuente y ocurre lo mismo para los casos de isocromosomas tanto de 18p como de 18q.(30) Una posibilidad a considerar con esta paciente sería contemplar que la presencia de las dos líneas celulares fuera la manifestación de una quimera; la cual se produce al fusionarse dos cigotos diferentes y forman un sólo embrión, generalmente esta alteración se detecta en casos de ambigüedad genital debido a la presencia de complementos cromosómicos masculino y femenino, puede encontrarse hasta en el 13% de los casos de pacientes con hermafroditismo verdadero, ya que cuando los cigotos son del mismo complemento de género difícilmente acuden a una valoración clínica.(33)

En relación a la alteración estructural algunas de las condiciones que se han asociado a la presencia de isocromosoma 18p es la edad paterna avanzada y el que hayan sido heredados de uno de los progenitores como una isodisomía uniparental(21); esta situación se ha descrito principalmente derivada de la madre. Si bien esta consideración es importante, no contamos con el cariotipo del padre y por lo tanto no podemos confirmar o descartar esta situación, sin embargo la edad paterna en este caso fue de 45 años al momento de la concepción, considerando que la edad avanzada de los progenitores es uno de los factores de riesgo asociados a cromosopatía, si bien el cariotipo de la madre fue normal para descartar esta situación por completo tendría que realizarse microsatélites para demostrar el origen parental. Una posibilidad más es que se trate de un alteración *de novo* la cual también ha sido descrita.(32)

En relación al fenotipo del isocromosoma del 18, en nuestra paciente el fenotipo no corresponde en su totalidad con lo reportado para esta alteración citogenética la que principalmente cursa con microcefalia, dismorfias faciales, cardiopatía congénita, escoliosis y alteraciones digitales principalmente camptodactilia, así como talla baja e implantación baja de pabellones auriculares, ya que nuestra paciente cursa con una

trisomía 18. Si bien tiene algunos de los datos, debemos considerar que el fenotipo de nuestra paciente está modificado también por la presencia de la línea 45,X.(30)

En los casos de isocromsoma de 18q; el fenotipo se ha orientado más hacia el síndrome de Edwards y con el síndrome de 18p- lo que no concuerda con el fenotipo de nuestra paciente. Además de que en estos pacientes se han reportado malformaciones del sistema nervioso central tales como holoprosencefalia, cebocefalia, etc. Situación que no está presente en nuestra paciente probablemente por la diferente proporción de las dos líneas celulares encontrada en los tejidos analizados.

La supervivencia de los isocromosomas del 18 o de los pacientes con esta anomalía está en relación a sí coexiste con otra línea celular como sucede con nuestra paciente y hasta donde sabemos solo hay un caso reportado en la literatura con la presencia conjunta de ambos isocromosomas diagnosticado prenatalmente (32) con múltiples malformaciones. Mckinlay y Sutherland mencionan que uno de los principales cromosomas con isocromosomas es el 18 y que en ocasiones cuando ocurre una fusión telomérica o subtelomérica todo el material genético funcional necesario está presente y correcto y que en ocasiones cuando hay la presencia de un cromosoma compuesto con dos centrómeros; uno de ellos se inactiva funcionalmente (21), tal vez modificando la severidad de los fenotipos.

7. DISCUSIÓN

La presente tesis tuvo como objetivo principal identificar las alteraciones reportadas del cromosoma 18 en los estudios realizados a pacientes con cariotipo con bandas GTG en el Laboratorio de Citogenética del Departamento de Genética del HIMFG en los años de 1998 a 2008. Durante el análisis de los reportes de laboratorio fue posible establecer que durante este periodo de tiempo que comprende 11 años, hubo 37 casos reportados con alteraciones del cromosoma 18. De estos, 35 correspondieron a pacientes en quienes hubo indicación clínica para descartar el diagnóstico de sospecha de cromosomopatía, fuese ésta o no del cromosoma 18 y 2 estudios correspondieron a padres en quienes se debió descartar el diagnóstico de portador de un rearreglo balanceado del cromosoma 18. Cuatro casos fueron descartados por no tener un cariotipo concluyente por lo que el análisis final incluyó solamente 33 casos.

La frecuencia global de alteraciones cromosómicas se calcula en 1:625 en población general (17), en relación a alteraciones del cromosoma 18 se conoce que la más frecuente es la T18 con una incidencia de 1:3000 a 8000 RNV.(34) En cuanto a las alteraciones estructurales, dependiendo de la alteración los casos en general son poco frecuentes, por ejemplo la del(18q) tiene una frecuencia de 1:100,000.(25) En la presente revisión se determinó que de 6334 estudios de cariotipo realizados con bandas GTG llevados a cabo en un periodo de 11 años, 33 correspondieron a alteraciones del cromosoma 18, lo que nos da un porcentaje de 0.49% del total de resultados registrados. Es importante señalar que el número de estudios de cariotipo no es igual al número de pacientes atendidos, ya que por diversas circunstancias se puede tener más de un estudio para un paciente. Esta incidencia es similar a la reportada en dos estudios de revisión, uno realizado en Polonia y otro en los Estados Unidos de América, sin embargo, las cifras no son totalmente comparables ya que estos estudios incluyen los resultados de diagnóstico prenatal, situación que no atendemos en nuestra Institución.(26, 35)

Además de lo anterior, debemos considerar que nuestra Institución es un Hospital de referencia, por ser uno de los principales centros de atención pediátrica de tercer nivel en nuestro país y recibe pacientes de todo el territorio nacional, que acuden tanto directamente solicitando asistencia como referidos por médicos. El promedio de la consulta anual del Departamento de Genética se ha mantenido en los últimos tres años cercano a las 4600 consultas anuales. Por estas razones no puede considerarse que las cifras representadas aquí sean el equivalente a la frecuencia de alteraciones en población mexicana si no únicamente el reflejo de la frecuencia de estas alteraciones en pacientes atendidos en el HIMFG por el departamento de Genética. En relación a esta situación, 2 de los pacientes con diagnóstico de T18 no fueron revisados clínicamente en el HIMFG, ya que fueron referidos por unidades externas, solicitándose solamente el estudio cromosómico.

De los 33 casos identificados con alteración, la mayor frecuencia se encontró en los casos con alteraciones numéricas con 22 casos correspondiendo a T18, seguidos por las alteraciones estructurales, en orden de frecuencia fueron translocaciones (5 casos), encontrándose 3 resultados no balanceadas que correspondieron a pacientes y 2 balanceadas de padres portadores. Uno de los casos se encontró que fue secundario a una translocación materna y es el caso familiar que se analizó en la presente tesis. Se encontraron 3 casos de delección 18q; dos de ellos reportándose con el mismo punto de ruptura y en el otro caso no se registró el punto de ruptura. Se encontraron 2 casos de mosaïcismo (uno de ellos correspondió al segundo caso discutido en esta tesis) y un caso de delección del brazo corto; así como 4 casos en los que no se pudo determinar la alteración citogenética. No se encontraron reportes en relación a otras alteraciones tales como cromosomas en anillo, duplicaciones o inversiones del cromosoma 18.

Lo anterior coincide con la literatura en el sentido de que la más frecuente es la alteración numérica para síndrome de Edwards, producto de no disyunción del cromosoma 18. Esta trisomía es más frecuente en mujeres (35), los demás casos que se refieren a alteración estructural son semejantes ya que en la literatura se describen como poco frecuentes.(25)

En relación a la frecuencia anual de los casos, los años 2000 y 2003 registraron un solo caso con alteración del cromosoma 18, en 2004 no hay ningún registro, siendo 2005 el año con mayor registro con 8 casos, seguido por 2001 y 2007 con 6 casos y 2006 con 5 casos. El promedio de casos anual fue de 3.3%. La razón por la que no se encontraron otras alteraciones del cromosoma 18 puede ser por el tiempo de la muestra (11 años) y no se descarta que haya otras alteraciones estructurales en otros años, que sean reportadas con baja frecuencia o que no sean compatibles con la vida por lo que no vemos estos pacientes (además de no hacer diagnóstico prenatal).

De los casos con alteración estructural, es importante subrayar que por lo menos dos de ellos estaban relacionados con padres portadores balanceados de una translocación que fue caracterizada o identificada secundariamente a una alteración no balanceada en los pacientes, por lo que se ofreció el estudio para otorgar asesoramiento genético. Uno de ellos fue la madre con t(11;18) del caso 1 discutido en esta tesis. Del segundo caso es importante señalar que se trata de una translocación t(5;18) en un padre portador balanceado diagnosticado al ofrecerse este estudio para asesoramiento genético de un paciente con síndrome de Cri du chat por delección 5p. Esta situación resalta la importancia del estudio y abordaje de casos de pacientes con alteraciones cromosómicas, sean o no de síndromes clásicos para otorgar asesoramiento genético.

Finalmente y en relación al objetivo secundario de identificar casos con alteración del cromosoma 18 que pudiesen beneficiarse de estudios citogenéticos y moleculares, se identificaron 7 casos, de ellos, sólo se realizaron los estudios adicionales en 2 casos, uno de ellos una paciente con del(18q) y trisomía parcial de 11q, derivada de madre portadora con t(11;18) y el segundo un caso con dos líneas celulares, una con 47 cromosomas e isocromosomas de 18q y 18p y otra 45,X. Estos dos casos fueron presentados en la sección de resultados de esta tesis.

La trascendencia del objetivo planteado fue demostrado en el análisis de los casos discutidos y también en el caso del padre portador de la $t(5;18)$. Para estos pacientes y sus familias fue posible realizar estudios con técnicas citogenéticas y moleculares que permitieron integrar mejor el diagnóstico para poder dar un asesoramiento genético adecuado. Además se demostró que la complejidad de los 2 casos estudiados aún requiere de la aplicación de otras técnicas moleculares y citogenéticas para completarlos. En el caso 1 se podría realizar FISH con otras sondas de copia única para definir con precisión los puntos de ruptura o emplear la técnica de CHG con microarreglos para el mismo fin y determinar si realmente el derivado del cromosoma 18 en la paciente contiene el mismo material que en su madre, e incluso si en ella la translocación es realmente balanceada. En el caso 2 se podrían emplear marcadores STR o microarreglos de SNP para determinar si se trata de un quimera y si las alteraciones se generaron en las meiosis paterna o materna o si se trata de un mosaico, aún cuando en los tejidos estudiados no se encontró una línea 46,XX.

Por lo anterior se considera que el estudio de los casos con alteraciones cromosómicas complejas del cromosoma 18 como los descritos en esta tesis apoya el diagnóstico y asesoramiento genético de los pacientes y sus familias. De este estudio se desprende además la consideración de realizar estas evaluaciones, dependiendo de la factibilidad de llevarlas a cabo según el caso, en otras cromosopatías y la importancia del análisis tipo FISH y otros que puedan beneficiar a nuestros pacientes para su diagnóstico y asesoramiento genético. En conclusión, en este estudio:

1. Se determinó la frecuencia y tipos de alteraciones del cromosoma 18 identificadas en los análisis por cariotipo con bandas GTG en los estudios realizados en un periodo de 11 años, de 1998 a 2008 en el laboratorio de citogenética del Departamento de Genética del HIMFG.
2. La alteración más frecuentemente reportada fue la T18 con 22 casos.
3. Se identificaron casos con deleciones 18p, 18q, translocaciones y una paciente con dos líneas celulares (uno de ellas con dos isocromosomas del 18). No se encontraron inversiones, duplicaciones ni anillos. El reporte de estas alteraciones en la literatura es poco frecuente y el encontrarlas en nuestra estadística podría reflejar el ser un centro de referencia.
4. Se identificaron casos cuyo diagnóstico y asesoramiento genético podrían beneficiarse de los avances de técnicas moleculares.
5. En dos de los casos identificados en años recientes y actualmente en revisión y seguimiento fue posible realizar estudios citogenéticos moleculares.

Caso 1. Paciente con síndrome 18q- y trisomía parcial del 11, resultado de una $t(11;18)$ materna.

Caso 2. Paciente con fenotipo Turner con una línea celular con monosomía del cromosoma X y otra con isocromosomas de 18p y 18q.

6. Se subraya la importancia de realizar estudios citogenéticos y moleculares en los casos de rearrreglos cromosómicos complejos, en particular el caso del cromosoma 18.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Lizcano F. Fundamentos moleculares en medicina. 1ed. Colombia: Manual moderno; 2005. p. 1-38, 119-139.
- 2.- Bowater R. (2005). DNA structure. In: ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. [http://www.els.net/\[doi:10.1038/npg.els.0006002\]](http://www.els.net/[doi:10.1038/npg.els.0006002])
3. – Miller O, Therman E. Human Chromosomes. 4ta ed. New York (United States of America): Springer; 2001. p. 45-56, 49-54, 61-64
- 4.- Peltonen L. Genome structure and gene expression. In: Rimoin D, Connor J, Pyeritz R, Korf B. Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics. Philadelphia (United States of America): Churchill Livingstone Elsevier; 2005. p. 61-65, 567-598.
- 5.- Kass D, Batzer M. (2004). Genome organization: Human. In: ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. [http://www.els.net/\[doi:10.1038/npg.els.0003855\]](http://www.els.net/[doi:10.1038/npg.els.0003855])
- 6.- Eissenberg J, Elgin S. (2005). Heterochromatin and euchromatin. In: ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. [http://www.els.net/\[doi:10.1038/npg.els.0003844\]](http://www.els.net/[doi:10.1038/npg.els.0003844])
- 7.- Tremethick, D. J. (2007). "Higher-order structures of chromatin: the elusive 30 nm fiber." Cell **128**(4): 651-4.
- 8.- Luger, K. (2006). "Dynamic nucleosomes." Chromosome Res **14**(1): 5-16.
- 9.- Moore C, Best R.(2001) Chromosome preparation and banding. In: ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. [http://www.els.net/\[doi:\]](http://www.els.net/[doi:])
- 10.- Luthardt F, Keitges E.(2001). Chromosomal syndromes and genetic disease. In: ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. [http://www.els.net/\[doi:\]](http://www.els.net/[doi:])
- 11.- Martin C, Ledbetter D.(2005). Telomere. In: ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. [http://www.els.net/\[doi:10.1038/npg.els.0005787\]](http://www.els.net/[doi:10.1038/npg.els.0005787])
- 12.- Stein G, Van Wijnen A, Stein J, Lian J, Owen T.(2002). Cell cycle. In: ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. [http://www.els.net/\[doi:\]](http://www.els.net/[doi:])
- 13.- Nussbaum R, McInnes R, Williard H. Genética en medicina. 5ta ed. Barcelona (España): Masson; 2005. p. 17-33, 143-164.
- 14.- ISCN 2005: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, Shaffer L.G., Tommerup N. (eds); S. Karger, Basel 2005.

- 15.- Luetjens, C. M., C. Rolf, et al. (2002). "Sperm aneuploidy rates in younger and older men." Hum Reprod **17**(7): 1826-1832.
- 16.- Shaffer L.(2005). Karyotype interpretation. In: ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.[http://www.els.net/\[doi: 10.1038/npg.els.0005778\]](http://www.els.net/[doi: 10.1038/npg.els.0005778])
- 17.- Shaffer, L. G. and J. R. Lupski (2000). "Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans." Annu Rev Genet **34**: 297-329.
- 18.- Strachan T, Read A. Genética humana. 3ed. México: McGraw-Hill; 2006. p. 4-32, 240-274, 44-48.
- 19.- Speicher M.(2005). Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) techniques. In: ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.[http://www.els.net/\[doi: 10.1038/npg.els.0005779\]](http://www.els.net/[doi: 10.1038/npg.els.0005779])
- 20.- Watson James D., Baker Tania A; Molecular Biology of the Gene. 5ta ed. United States of America: Pearson; 2004. p. 98-129.
- 21.- Mckinlay R, Sutherland G. Chromosome abnormalities and genetic counseling.3th ed. Oxford university press. Pp: 138-141.
- 22.- Warburton D.(2005). Chromosome analysis and identification. In: ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.[http://www.els.net/\[doi: 10.1038/npg.els.0005775\]](http://www.els.net/[doi: 10.1038/npg.els.0005775])
- 23.- Van Kessel A, Silverman G.(2005). Chromosome 18. In: ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.[http://www.els.net/\[doi: 10.1038/npg.els.0005827\]](http://www.els.net/[doi: 10.1038/npg.els.0005827])
- 24.- Nusbaum, C., T. S. Mikkelsen, et al. (2006). "DNA sequence and analysis of human chromosome 18." Nature **439**(7074): 331-335.
- 25.- de Grouchy J, Turleau C. Clinical atlas of human chromosomes. 1ed. Canada: John Wiley & sons; 1977. P. 159-180.
- 26.- Goc, B., Z. Walencka, et al. (2006). "Trisomy 18 in neonates: prenatal diagnosis, clinical features, therapeutic dilemmas and outcome." J Appl Genet **47**(2): 165-170.
- 27.- Maranda, B., N. Lemieux, et al. (2006). "Familial deletion 18p syndrome: case report." BMC Med Genet **7**: 60.
- 28.- Brenk, C. H., E. C. Prott, et al. (2007). "Towards mapping phenotypical traits in 18p- syndrome by array-based comparative genomic hybridisation and fluorescent *in situ* hybridisation." Eur J Hum Genet **15**(1): 35-44.
- 29.- Schaub, R. L., D. E. Hale, et al. (2005). "The spectrum of thyroid abnormalities in individuals with 18q deletions." J Clin Endocrinol Metab **90**(4): 2259-2263.

- 30.- Smitha R, Harshavardhan M, Gawde, et al. *De novo* isochromosome 18p in a female dismorphic child. *J. Appl Genet* 47(4), 2006, pp: 397-401.
- 31.- Callen, D. F., C. J. Freemantle, et al. (1990). "The isochromosome 18p syndrome: confirmation of cytogenetic diagnosis in nine cases by in situ hybridization." *Am J Hum Genet* **47**(3): 493-498.
- 32.- Pal, S., M. I. Siti, et al. (2007). "Two cases of isochromosome 18q syndrome." *Singapore Med J* **48**(5): e146-150.
- 33.- Gerhard D. (2005). Chromosome 11. In: *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.[http://www.els.net/\[doi: 10.1038/npg.els.0005820\]](http://www.els.net/[doi: 10.1038/npg.els.0005820])
34. – Nicolaidis, P. and M. B. Petersen (1998). "Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies." *Hum Reprod* **13**(2): 313-319.
- 35.- Crider, K. S., R. S. Olney, et al. (2008). "Trisomies 13 and 18: population prevalences, characteristics, and prenatal diagnosis, metropolitan Atlanta, 1994-2003." *Am J Med Genet A* **146**(7): 820-826.

9. ANEXOS

TOMA DE MUESTRA

Material

Jeringa de 3 ml.
Heparina

Equipo

Campana de flujo laminar

Método

- 1.- Preparar la jeringa dentro de la campana de flujo laminar, bañando la pared interna de la jeringa con heparina y dejando 0.1 ml al final
- 2.- Tomar 2 ml e sangre periférica para el estudio (mínimo requerido 1 ml), etiquetar la jeringa con el nombre del paciente y el número de registro asignado por el laboratorio (número de muestra registrada en el laboratorio / número 1 si es la primera muestra del paciente o número dos si es repetición del estudio, etc./ año en que se tomó la muestra)
- 3.- Registrar las muestras inmediatamente en la libreta de control.

METODO DE CULTIVO DE SANGRE

Material

Medio de cultivo BP Max. (etiquetados como medio A y B)
PHA
Tubos de polipropileno
Marcador indeleble

Equipo

Campana de flujo laminar
Incubadora

Método

- 1.- preparar dos tubos por cada muestra, marcados con las letras A y B y el número de registro de laboratorio.
- 2.- En los tubos A colocar 5 ml de medio de cultivo A y en los tubos B colocar 5 ml del medio B
- 3.- Inocularan en cada tubo 10 gotas de sangre periférica
- 4.- Incubar el cultivo a 37° por 72 hrs.

COSECHA

Material

Puntillas	Colchicina
Micropipeta	Refrigerador
Incubadora	Centrifuga
Vortex	KCl 0.075 M como solución hipotónica
Pipeta	Solución fijadora (3 partes de metanol absoluto y una parte de ácido acético glacial)
Piseta	

Método

- 1.- 30 minutos antes de cosechar agregar 15 ml de la solución de colchicina .
- 2.- Incubar de nuevo por 30 minutos
- 3.- centrifugar 10 minutos a 200 rpm
- 4.- Remover el sobrenadante, resuspender el botón celular, adicionar lentamente y con agitación 8 ml de solución hipotónica (a 37° C) é incubar 30 minutos.
- 5.- Centrifugar 10 minutos a 2000 rpm. 1 ml de solución fijadora
- 6.- Remover el sobrenadante, suspender el botón celular, adicionar lentamente y con agitación constante 8 ml de solución fijadora recién preparada y fría e incubar 20 minutos a 4 °C (refrigeración).
- 7.- Centrifugar 10 minutos a 2000 rpm.
- 8.- Remover el sobrenadante y adicionar con agitación constante 8 ml de solución fijadora
- 9.- Repetir los pasos 7 y 8 hasta obtener un botón blanco.

PREPARACION DE LAMINILLAS

Material

Portaobjetos
Agua fría
Alcohol etílico al 96%
Pipetas
Lápiz punta diamante
Pinzas punta roma

Equipo

Centrifuga
Vórtex
Microscopio
Estufa a 60° C

Método

- 1.- Sumergir los portaobjetos en alcohol etílico al 96% frío por 30 minutos
- 2.- Pasar los portaobjetos a agua fría
- 3.- Centrifugar 10 minutos a 2000 rpm los tubos obtenidos del paso 8 de la cosecha.
- 4.- Resuspender el botón celular en un volumen pequeño de fijador fresco y frío, gotear de 3 a 4 gotas de esta solución en los portaobjetos obtenidos de los pasos 1 y 2, pasar las laminillas por la flama ligeramente.
- 5.- Dejar secar las laminillas y evaluar la calidad.
- 6.- Madurar las laminillas a 60°C por un día.
- 7.- Preparar dos laminillas del tubo A y dos del tubo B.
- 8.- Anotar en la libreta de registro si hubo crecimiento, si es escaso el crecimiento o si no hay crecimiento.

BANDAS G.T.G.

Material

Buffer de fosfatos pH 7
Buffer de fosfatos pH 6.8
Solución de tripsina
Solución de Giemsa
Solución de Writh
Cronómetro
Pinzas
Cubreobjetos
Entellan

Método

- 1.- Preparar en 6 coplin cada una de las siguientes soluciones: a) 4 ml de la solución de tripsina y 96 de buffer pH 7; b) Buffer pH7; c) Buffer pH7; d) 5 ml de solución de Giemsa y de 95 ml de buffer pH 6.8; e) 5 ml de solución de Writh y de 96 ml de buffer pH 6.8
- 2.- Sumergir e 20-30 segundos una laminilla en el primer coplin, con la solución de tripsina
- 3.- Enjuagar la laminilla en el segundo coplin (buffer pH7)
- 4.- Dejar la laminilla de 40 segundos en el tercer coplin (buffer pH7)
- 5.- Sumergir de 2.5 minutos la laminilla en el cuarto coplin (solución de Writh)
- 6.- Sumergir de 2.5 minutos la laminilla en el quinto coplin (solución de Giemsa)
- 7.- Enjuagar la laminilla con agua común, secar y montar.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

COLCHICINA

Solución madre

Pesar 0.025 g de colchicina y disolver en 25 ml de agua inyectable, almacenar en congelación.

Solución de trabajo

Tomar 2 ml de la solución madre y 8 ml de agua inyectable, almacenar en refrigeración.

SOLUCIÓN HIPOTÓNICA

Pesar g de KCl y ajustar el volumen a 1 litro.

SOLUCIÓN DE CARNOY (FIJADOR)

1:3 (ácido acético:metanol)

BUFFER pH 7

Pesar: 8.0g de NaCl; 0.2g de KCl; 0.92 g de Na_2HPO_4 y 0.2g KH_2PO_4

Disolver en agua destilada y ajustar al volumen a 1 litro

BUFFER pH 6.8

Disolver una tableta de buffer pH 6.8 en un litro de agua destilada

SOLUCIÓN DE TRIPSINA

Pesar 0.312 g de tripsina de Gibco y disolver con agitación en 50 ml de agua destilada, alicuotar en frascos de 10 ml y mantener en congelación.

CULTIVO DE FIBROBLASTOS

- 1.- Se coloca el fragmento de piel en una caja de petri de 100 mm de diámetro, a la cual se le han colocado 10 ml de medio rpmi1640 sin enriquecer.
- 2.- Bajo el microscopio de disección ó estereoscópico se revisa el tejido, con ayuda del bisturí y de las pinzas(esteriles) se va eliminando la capa de grasa (la cual impide que el tejido se pegue a la caja).
- 3.- Se cambia el tejido a otra caja de petri de 20 mm de diámetro a la cual se le adicionó 2 ml de medio de rpmi 1640
- 4.- se vuelve a revisar si ya no hay evidencia de grasa, si continúa presente un poco de grasa se vuelve a eliminar con ayuda del bisturí.
- 5.- Se cambia a otra caja de petri de 20 mm de diámetro que también se le han colocado 2 ml de medio de cultivo rpmi1640 y 100 microlitros de antibiótico.
- 6.- Se empieza a fragmentar, con la ayuda de dos bisturís de tal forma que queden fragmentos muy pequeños.

- 7.- Una vez realizada la fragmentación se preparan dos frascos (ó uno dependiendo del tamaño del fragmento de tejido con el que se cuente), de 50 ml para cultivo de tejidos.
- 8.- A dichos frascos se les ha adicionado previamente 4 ml de medio de cultivo Chang C
- 9.- A la caja en donde tenemos el tejido fragmentado se le adicionan 2ml de medio de cultivo Chang C
- 10.- Con una pipeta desechable de 10 ml se toman los 4 ml. De medio con tejido y se distribuyen dos ml en la caja no. 1 y dos ml. En la caja no. 2
- 11.- De cada caja nuevamente se vuelven a tomar 2 ml. De medio tratando de no traerse tejido, sino únicamente medio de cultivo y colocarlos en la caja de petri en donde se fragmentó el tejido, de tal forma que cada frasco y caja contengan tejido y 4 ml. De medio de cultivo.
- 12.- Se le adiciona antibiótico si se sospecha que se ha manipulado ó que puede estar contaminado
- 13.- Se le colocan los datos de registro del caso, nombre del paciente y fecha de procesamiento de la muestra.
- 14.- Se colocan en la estufa de CO₂, a una temperatura de 37°C
- 15.- Al 4º día de haberse iniciado el cultivo se valora el crecimiento y se le adicionan 2 ml. De medio Chang C fresco.
- 16.- Se vuelve a incubar y al tercer día se vuelve a valorar crecimiento, se eliminan dos ml de medio y se le adicionan otros dos ml. De medio fresco.
- 17.- Estos dos últimos pasos se repiten por 3 ó 4 veces hasta tener un crecimiento óptimo para poder ser cosechado.
- 18.- Una vez que se ha tenido el crecimiento adecuado, se le adicionan 150 microlitros de Velvan a una concentración de dejándola actuar durante 20 minutos a 37°C.
- 19.- Al mismo tiempo que se ha adicionado el velvan se coloca a calentar la solución hipotónica a 37°C, dicha hipotónica consiste de una mezcla de KCl al 0.4% y de Citrato de Sodio al 0.4% en una proporción de 1:1. Al igual que se pone a calentar la tripsina-verseno a 37°C
- 20.-Transcurrido el tiempo del velvan, se elimina el sobrenadante y se le adicionan 2 ml de tripsina-verseno al frasco 1, se eliminan esos 2ml de tripsina-verseno y se le adicionan otros 2 ml. Dejándolos actuar por unos minutos, se revisa con el microscopio invertido el desprendimiento celular, se le da un golpe para que se acaben de desprender las células y con una pipeta se le adicionan 5 ml de medio de cultivo rpmi1640 suplementado con Suero Fetal de Ternera (SFT) al

12.5%, previamente se ha preparado un tubo cónico de 15 ml con 0.5 ml de Suero Fetal de Ternera para parar la reacción de la tripsina, para lavar y recuperar las células desprendidas.

21.- Adicionar 4 ml. De medio Ham-F10 suplementado con SFT y se conserva en la estufa hasta que se dé el resultado (puede que se requiera cosechar nuevamente). Se continúa valorando.

22.- Se hace lo mismo de los pasos 20 y 21 en el otro frasco y en la caja de petri.

23.- Centrifugar durante 5 min a 1200 revoluciones por minuto.

24.- Una vez centrifugado eliminar el sobrenadante

25.- Adicionar la hipotónica y dejarla actuar por 5-10 min la temperatura va a depender de las condiciones medioambientales (temp. Ambiente, 30, 33, 35 ó 37°C)

26.- Después del tiempo transcurrido fijar las células con fijador Carnoy (metanol-ac. Acético), resuspender gentilmente aforar hasta 9 ml

27.- Centrifugar durante 5 min a 1200 revoluciones por minuto.

28.- Eliminar el sobrenadante y volver adicionar nuevamente Carnoy hasta 6ml.

29.- Repetir el paso 27 y 28 otras dos veces.

30.- Para elaborar laminillas, eliminar todo el sobrenadante hasta 0.2-0.5 ml, resuspender gentilmente

31.- Tomar un portaobjeto lavado y desgrasado, que se encuentra en un frasco con agua, dejarle una ligera película de agua y colocar una gota del botón celular, dejar secar al aire.

32.- Valorar con el microscopio en contraste de fases, para determinar la calidad de las metafases, de lo contrario intentar hacerlo de diferentes formas hasta determinar la manera de hacer las laminillas.

33.- Añejar durante una hora a 60°C.

34.- Bandear

35.- Analizar mínimo 10 células de cada frasco.

36.- Fotografiar las 5 mejores metafases.

37.- Elaboración del cariotipo y del resultado.

TÉCNICA PARA FISH (HIBRIDIZACIÓN *IN SITU* CON FLUORESCENCIA)

De acuerdo a la metodología propuesta por Vysis (Vysis, 2001) modificad por Guevara-Yañez y col

1.- PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Las laminillas para FISH se preparan en laminillas desengrasadas pulidas y mantenidas en agua destilada helada asegurarse que al gotear la muestra se forme el espejo de agua. la dilución de la muestra será de acuerdo a la concentración celular antes observada por una técnica habitual o bajo contraste de fase. Enjuagar en agua destilada.

Se selecciona el área de hibridación bajo el microscopio en el objetivo de 40X, marcar la zona elegida utilizando un lápiz con punta de diamante.

Los viales que contienen el buffer y la sonda son sacadas de congelación y dejar a temperatura ambiente durante 10 a 15 minutos posteriormente bajar la sonda y el buffer por ultracentrifugación 10 segundos protegerlas de la luz.

MEZCLA DE HIBRIDACION

Buffer 3.5ul

Agua 1ul

Sonda 0.5ul

Volumen final 5ul homogenizar y centrifugar en microfuga 20segundos.

3.- HIBRIDACIÓN

Las laminillas se secaron a temperatura ambiente (TA) ya secas se pone una por una la sonda en el área previamente seleccionada, se pone el cubreobjetos de 18 x 18 mm. (Anticipadamente se limpio agua destilada se pulió con la ayuda de un lienzo de algodón), evitando que queden burbujas, en caso de que se formaran se sacan presionando suavemente el cubreobjetos con una pinza.

La laminilla es sellada con cemento "IRIS" el cual se aplica con una jeringa sin aguja alrededor del cubreobjeto.

Se pone a cohibridar al poner la laminilla sobre una platina por 5 minutos a una temperatura de 75°C.

Las laminillas se ponen a hibridar en una cámara húmeda, en la oscuridad a 37°C, durante 24 a 48 hrs.

4.-LAVADO POSTHIBRIDACIÓN

Pasadas 48 hrs se quita cuidadosamente el cemento con ayuda de pinzas de punta muy fina, evitando mover el cubreobjetos.

Introducir la laminilla en una solución de 2xSSC pH 7.0 a TA con el objeto de resbalar el cubre y no dañar la preparación.

Se introduce la laminilla en una solución 0.4 SSC-Tween (20 u 80) al 0.3%, pH 7.0 a una temperatura de $75 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 5 minutos, se agito moderadamente para que el cubreobjetos se deslizara lentamente y no dañar la muestra.

Pasado el tiempo se lavo en solución 2XSSC- Tween al 0.1% pH. 7.0 a TA por 2 minutos.

Se enjuaga la laminilla 10 segundos en a agua destilada a TA.

Se deajo secar a TA en la oscuridad.

A temperatura ambiente y sobre el área hibridada se ponen 5 μl de solución de DAPI II (contracolorante), en solución antidesvanecente (Vectashield Antifade) asegurando que no se formen burbujas en proporción de uno a uno.

Se pone el cubreobjetos que se limpió y pulió anticipadamente.

5.- ANÁLISIS CROMOSÓMICO

Se observa bajo el Microscopio de epifluorescencia, con filtros para DAPI, se observaron 50 metafases, cambiando el filtro de triple banda, con el cual es posible ver 3 colores diferentes, rojo, azul y verde.

Se seleccionaron algunas metafases hibridadas y más representativas del caso, las cuales son digitalizadas y analizadas en la computadora con ayuda del "Software" Quips Imaging.

En caso de que hubiera mucho ruido de fondo se lava nuevamente con una solución de 2XSSC-Tween al 0.1 % con un pH de 7.0 a temperatura ambiente durante 2 minutos, agitando nuevamente para volver a poner el contra colorante y el cubreobjetos.

Observar nuevamente en el microscopio. Se seleccionaron las mejores metafases hibridadas y más representativas del caso.