



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

Facultad de Medicina

División de estudios de Posgrado  
Hospital Infantil de México Federico Gómez

Estudio clínico y citogenético en una familia con translocación  
 $t(1;15)$  identificada a partir del manejo integral en una paciente  
con Trisomía 21.

Tesis que para obtener el Título de  
Especialista en Genética Médica

Presenta:

Dra. Eliganty Bahena Martínez

Directora de Tesis:

Dra. Verónica Fabiola Morán Barroso

Asesores de Tesis:

Dra. Constanza García Delgado  
M. en C. Roberto Guevara Yáñez



México, D.F. Febrero del 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

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

M. en C. Roberto Guevara Yáñez  
Laboratorios Biogen

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

## *Agradecimientos*

- *A mis padres y hermano por sus sabios consejos y por ser mi esencia.*
- *A la Doctora Verónica Fabiola Morán Barroso por todo su apoyo y tiempo invertidos.*
- *A la Doctora Constanza García Delgado por sus enseñanzas.*
- *A la Dra. Rosa Isela Ortiz de Luna por transmitirme esas ganas y curiosidad por cada uno de los pacientes y enseñarme a ver más allá de lo evidente.*
- *Al Doctor Francisco Flores Ramírez por su dedicación.*
- *Al maestro Roberto Guevara Yáñez por todo su apoyo, las explicaciones y los trabajos a marchas forzadas.*
- *A la maestra Alicia Cervantes Peredo por su tiempo, enseñanzas, por esa pasión que tiene hacia la genética y hacia todo lo que hace; por el gran interés hacia sus alumnos.*
- *A todo el equipo de Genética.*
- *A la persona que convierte todos los momentos ordinarios en extraordinarios, al optimista inagotable, a mi apoyo, mejor amigo, compañero, cómplice..... Al amor de mi vida Andrés Lira Álvarez.*

# ÍNDICE

Resumen	1
1. Introducción	2
1.1 Antecedentes de la Citogenética	2
1.2 Bases Moleculares y Cromosómicas de la Herencia	3
1.3 Niveles de Organización del DNA y Estructura cromosómica	3
1.4 Centrómeros	5
1.5 Telómeros	6
1.6 Recombinación meiótica	6
1.7 Alteraciones cromosómicas	9
1.8 Aneuploidías	9
1.9 Alteraciones cromosómicas estructurales	10
1.10 Consecuencias de las translocaciones recíprocas	13
1.11 Estudio de pacientes con alteraciones cromosómicas	15
1.12 Indicaciones para realizar estudio de cariotipo	16
2. Objetivos	18
2.1 Principal	18
2.2 Secundarios	18
3. Justificación	19
4. Planteamiento del Problema	20
5. Material y Métodos	21
5.1 Presentación del caso clínico	21
5.2 Descripción del caso clínico	22
6. Resultados	23
7. Discusión	30
8. Bibliografía	40
9. Anexo	43

## Resumen

La incidencia de alteraciones cromosómicas en RNV es del 1% y son la principal causa de aborto en el primero y segundo trimestre. Se clasifican como numéricas (60% de los casos) y estructurales (40%). La Trisomía 21 (T21) corresponde al 0.45% de las concepciones. Por otra parte la translocación es la alteración estructural más frecuente en los seres humanos, cada translocación recíproca se comporta de forma única, dependiendo entre otros factores de los cromosomas involucrados. El 1.06% de los padres con hijos con T21 son portadores de una translocación recíproca balanceada que no incluye al cromosoma 21 y se ha descrito la posibilidad de que estos rearrreglos tengan un efecto intercromosómico. El objetivo principal de esta tesis fue analizar por clínica, citogenética, citogenética molecular y biología molecular a una familia con translocación recíproca  $t(1;15)$  identificada en una paciente con T21. El estudio clínico, citogenético y molecular de esta familia nos permitirá establecer la relación fenotipo genotipo para los riesgos de recurrencia de T21 y para productos portadores balanceados y no balanceados derivados de la  $t(1;15)$  y el riesgo de portadores en familiares en primer y segundo grado. Además de que establecer el origen del cromosoma 21 paterno o materno nos permitirá confirmar o descartar la influencia del efecto intercromosómico en esta familia y brindar un asesoramiento genético. Con consentimiento informado y aprobación institucional se realizó estudio clínico, citogenético con bandas GTG, FISH y molecular por microsatélites de la propósita, sus padres para determinar el origen del cromosoma 21 extra de la paciente, además de análisis citogenético por bandas GTG de otros familiares en segundo grado. Se llevo a cabo estudio por FISH en muestra de semen del padre para determinación del porcentaje de alteraciones cromosómicas con sondas *PML* que corresponde a la región Prader Willi-Angelman de 15q22 a 15qter (ANEUVISION de VYSYS número de catalogo 32-190026), sonda LSI del cromosoma 15 de 15q11-q13 y CEP (DXZ1) alfa satélite del cromosoma X y CEP (DYZ3) alfa satélite para cromosoma Y.

El análisis cromosómico de la propósita demostró una  $t(1;15)$  además de la T21 libre, por lo que se realizó cariotipo a los padres, abuelos paternos y tío paterno, encontrándose al padre y abuela portadores de la  $t(1;15)$ , aparentemente sin efecto en el fenotipo. Se realizó análisis de la segregación de la  $t(1;15)$  en esta familia, además de los riesgos para T21. La presencia de T21 libre con una translocación balanceada es un evento poco frecuente relacionado a un fenómeno de efecto intercromosómico. En este caso se demostró que el origen del cromosoma 21 extra era de origen materno por no disyunción en meiosis I; por lo que no se comprobó (en éste caso) la presencia de efecto intercromosómico. Se otorgó asesoramiento genético a la familia.

# 1 Introducción

## 1.1 Antecedentes de la citogenética.

En 1880 Fleming y Arnold fueron los primeros en observar los cromosomas humanos; dos años después Weissmann descubrió que los cromosomas eran la base física de la herencia, lo que se corroboró con el redescubrimiento de los principios de la herencia mendeliana en 1901. Sutton y Boveri reportaron que la segregación de cada par de cromosomas homólogos y que el comportamiento independiente de cromosomas no homólogos en meiosis podía contribuir al comportamiento de los factores mendelianos (genes), si éstos se encontraban en los cromosomas.<sup>1</sup>

En 1924 Feulgen desarrolló un método basado en la modificación química del DNA para teñir el núcleo y los cromosomas, esta reacción permitía la medición de DNA en tejidos y núcleo y se observó que las células de cada organismo tenían cantidad característica de DNA. Los trabajos de Avery, McLeod y MacCarty en 1944, establecieron que los genes estaban compuestos de DNA.<sup>2</sup>

En 1956 Tijo y Levin establecieron que en los humanos existen 46 cromosomas, hecho corroborado en el mismo año por Ford y Hamerton. Tres años después se describió que el síndrome de Down se debía a la presencia de un cromosoma 21 extra [por lo que se le llamó Trisomía 21 (T21)] y que alteraciones en el número de cromosomas sexuales causaban los síndromes de Turner y Klinefelter.<sup>1</sup>

En 1960 se reconoció al cromosoma Philadelphia y en 1973 Janet Rowley demostró que era el producto de una t(9;22). En ese mismo año se redefinió el poder del análisis citogenético con el descubrimiento de las técnicas de tinción por Torbjorn Caspersson que permitían la formación de patrones de bandas reproducibles claras y oscuras a lo largo del cromosoma, esta técnica se convirtió en la guía mediante la cual los citogenetistas podían identificar a los cromosomas y sus rearrreglos, conocida como técnica de bandas Q. Posteriormente se han desarrollado técnicas que complementan los hallazgos del estudio citogenético convencional, tales como la técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) e hibridación genómica comparativa (CGH). En los últimos 15 años la sensibilidad del FISH ha mejorado su definición 10,000 veces aproximadamente.<sup>1</sup>

El campo de la citogenética ha evolucionado a grandes pasos y ha colaborado en el establecimiento de la relación genotipo-fenotipo, localización e identificación de genes relacionados con enfermedades.

## 1.2. Bases moleculares y cromosómicas de la herencia

El genoma humano está compuesto por  $3 \times 10^9$  pares de bases, las cuales codifican para aproximadamente 21,370 genes.<sup>3</sup> El 2-5% del DNA es codificante y el resto consiste en secuencias repetidas y secuencias cuya función se desconoce.<sup>4,10</sup> Los niveles de organización del material genético inician con el empaquetamiento de la doble hélice de DNA y proteínas histonas hasta su nivel máximo de condensación en cromosomas durante la división celular. La palabra cromosoma se deriva del griego *chroma* (color) *soma* (cuerpo). En los humanos el DNA está empaquetado en 23 pares de cromosomas: 22 pares de cromosomas no sexuales (autosomas) y un par de cromosomas sexuales (XX en mujeres y XY en hombres).

La información genética puede transmitirse de una generación a la siguiente a través de dos tipos de división celular, la mitosis y la meiosis. En la primera se asegura que cada célula hija contenga su propio complemento genético similar al de la célula que le dio origen y en la segunda que cada gameto (óvulo y espermatozoide) contengan un juego único de genes parentales.<sup>1,4</sup> Los gametos tienen 23 cromosomas (número haploide) mientras que las células somáticas contienen 46 cromosomas (número diploide).

## 1.3 Niveles de Organización del DNA y Estructura cromosómica.

El DNA en organismos eucariontes se encuentra empaquetado en complejos nucleoproteicos conocidos como cromatina; teniendo esta estructura importantes consecuencias funcionales.<sup>5</sup> El nucleosoma es el primer nivel de empaquetamiento de la información genética donde el DNA reduce su longitud en 1/3 parte de la original<sup>6</sup>, consiste en un núcleo central de 8 proteínas histonas; cada núcleo comprende dos moléculas de cada una de las histonas (H2A, H2B, H3 y H4), alrededor de las cuales se enrolla un tramo de 147pb de DNA de doble cadena y si tomamos en cuenta H1 es un tramo de 200pb de DNA.

Las histonas (H1, H2A, H2B, H3 y H4) son proteínas básicas que forman la mayor parte del ensamblado de la cromatina, son ricas en aminoácidos básicos. La H3 y H4 son ricas en arginina, mientras que las H2A y H2B son ligeramente ricas en lisina. Tienen una organización estructural característica con colas N-terminales de 25 a 45 aminoácidos de longitud seguidas de una región globular de 100 aminoácidos. Existen subtipos de histonas como la histona H2A.X implicada en la organización de complejos reparadores de DNA, la histona H2A.Z que protege regiones transcripcionalmente activas y la histona Macro H2A (H2A1 y H2A2) involucrada en el silenciamiento del cromosoma.<sup>7</sup> También existen modificaciones postraduccionales que influyen la estructura de la cromatina modulando las interacciones con el DNA.<sup>7</sup>



Los nucleosomas están conectados por un tramo de DNA. La histona H1 está en el sitio donde éste entra y sale (Fig. 1).<sup>8,9</sup>

La fibra de cromatina de 10nm tiene la apariencia de cuentas enredadas en un cordón, ésta es empaquetada en fibra de 30nm de diámetro (segundo nivel de empaquetamiento), reduciendo la longitud del DNA a la mitad de su longitud original. Hay estudios que apoyan un modelo en el cual el DNA de unión “zigzaguea” entre dos nucleosomas. La cromatina es organizada finalmente en dominios funcionales. Durante la división celular los cromosomas están mucho más condensados y se forman asas, esta fibra se enrolla para constituir las cromátidas. (Fig. 1) El DNA de un cromosoma en metafase está compactado 1/10, 000 de su longitud original.<sup>6,8,10</sup>

El DNA tiene regiones asociadas a su estructura cada 100kb, llamadas regiones de unión a andamiaje (SAR/MAR), existen componentes asociados a estas regiones como lo son el complejo de condensinas y la topoisomerasa II los cuales son esenciales para la condensación mitótica de los cromosomas. La interfase del andamiaje contiene RNA y ribonucleoproteínas.<sup>11</sup>

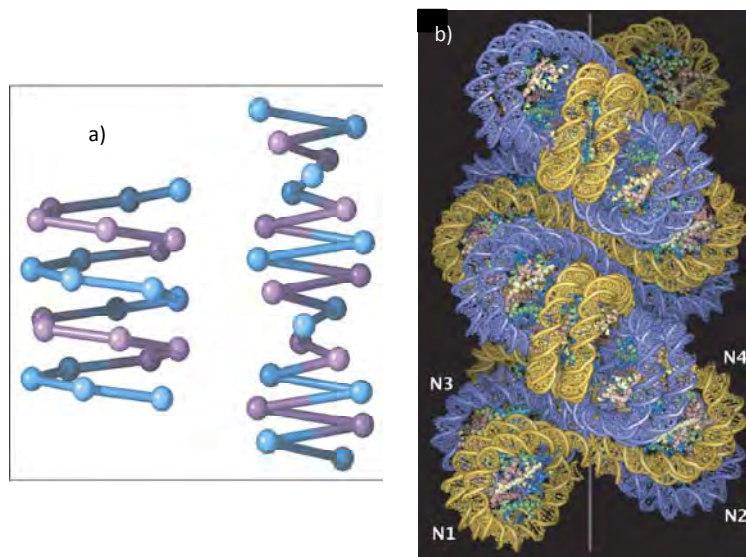


Fig. 1. a) Representación esquemática de dos ejemplos de modelos de la topología del enrollamiento de la fibra de cromatina. Los nucleosomas se representan en color azul y magenta b) Modelo de la fibra de cromatina en forma de moño que evita el solapamiento. Figura modificada de Tim Richmond. Curr Op in Structural Biology 2006.

Los cromosomas se visualizan como estructuras individuales durante la mitosis (en la profase tardía o en metafase), conformados de dos cromátidas unidas por una constricción primaria que es el centrómero. Los cromosomas además constan de un brazo corto (p), un brazo largo (q) y extremos (telómeros). De acuerdo a la localización del centrómero los cromosomas se clasifican en (Fig. 2):

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

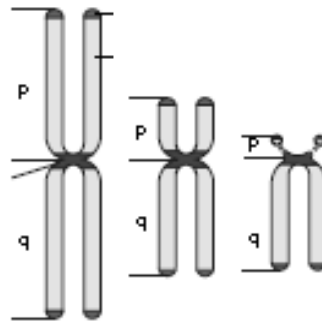


Fig. 2. Clasificación de los cromosomas por su forma. El primero corresponde a un cromosoma metacéntrico, el segundo a un cromosoma submetacéntrico y el último a un cromosoma acrocéntrico. Figura modificada de Speicher. Encyclopedia of Life Sciences 2005.

## 1.4 Centrómeros

El centrómero es el sitio de ensamblaje para el cinetocoro; coordina el movimiento cromosómico en mitosis y meiosis, sincroniza la formación de heterocromatina, la cohesión de cromátidas hermanas así como la condensación cromosómica, además de la unión de los cromosomas al huso y dirigen el movimiento de los cromosomas durante la división celular. En el centrómero encontramos repetidos  $\alpha$  satélite, contiene dos dominios funcionales proteicos que codifican funciones de cromatina/cinetocoro CEN y ensamblaje de heterocromatina.<sup>10,12</sup>

Las proteínas CENP-A, CENP-B Y CENP-C son componentes del cinetocoro que forman un complejo precinetocoro; fragmentos de heterocromatina flanquean a la cromatina CEN la cual contiene histonas especializadas. CENP-A inicia el ensamblaje y es requerida para reclutar otras proteínas del cinetocoro y centrómero. CENP-B contiene dominios de dimerización induciendo posición no aleatoria de los nucleosomas. CENP-A y CENP-C interactúan con DNA  $\alpha$  satélite para crear cromatina especializada importante para la identidad del centrómero y el ensamblaje y función del cinetocoro.<sup>12</sup>

## 1.5 Telómeros

Los telómeros protegen a los extremos cromosómicos de degradación nucleolítica y llevan a cabo actividades de reparación del DNA, para compensar las pérdidas progresivas de DNA de los extremos de los cromosomas.<sup>13</sup> Su nombre viene del griego *telos* (terminal) y *meros* (parte). La longitud de los telómeros es crucial para la supervivencia a largo plazo, el DNA de los telómeros consiste en arreglos en tándem de secuencias repetitivas ricas en G (TTAGGG); en el extremo 3' que termina con una cadena de DNA que sobresale unos 50-400 nucleótidos, y este extremo se hace un asa en forma de T.<sup>14</sup>

## 1.6 Recombinación meiótica

La recombinación meiótica ocurre cuando dos moléculas de DNA intercambian regiones extensas de secuencia similar (recombinación homóloga) o regiones cortas de homología (recombinación sitio específica). La recombinación (entrecruzamiento) se da entre cromátides homólogas no hermanas, dando así origen a una molécula de DNA recombinada que es una mezcla de las 2 moléculas originales.<sup>1,2,4</sup>

La meiosis es la división en las células germinales que genera gametos haploides con 23 cromosomas distribuidos de forma aleatoria. Es importante para los principios de la genética mendeliana de segregación, segregación independiente y recombinación de genes. La meiosis consiste en dos divisiones celulares: Meiosis I o fase reduccional; el número de cromosomas visibles citológicamente es reducido a la mitad durante esta división y la Meiosis II o segregación ecuacional.<sup>1,2,4,15,16</sup>

Los eventos principales de la meiosis reflejan tres procesos específicos: 1) Apareamiento y sinapsis de cromosomas homólogos. 2) Los pares de homólogos se unen y se forman quiasmas dando estructuras bivalentes. 3) Se da la orientación de los 2 centrómeros de cada bivalente a polos opuestos del huso para asegurar la separación de ambos homólogos en la primera división meiótica. (Fig. 3)

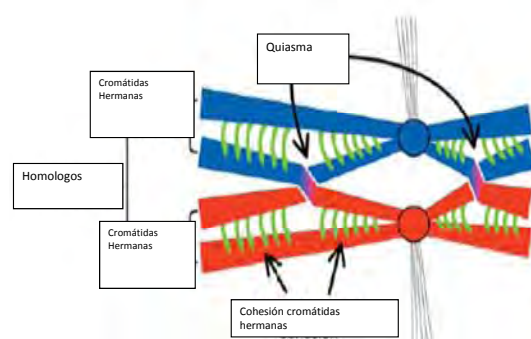


Fig.3. Conexión entre cromosomas homólogos durante la meiosis, se observa el quiasma producido entre cromátidas hermanas. Imagen modificada de Bugreev. Nature 2006.

La Meiosis I (Fig.4) consta de la profase 1 que incluye las etapas de Leptoteno, Cigoteno, Paquiteno, Diploteno, Diacinesis, Metafase 1, Anafase 1, Telofase 1. (Tabla 1 y Fig. 4). Posteriormente ocurre la intercinesis.<sup>1,2,4,15,16</sup>

Tabla 1

Meiosis I	
<b>Profase 1:</b>	
Leptoteno-	Los cromosomas se condensan
Cigoteno-	Inicia el apareamiento entre cromosomas homólogos.
Paquiteno-	Se completa la sinapsis; cada par de homólogos forma un bivalente; existe intercambio de segmentos homólogos entre 2 de las 4 cromátidas.
Diploteno-	Acortamiento de cromosomas; comienza la separación de los bivalentes; los cromosomas homólogos solo están unidos por quiasmas (Fig.4).
Diacinesis-	Continúa la condensación cromosómica. Los quiasmas se han desplazado completamente a sus extremos.
<b>Metafase 1:</b>	
	La membrana nuclear desaparece durante la etapa de prometáfase; los bivalentes se encuentran en el plano ecuatorial; cada centrómero es orientado hacia polos opuestos.
<b>Anafase 1:</b>	
	Cada homólogo con sus dos cromátidas se mueve a un polo. Esta etapa constituye a la segregación de los alelos.
<b>Telofase 1:</b>	
	Cada uno de los dos grupos de cromosomas, contiene un número haploide de centrómeros.
Intercinesis: Se decondensan los cromosomas.	



Fig. 4. Fases de Profase 1

Información de la tabla obtenida a partir de referencias 16 y 29. Imagen modificada de Strachan T Genética Humana 2006. Ref 10.

La segunda división meiótica es similar a una mitosis, con la excepción de que el número cromosómico es haploide (Fig. 5).

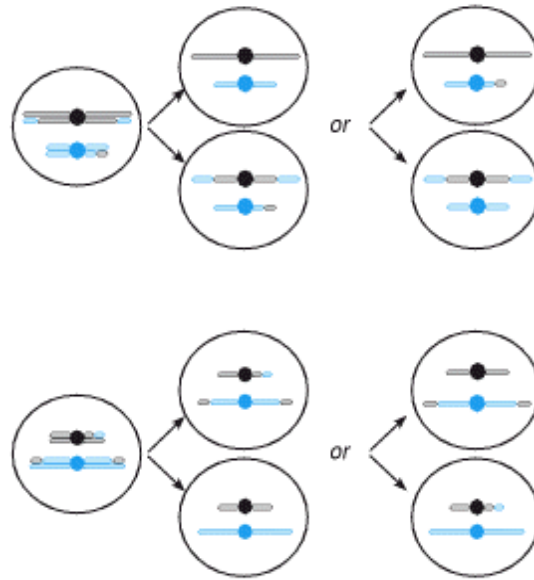


Fig. 5. Meiosis II. Imagen modificada de Strachan T. Genética Humana 2006.Ref 10

Hay diferencias en la gametogénesis masculina y femenina tanto a nivel anatómico, fisiológico, citológico como molecular.<sup>38</sup> (Tabla 2)

Tabla 2  
Diferencias funcionales en gametogénesis

Gametogénesis masculina: Determinada por la expresión de <i>SRY</i> en el embrión	Gametogénesis femenina
<p>Progresión meiótica y su control</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>☑ Renovación de células madre y espermatogenesis continua en la vida reproductiva</li> <li>☑ Inicio de meiosis en adultos</li> <li>☑ Punto de control estricto para alteraciones meióticas</li> <li>☑ Reparación incompetente durante la progresión de etapas espermáticas</li> <li>☑ No hay expresión de genes paternos durante embriogénesis temprana</li> </ul>	<p>Progresión meiótica y su control</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>☑ Depleción de ovocitos relacionado con la edad y periodo fetal restringido</li> <li>☑ Inicio de meiosis durante embriogénesis</li> <li>☑ Punto de control en profase relajado para alteraciones meiótica</li> <li>☑ Reparación competente a través de maduración de ovocito</li> <li>☑ Punto de control que censa daño a DNA puede causar cito fragmentación después de activación de ovocitos</li> <li>☑ Expresión de genes maternos determina embriogénesis temprana</li> </ul>

Tabla 2. Se describen algunas de las diferencias funcionales en gametogénesis femenina y masculina. Información obtenida a partir de la referencia 17.

## 1.7 Alteraciones cromosómicas

La incidencia de alteraciones cromosómicas en RNV es de 1%, se clasifican como numéricas (60% de los casos) y estructurales (40%) (Tabla 3).<sup>17,18,19</sup> Las alteraciones numéricas se dividen en euploidías (múltiplos del número haploide) y aneuploidías (no son múltiplos del número haploide). Se han detectado alteraciones cromosómicas hasta en el 65% de los embriones en la etapa de 7-8 células, por lo que incluso la presencia de morfología y desarrollo normal en ellos no son criterios suficientes para euploidía. Se cree que las pérdidas gestacionales recurrentes son consecuencia de rearrreglos cromosómicos no balanceados ya que en el 58% de los casos están involucradas translocaciones.<sup>20,26</sup>

Tabla 3. Clasificación de las alteraciones cromosómicas

Numéricas	Estructurales
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Euploidías</li> <li>• Aneuploidías</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inserciones</li> <li>• Deleciones</li> <li>• Duplicaciones</li> <li>• Anillos</li> <li>• Isocromosomar</li> <li>• Inversiones</li> <li>• Translocaciones               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Robertsonianas</li> <li>○ Recíprocas</li> <li>➤ Balanceadas</li> <li>➤ No balanceadas</li> </ul> </li> </ul>

## 1.8 Aneuploidías

Las aneuploidías pueden ser trisomía, monosomía, número de copias anormal o dosis de la secuencia en un cromosoma anormal.<sup>53</sup> La aneusomía segmental y las aneuploidías son la principal causa de pérdidas gestacionales. Los estudios realizados por Martin<sup>30</sup> demostraron que 8.6% de los espermatozoides tenían alteraciones cromosómicas, de los cuales 5.6% correspondían a aneuploidía, si se asume que la frecuencia de alteraciones en óvulos es similar o incluso mayores, la incidencia de aneuploidías a la concepción podría ser tan alta como 15-30%. Está bien establecido que un alto porcentaje de embriones aneuploides muere en el periodo preimplantación, incluyendo a todos los embriones con monosomía autosómica, por lo que a la semana 3 a 5 después de la ovulación el 9.3% de los embriones abortados son cromosómicamente anormales.<sup>20</sup>

Las alteraciones cromosómicas constituyen la principal causa de aborto en el primero y segundo trimestre, alcanzando un porcentaje tan alto como de 50-60% entre la semana 8 y 20 de gestación. De los fetos con alteraciones cromosómicas que se abortan el 50% tiene trisomía de autosomas, una cuarta parte tienen poliploidía y una quinta parte son 45,X.<sup>20</sup> De los recién nacidos con alteraciones cromosómicas, cerca de tres quintas partes tienen alteraciones en cromosomas sexuales y el resto tiene aneuploidía de autosomas, de las cuales la más frecuente es la T21, que corresponde al 0.45% de las concepciones. El cromosoma 21 extra en estos pacientes provoca un aumento en la expresión de genes codificados en este cromosoma pero solo algunos de los genes son sensibles a dosis.<sup>21,22</sup>

Las aneuploidías se originan por errores en la meiosis (aneuploidía germinal) o errores mitóticos tempranos.<sup>23</sup> El evento que asegura la división entre los cromosomas es la correcta separación de las cromátidas hermanas unidas al huso mitótico.<sup>24,25,26</sup>

### 1.9 Alteraciones cromosómicas estructurales

Las alteraciones cromosómicas estructurales son resultado de una ruptura o división cromosómica anormal durante la meiosis que interrumpe la continuidad de uno o más cromosomas, si bien se pueden romper en cualquier punto hay sitios de ruptura preferente o *hot spots* (relacionados por ejemplo con secuencias repetidas). Si la ruptura no afecta el centrómero origina un cromosoma corto con un fragmento acéntrico los cuales son inestables y generalmente se pierden durante la división celular. Los extremos deletados se pueden reunir y formar otras alteraciones.<sup>10</sup>

Los rearrreglos cromosómicos pueden provocar: pérdida (delección) o ganancia (duplicación) del material genético, delección intersticial y anillos cromosómicos; la reunión de segmentos cromosómicos interrumpidos en una configuración anormal sin pérdida o ganancia de material genético crea una translocación balanceada o una inversión; dos rupturas en dos diferentes cromosomas pueden causar translocaciones recíprocas (entre cromosomas no homólogos) y robertsonianas (acrocéntricos). (Fig. 6) Alteraciones en el patrón de bandas permiten reconocer estos rearrreglos en el análisis citogenético habitual pudiéndose presentar como eventos *de novo* o heredadas de un padre portador.

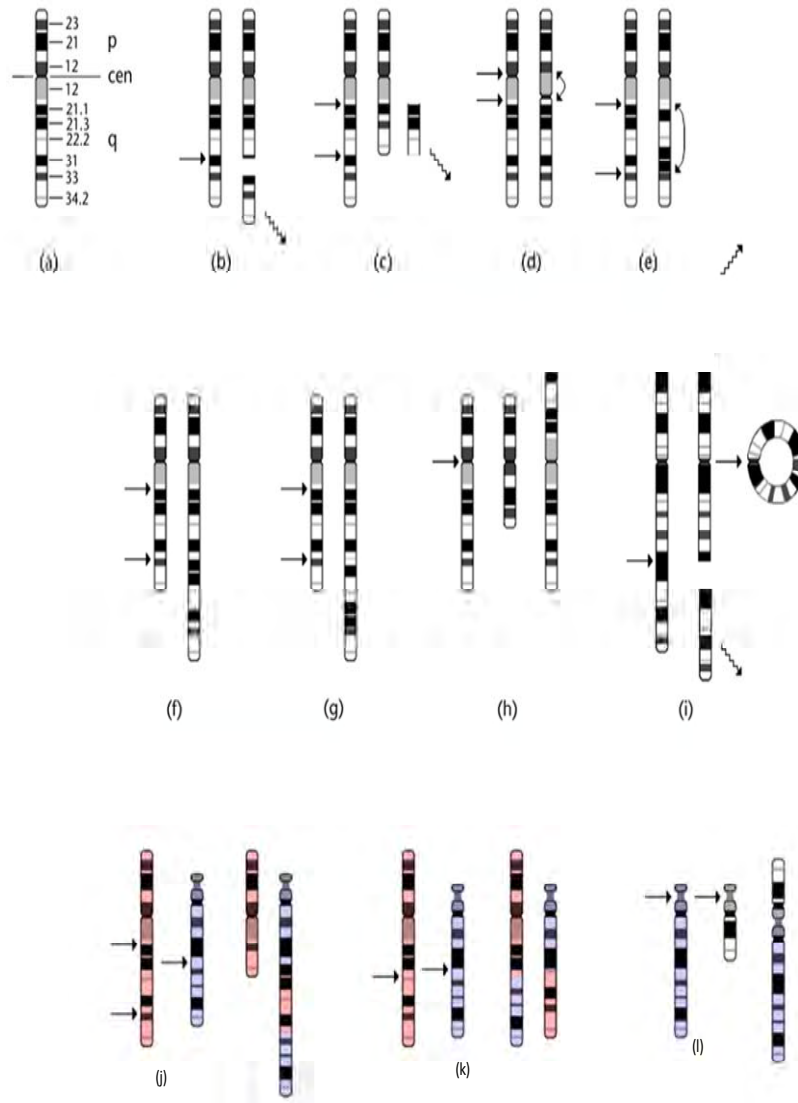


Fig. 6. Aberraciones cromosómicas estructurales, a) cromosoma normal, b) deleción, c) deleción intersticial, d) inversión paracéntrica, e) inversión pericéntrica, f) y g) duplicación de segmento, h) isocromosoma, i) anillo, las imágenes de la última línea nos muestran ejemplos de translocaciones j) translocación de un fragmento cromosómico. K) translocación balanceada, l) translocación robertsoniana Imagen modificada de Luthardt F, Keitges E. Encyclopedia of life sciences 2002.

La incidencia de las translocaciones en general es de 0.178%, de las cuales el 0.092% corresponden a translocaciones recíprocas y el 0.086% a translocaciones robertsonianas.<sup>27</sup> Las translocaciones recíprocas corresponden al 0.14% (1/625 RNV) de las aberraciones estructurales siendo de éstas las más frecuentes en humanos y generalmente son transmitidas por uno de los padres.<sup>27,28</sup>

Los rearrreglos presentes al momento de la concepción afectan a cada célula y son constitutivos, mientras que aquellos que ocurren más tarde se presentan como



mosaicismo. Alteraciones estructurales que ocurren después del nacimiento se refieren como adquiridas y pueden causar tumores o leucemia por alteración en la regulación del ciclo celular.<sup>27</sup>

Los rearrreglos se consideran balanceados si la disomía se mantiene, cuando se pierde o gana material genético el rearrreglo es desbalanceado y se asocian con retraso en el desarrollo o alteraciones intelectuales, defectos al nacimiento y pobre crecimiento, están presentes en 0.04% de recién nacidos y son una causa importante de morbi y mortalidad.<sup>29</sup> Los rearrreglos balanceados generalmente no tienen efecto en el desarrollo físico o intelectual del portador pero pueden tener consecuencias en la función reproductiva y en los descendientes ya que entre otras razones, en el portador ocurre un cambio en el tamaño cromosómico y en la posición del centrómero en los cromosomas reorganizados o cromosoma derivativo y esta situación da lugar a la formación de embriones no balanceados (con pérdida o ganancia de material genético) que pueden tener alteraciones en su desarrollo o incluso ser incompatibles con la vida.<sup>27</sup>

Estudios de segregación meiótica en espermatozoides han demostrado que del 18.6 al 80.7% de éstos están desbalanceados cromosómicamente. La relación entre translocaciones cromosómicas e infertilidad ocurre en 0.6% de parejas infértiles con una incidencia del 0.2% en la población en general.<sup>30</sup> Durante la meiosis, los portadores de translocaciones balanceadas producen una configuración cuadrivalente. El comportamiento meiótico del cuadrivalente ocasiona diferentes proporciones de gametos balanceados y no balanceados. Se ha reportado que las mujeres son portadoras de translocaciones en un 65.7% y esta cifra es casi el doble de la reportada para los varones portadores de translocaciones en un 34.3%, en estudios realizados en parejas con fallas reproductivas. También se ha considerado que la presencia de las translocaciones altera el proceso de espermatogénesis.<sup>27</sup>

Cada translocación recíproca se comporta de forma única por lo que el rango de abortos espontáneos y rearrreglos difieren de una translocación a otra dependiendo de los cromosomas involucrados, la longitud de los segmentos intersticiales, de los segmentos translocados y el número y localización de quiasmas que determinan la orientación del cuadrivalente y consecuentemente la segregación meiótica dependiendo del sexo del portador.<sup>31</sup>

La mayoría de las deleciones terminales o intersticiales *de novo* parecen involucrar al cromosoma paterno, en contraste el origen parental de la deleción terminal de 1p asociado con el síndrome de 1p36 es de origen materno en 60% y de origen paterno en 40% de los casos.<sup>39</sup> En un estudio realizado en 115 pacientes no relacionados, con diagnóstico de alteración cromosómica estructural no balanceada se refirió que si bien el 70% de las deleciones eran de origen paterno, las deleciones terminales en 2q37 eran de origen materno.

El exceso de errores en la meiosis paterna puede reflejar una vulnerabilidad en las divisiones pre-meióticas de células germinales debida a la presencia de rearrreglos estructurales, ya que estas divisiones son más frecuentes en líneas germinales masculinas que femeninas.<sup>32</sup>

Conforme los rearrreglos sean más complicados, mientras más cromosomas estén involucrados y existan más rupturas, el riesgo de alteraciones asociadas se incrementa. Esto es secundario a la afectación de genes sensibles a dosis o por incremento de riesgo de deleciones crípticas cerca de sitios de ruptura.<sup>33</sup>

### 1.10 Consecuencias de las translocaciones recíprocas

Dependiendo del tipo de segregación, una célula germinal con una translocación balanceada puede producir 32 tipos de gametos de los cuales 2 darán origen a un gameto cromosómicamente normal. Para un portador de translocación recíproca balanceada la frecuencia de diferentes tipos de segregación depende de la translocación específica.<sup>27,28,34</sup>

Durante la meiosis los cromosomas homólogos se aparean y forman el complejo sinaptonémico. Cuando hay una translocación balanceada los 4 homólogos (los dos cromosomas involucrados y los 2 cromosomas no involucrados en la translocación) se aparean formando un cuadrivalente y en la anafase I se separan de acuerdo a diferentes tipos de segregación los que son la segregación 2:2 (alternativa, adyacente 1 o adyacente 2), o segregación 3:1 o menos frecuentemente segregación 4:0, esto hace que los portadores de translocaciones recíprocas generen un porcentaje elevado de gametos no balanceados que pueden reducir la capacidad reproductiva del portador e incrementar el riesgo de transmitir alteraciones cromosómicas a su descendencia.<sup>27</sup> (Fig. 7 y 8).

La concurrencia de una translocación recíproca y de una aneuploidía, derivados del mismo padre representan una coincidencia muy rara, alternativamente nos puede sugerir un efecto inter cromosómico en que el rearrreglo estructural puede provocar una segregación anormal de otro cromosoma.<sup>30,31</sup>

En 1963 Lejeune detectó un exceso de portadores de translocaciones recíprocas balanceadas entre padres de niños afectados con trisomía 21 y sugirió que la presencia de la reorganización estructural podía tener un efecto en la segregación de otros pares de cromosomas durante la meiosis. Sin embargo algunos estudios han demostrado que solo el 1.06% de los padres con hijos con Trisomía 21 son portadores de una translocación balanceada que no involucre al cromosoma 21 (que a su vez pueden heredar a su descendencia), por lo que la evidencia al respecto es contradictoria.<sup>10</sup>

La posibilidad de que rearrreglos cromosómicos pueden afectar el comportamiento durante la meiosis de otros cromosomas ha sido un tema controversial en la genética humana. El efecto inter cromosómico puede ser una consecuencia de pequeñas rupturas en la formación de sinapsis homólogas o puede depender de defectos en la alineación o condensación cromosómica.<sup>30</sup>

En este sentido, estudios citogenéticos con sondas específicas para diferentes regiones de los cromosomas han mostrado defectos en el apareamiento en portadores de translocaciones heterocigotas; no solo de los cromosomas involucrados en la translocación, sino también en otros cromosomas (efecto inter cromosómico).<sup>17</sup>

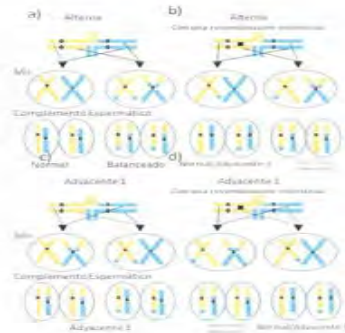


Fig. 7. Cruz de paquíteno. **a)** Productos de la segregación alterna (2 gametos normales y 2 portadores de translocación balanceada) **b)** Productos de segregación alterna si existiera recombinación intersticial (1 gameto normal, 1 translocado y dos con trisomía parcial de uno de los cromosomas y monosomía parcial del segundo de los cromosomas involucrados (como el resultado de adyacente 1) **c)** Producto de segregación adyacente 1 (2 gametos con monosomía parcial de 1 de los cromosomas (A) y trisomía parcial del otro (B) y 2 gametos con trisomía parcial de cromosoma B y monosomía parcial del cromosoma A **d)** Segregación con la presencia de recombinación intersticial (los gametos obtenidos son iguales a los de una segregación alterna)

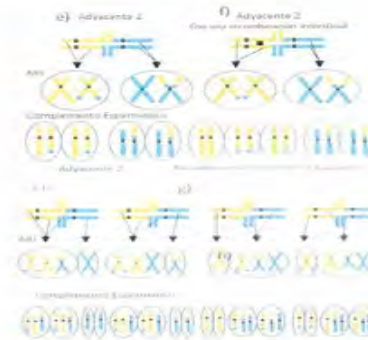


Fig. 8. **e)** Productos de la segregación adyacente 2 (Los gametos obtenidos son con trisomía casi completa de un cromosoma con monosomía casi completa del otro) **f)** En caso de que hubiera recombinación intersticial (los gametos obtenidos son similares a los de adyacente 2 sin recombinación) **g)** Productos de segregación 3:1 (en general tres cromosomas se van a un gameto y uno solo al otro). Los posibles gametos de los diferentes tipos de segregación 3:1, de los cuales tenemos 4 posibilidades, en 2 de las posibles segregaciones habría la posibilidad de que segregen 2 cromosomas translocados y uno normal en un gameto, mientras que en el otro gameto vaya un cromosoma normal; las otras 2 opciones es que en un gameto vayan dos cromosomas normales y uno translocado, mientras que en el otro se vaya un cromosoma translocado.

### 1.11 Estudio de pacientes con alteraciones cromosómicas

El abordaje de las alteraciones cromosómicas depende del tipo de alteración cromosómica y de los hallazgos del cariotipo analizado inicialmente con bandas GTG. A continuación se presenta un diagrama de flujo con los aspectos principales a considerar. (Fig.9)



Fig. 9. Diagrama de flujo 1 abordaje de alteraciones cromosómicas

Existen diferentes técnicas que permiten identificar cada cromosoma utilizando técnicas de tinción las cuales incluyen a las bandas GTG en que los cromosomas se tratan con tripsina para desnaturalizar las proteínas cromosómicas y se tiñen con Giemsa, limitándose a células en división activa y a rearrreglos mayores de 5-8Mb (resolución de 450 a 550 bandas).<sup>8</sup> Otras técnicas en uso que proporcionan información complementaria son: bandas Q, R, C y NOR. Existe también el bandeado de alta resolución con bandas G o R en cromosomas en prometafase (resolución de 700 a 850 bandas).<sup>34,35</sup>

Otras técnicas que pueden utilizarse son el FISH y CGH. En el FISH se utilizan sondas de DNA para secuencias específicas del genoma humano que hibridan con cromosomas humanos para localizar secuencias de interés dentro del DNA. Las sondas están marcadas con material fluorescente y dependiendo del rango de aplicación son sondas gen-específicas, sondas de secuencias repetitivas y sondas de todo el cromosoma.<sup>37</sup> (Fig. 10) La técnica de CGH es una técnica de citogenética molecular que permite el análisis del genoma completo por medio de una detección rápida y mapeo de diferente número de copias de DNA entre genoma normal y genoma en estudio.

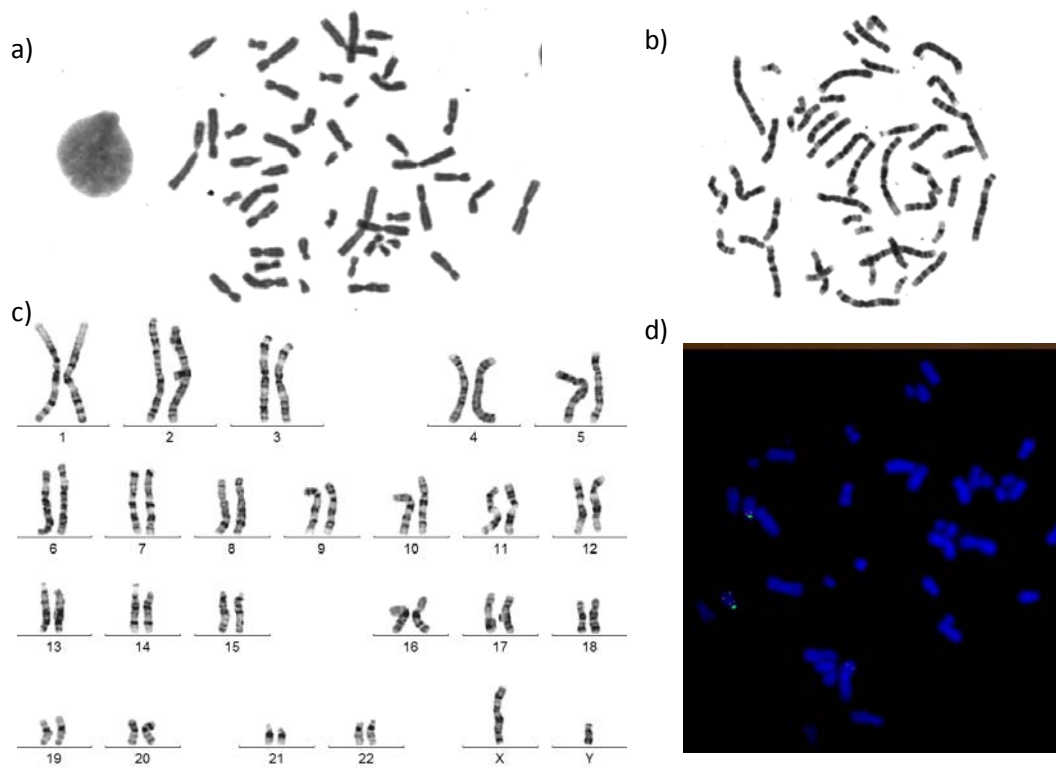


Fig. 10. a) Representación de metafase por cariograma sin tinción, b) Cariograma con bandas GTG, c) Cariotipo con bandas GTG, d) Ejemplo de FISH.

### 1.12 Indicaciones para realizar estudio de cariotipo

Las indicaciones para realizar un cariotipo varían dependiendo de la edad del paciente y se describen en la Tabla 4.<sup>18,38</sup>

Tabla 4 Indicaciones de estudio cromosómico

<b>Indicación general:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Retraso mental</li> <li>○ Múltiples malformaciones</li> <li>○ Alteraciones de crecimiento prenatal</li> <li>○ Epilepsia inexplicable no tratable</li> <li>○ Historia familiar</li> <li>○ Neoplasias</li> </ul>
<b>Etapa prenatal:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Edad parental avanzada (Madre mayor de 35 años o padre mayor 40 años)</li> <li>○ Ansiedad materna</li> <li>○ Triple marcador alterado</li> <li>○ Oligo o Polihidramnios</li> <li>○ Retraso en el crecimiento intrauterino</li> <li>○ Arteria umbilical única, asociada a otras malformaciones</li> <li>○ Sospecha ultrasonográfica de cromosomopatía</li> <li>○ Antecedente de cromosomopatía balanceada en alguno de los progenitores</li> </ul>
<b>Etapa neonatal:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Malformación congénita mayor aislada</li> <li>○ Presencia de 3 o más malformaciones congénitas menores en un paciente</li> <li>○ Recién nacido con dismorfias</li> <li>○ Genitales ambiguos</li> <li>○ Parto con producto finado de causa desconocida</li> <li>○ Muerte neonatal inexplicable</li> </ul>
<b>Etapa de Lactancia:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Retraso mental</li> <li>○ Dismorfias</li> <li>○ Retraso en desarrollo psicomotor</li> </ul>
<b>Etapa preescolar-escolar:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Trastorno en el crecimiento</li> <li>○ Retraso psicomotor</li> <li>○ Dismorfias</li> </ul>
<b>Etapa de adolescente:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Ginecomastia</li> <li>○ Falta de desarrollo puberal</li> <li>○ Amenorrea primaria o secundaria (cuando se han descartado causas no genéticas)</li> <li>○ Retraso mental</li> <li>○ Rasgos dismórficos</li> </ul>
<b>Etapa de adulto:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Padres de niños con anomalías cromosómicas estructurales</li> <li>○ Abortos recurrentes</li> <li>○ Infertilidad inexplicable</li> <li>○ Diagnóstico prenatal</li> <li>○ Rasgos dismórficos</li> </ul>

Existen alteraciones cromosómicas en el 21% de los ovocitos y en 9% de espermatozoides. Mutaciones espontáneas se originan y transmiten tanto de ovocitos como de espermatozoides sin embargo son más frecuentes en estos últimos. Más del 80% de alteraciones estructurales son de origen paterno y las aneuploidías son de predominio femenino, los cromosomas 21 y 22 son los más frecuentemente implicados tanto en ovocitos como en espermatozoides. El cromosoma 16 es el más susceptible a errores meióticos durante la ovogénesis y la T16 es la más frecuente reportada en abortos espontáneos.<sup>39</sup>

Conforme avanza la edad materna, la reserva de ovocitos se va depletando siendo esto un factor de riesgo para aneuploidías, así mismo se ha observado que la frecuencia de aneuploidía se incrementa en muestras de hombres con cuentas disminuidas de espermatozoides y problemas de fertilidad de etiología indefinida. Sin embargo la edad paterna no tiene tanta influencia en la presencia de espermatozoides aneuploides.<sup>29</sup>

En la espermatogénesis los cromosomas sexuales están más predispuestos a no disyunción que los autosomas debido a que sólo recombinan en regiones pseudoautosómicas y no a lo largo de todo el cromosoma como pasa con los autosomas.<sup>29</sup>

En esta tesis se describe un caso familiar de translocación  $t(1;15)$ , que se detectó a partir del estudio y manejo integral de una paciente con Trisomía 21.

## 2. Objetivos

- **2.1 Principal:**

- Analizar por clínica, citogenética, citogenética molecular y biología molecular a una familia con translocación recíproca t(1;15) identificada en una paciente con Trisomía 21 o Síndrome de Down.

- **2.2 Secundarios:**

- Establecer la relación fenotipo cariotipo por bandas GTG y FISH.
- Analizar la segregación meiótica en un portador balanceado de la translocación y el efecto en los gametos resultantes.
- Evaluar la importancia del posible efecto inter cromosómico de la t(1:15 ) en la producción de la T21 .
- Brindar asesoramiento genético a la familia.

### 3. Justificación

- El estudio clínico, citogenético y molecular de esta familia nos permitirá establecer la relación fenotipo genotipo, establecer los riesgos de recurrencia para Trisomía 21 (T21) y para productos portadores balanceados y no balanceados derivados de la t(1;15) y el riesgo de portadores en familiares en primer y segundo grado. Además el establecimiento del origen del cromosoma 21 paterno o materno nos permitirá establecer o descartar la influencia del efecto intercromosómico en esta familia y brindar un asesoramiento genético tomando en consideración este efecto.



#### 4. Planteamiento del Problema

- La T21 es la cromosomopatía numérica trisómica no mosaico más frecuente en el ser humano, raramente es reportada asociada a otras alteraciones cromosómicas ya sea numéricas o estructurales y que involucran a otros cromosomas además del cromosoma 21 en casos familiares. Por lo cual es importante establecer la relación fenotipo genotipo en esta paciente, así como las regiones cromosómicas involucradas. Esta circunstancia es relevante para el asesoramiento genético ya que los portadores de translocaciones balanceadas tienen riesgo de generar gametos anormales o desbalanceados por lo que es importante determinar cuáles serán los productos de la segregación. Otra consideración importante es determinar el origen del cromosoma 21 extra ya que por una parte, en la mayoría de los casos de T21 el cromosoma extra proviene de un error en la meiosis I materna, pero también se ha reportado un efecto inter cromosómico en portadores de translocaciones balanceadas el cual podría influir en los riesgos a considerar en el asesoramiento genético para esta familia.

## 5. Material y Métodos

Como se observa en la Fig. 11 previo consentimiento informado y con autorización Institucional y del Comité de Tesis, se realizó estudio clínico, citogenético (con bandas GTG y FISH) y molecular por microsatélites de la propósita y sus padres, éste último estudio para determinar el origen materno o paterno del cromosoma 21 extra. Además se realizó análisis citogenético por bandas GTG de otros familiares en segundo grado. Se realizó estudio por FISH en muestra de semen del padre para determinación del porcentaje de alteraciones cromosómicas con sondas LSI del cromosoma 15 y CEP (DXZ1) alfa satélite del cromosoma X en verde y CEP (DYZ3) alfa satélite del cromosoma Y en rojo (VYSIS no catalogo 32-190026).



Fig. 11. Diagrama de flujo2.  
Pasos que se siguieron en la atención de la paciente

### 5.1 Presentación del caso clínico

Se realizó historia clínica y estudio del caso de acuerdo al protocolo de estudio de pacientes con T21 del Hospital Infantil de México Federico Gómez y el Lineamiento Técnico para la atención integral de la persona con T21.<sup>40</sup> Se realizó cariotipo en linfocitos de sangre periférica y se solicitaron las valoraciones por los departamentos de Cardiología (tele de tórax, ecocardiograma y electrocardiograma), Endocrinología (perfil tiroideo), Rehabilitación, Oftalmología, Audiología (Potenciales Evocados Auditivos de Tallo Cerebral) y Pediatría General.

## 5.2 Descripción del caso clínico

Paciente femenina de 2 años 4 meses de edad, originaria y residente del Distrito Federal; producto de la primera gesta entre padres jóvenes no consanguíneos (Fig. 12). Madre de 23 años con hipertensión arterial de 2 años de evolución tratada con metoprolol; con buen control prenatal, tuvo infección de vías urinarias y vaginal desconociéndose trimestre, tratada con fármaco no especificado además de preeclampsia el último trimestre con tratamiento médico no especificado.

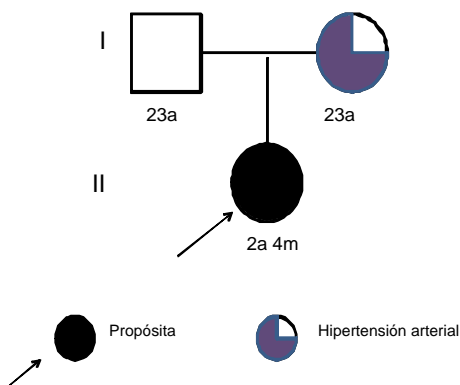


Fig.12. Árbol genealógico de la familia

Nació por cesárea por posición transversa, desproporción céfalo pélvica, preeclampsia y oligohidramnios, lloró y respiró al nacer. Apgar 7/9, peso 2.1kg, talla 44cm ( $P < 10$ ), al nacimiento se realizó diagnóstico clínico de Trisomía 21 en la Institución de donde fue referida. La paciente acude a nuestra Institución a los 2 años 4 meses de edad, se solicitó cariotipo e interconsultas para manejo multidisciplinario.

Se realizó cariotipo con bandas GTG, ante el resultado obtenido se solicitó cariotipo a ambos padres y posteriormente a familiares paternos en primero y segundo grado. Los estudios para citogenética convencional fueron realizados por la QFB. Ana Aparicio Onofre.

Se realizó técnica de FISH para comprobar las regiones involucradas en la alteración cromosómica en sangre periférica y en espermatozoides del padre, la cual fue realizada por el M. en C. Roberto Guevara Yáñez. La extracción de DNA fue realizada por la tesista y supervisada por la Bióloga Adriana Sánchez Boiso. El análisis de microsatélites para determinar el origen de la alteración numérica en la paciente fue realizado por el Dr. Javier Estrada Mena y la QFB. Alexandra Luna Angulo.

## 6. Resultados

La paciente acudió a nuestra Institución por el diagnóstico clínico de T21 y requerimiento de manejo multidisciplinario, si bien no la valoramos en la etapa de recién nacida, en base a los datos obtenidos en la historia clínica fue posible evaluar los criterios de Hall para T21 al nacimiento.<sup>40</sup>

Los criterios presentes en nuestra paciente fueron: hipotonía, hiperextensibilidad articular, piel redundante en nuca, facies plana, fisuras oblicuas hacia arriba, pabellones auriculares anormales, clinodactilia de quinto dedo y pliegue transverso.

La paciente acudió a nuestra consulta a los 2 años 4 meses de edad, se realizó una exploración clínica completa, observándose hipotonía (la cual ha mejorado de forma importante gracias a la rehabilitación), braquicefalia, epicanto, telecanto, fisuras palpebrales oblicuas hacia arriba, puente nasal ancho y deprimido, cavidad oral con mala oclusión dental, pabellones auriculares bien implantados pero más pequeños de lo normal, cuello corto, tórax con desdoblamiento de segundo ruido cardíaco, diastasis de rectos; hernia umbilical pequeña, braquidactilia, clinodactilia y pliegue transverso único, separación de primero y segundo dedos del pie.

La valoración endocrinológica diagnosticó hipotiroidismo, la valoración auditiva demostró hipoacusia conductiva superficial bilateral, el análisis cardiológico y oftalmológico estuvieron dentro de parámetros normales, se continuó rehabilitación y seguimiento pediátrico.

El resultado del análisis del cariotipo por bandas GTG en la paciente fue:

47,XX,t(1;15),+21[25]

El cual corresponde a un individuo femenino con trisomía 21 libre portador de translocación cromosómica recíproca entre los cromosomas 1 y 15, al parecer balanceada (Fig. 13).

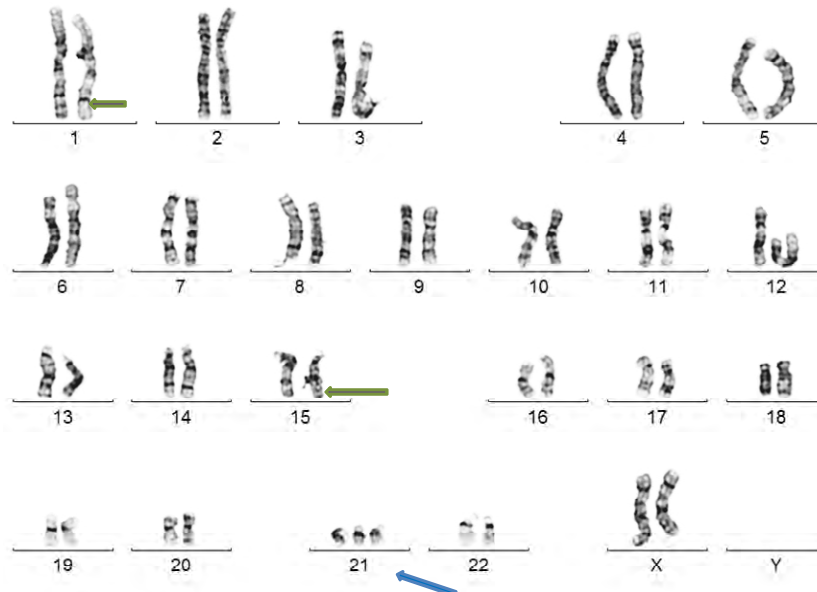


Fig. 13. Cariotipo con bandas GTG, se muestra con flechas verdes los sitios de la translocación y con flecha azul el cromosoma 21 extra.  
Cariotipo realizado por QFB. Ana Aparicio Onofre

El cariotipo de la madre fue normal, 46,XX. El cariotipo del padre fue 46,XY,t(1;15)(q32;q22), con los que se confirmó la siguiente fórmula cromosómica en la paciente:

$47,XX,t(1;15)(1pter \rightarrow 1q32::15q22 \rightarrow 15qter;15pter \rightarrow 15q22::1q32 \rightarrow 1qter)pat,+21$ .

El cariotipo de la abuela paterna fue 46,XX,t(1;15)(q32;q22) por lo que la fórmula cromosómica del padre de la propósita se confirma como:

$46,XY,t(1;15)(1pter \rightarrow 1q32::15q22 \rightarrow 15qter;15pter \rightarrow 15q22::1q32 \rightarrow 1qter)mat$

Los cariotipos del abuelo y tío paterno (Individuos II.I y III.I de Fig. 14 respectivamente) ambos fueron 46,XY. No se realizaron más estudios a otros familiares y el árbol genealógico se muestra en la Fig. 14.

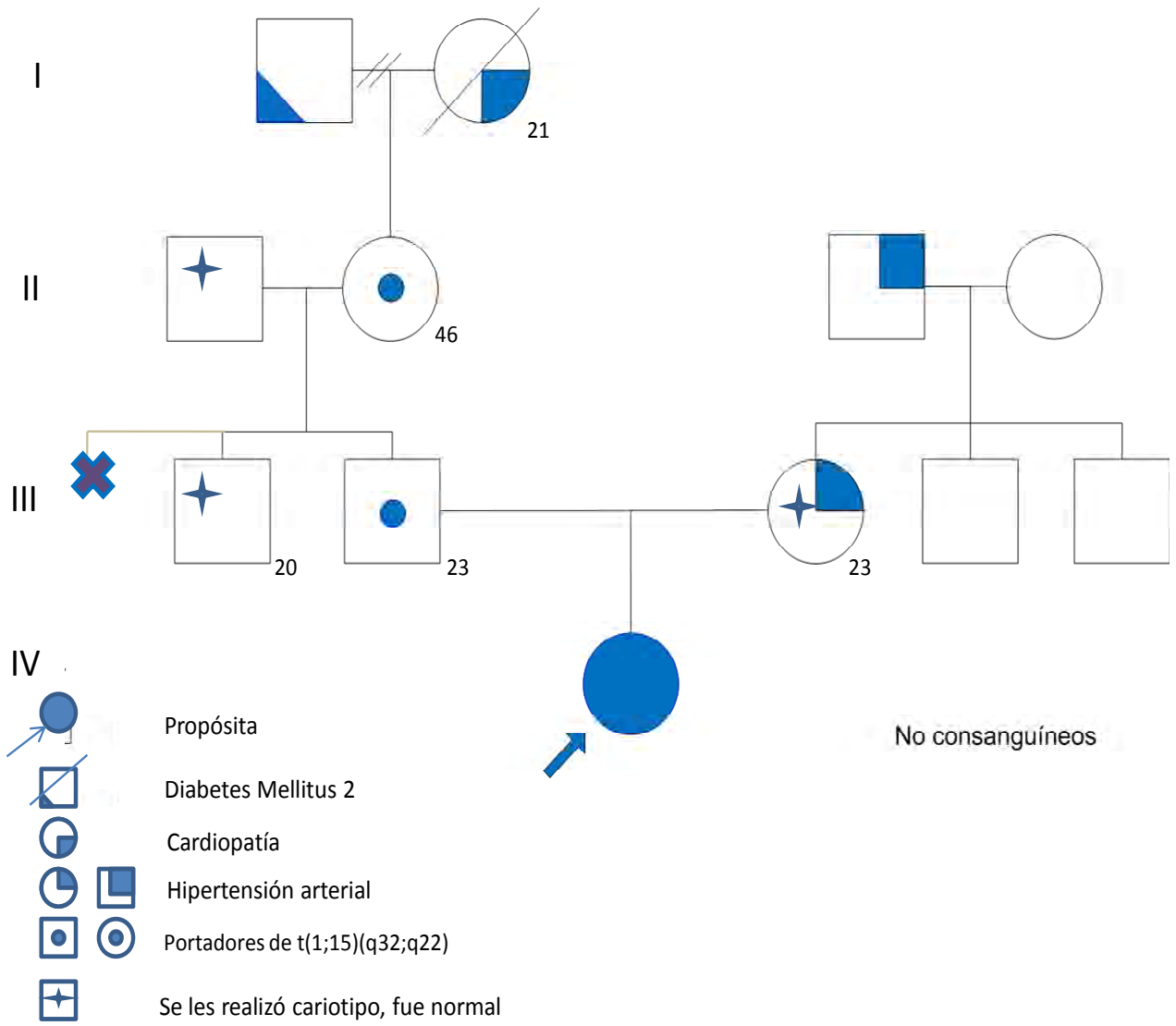


Fig. 14. Árbol genealógico

Con el resultado anterior se realizó estudio citogenético molecular por FISH (Anexo II) en muestra de sangre periférica del padre de la propósa para lo cual se utilizó la sonda de copia única LSI para el cromosoma 15 con regiones CEP15 (D15Z1) 15p11, (señal verde); LSI (D15S10)15q11-q13.1 que corresponde a la región de Prader Willi/ Angelman, (señal roja) y LSI (PML) 15q22-15qter (señal roja) de VYSIS (no. catalogo 32-190026). En el resultado de este estudio como se demuestra en la metafase de la Fig. 15 observamos un cromosoma 15, con dos señales rojas y una señal verde (Flecha blanca), otro cromosoma 15 con una señal verde y una roja (flecha roja); en el brazo largo del cromosoma 1 observamos una señal roja (flecha morada), que nos indica el fragmento translocado que corresponde a región de sonda PML (de 15q22-15qter).

La fórmula cromosómica con análisis de FISH del paciente III.II de la Fig. 14 es:

46,XY,t(1;15)(q32;q24)[25].isht(1;15)(PML+;D15Z1+,D15S10+)[25].

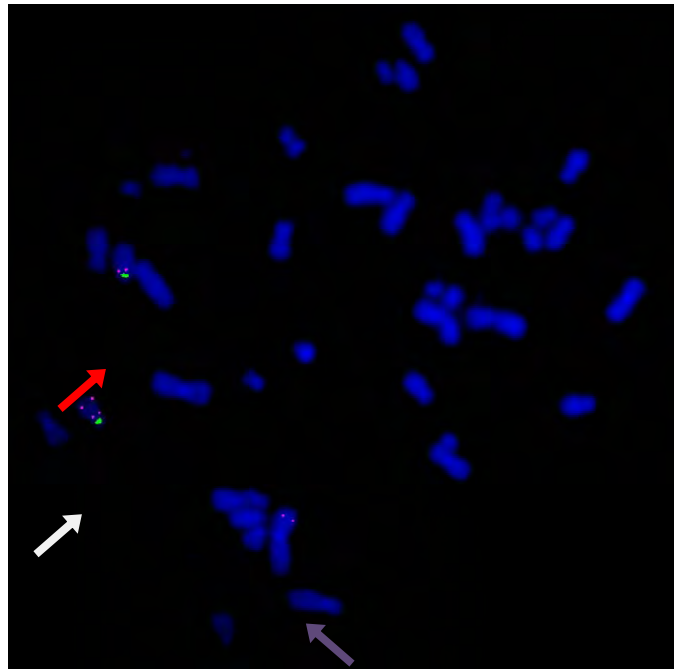


Fig. 15. FISH en una metafase del padre de la propósa la descripción de la imagen se explica en el texto.

Se realizó estudio por FISH en muestra de esperma del padre para determinar el porcentaje de alteraciones detectables por las sondas utilizadas para el esperma LSI del cromosoma 15 y CEP (DXZ1) alfa satélite del cromosoma X en verde y CEP del cromosoma Y (DYZ3) alfa satélite en rojo. Se puede observar en la Fig. 16 un incremento en el número de señales en algunos núcleos de cabezas de espermatozoides, ya que esperaríamos encontrar en cada núcleo una señal rojo intensa (Y) o una señal verde intensa (X), una señal verde menos intensa, seguida de dos señales rojas poco intensas (cromosoma 15).

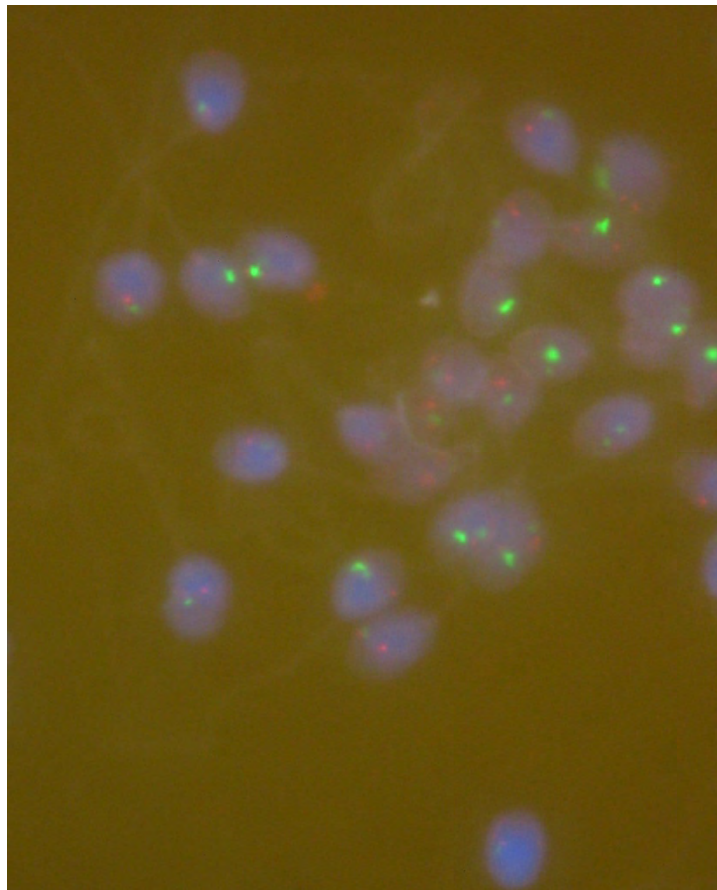


Fig. 16. FISH en esperma; la señal del cromosoma X se observa como una señal verde intenso, la señal del cromosoma Y se observa como una señal rojo intenso, la señal de LS1 se observa como una señal verde pequeña en p11, una señal rojo poco intensa en q11-q13 y otra señal rojo poco intensa en q22.



Para determinar la posible existencia de un efecto intercromosómico por efecto de la translocación, se extrajo DNA de 4 pacientes (mamá, papá, propósa y abuela paterna). Se obtuvo DNA con las siguientes características:

Muestra	Concentración DNA ng/UI	Pureza
<b>1 DNA propósa</b>	513.87	1.86
<b>2 DNA madre</b>	498.82	1.87
<b>3 DNA padre</b>	371.16	1.93
<b>4 DNA abuela</b>	442.41	1.88

El DNA de la propósa y sus padres fue utilizado para hacer determinación por microsatélites del origen parental de los cromosomas 21 de la trisomía libre. El DNA microsatélite está constituido por secuencias de repetidos cortos de 1-5pb, distribuidas a lo largo de todo el genoma, se utilizan como marcadores genéticos debido a que son abundantes, codominantes, altamente polimórficos y están ubicados en regiones eucromáticas del genoma. Se obtuvieron los siguientes resultados: la hija hereda el STR 29.2 del padre y 29 y 32.2 de la madre, por lo tanto la madre es quien proporciona la trisomía por lo que se deduce que es derivado de un error en la meiosis I dando como resultado el cromosoma 21 extra en la paciente (Fig. 17 y 18).

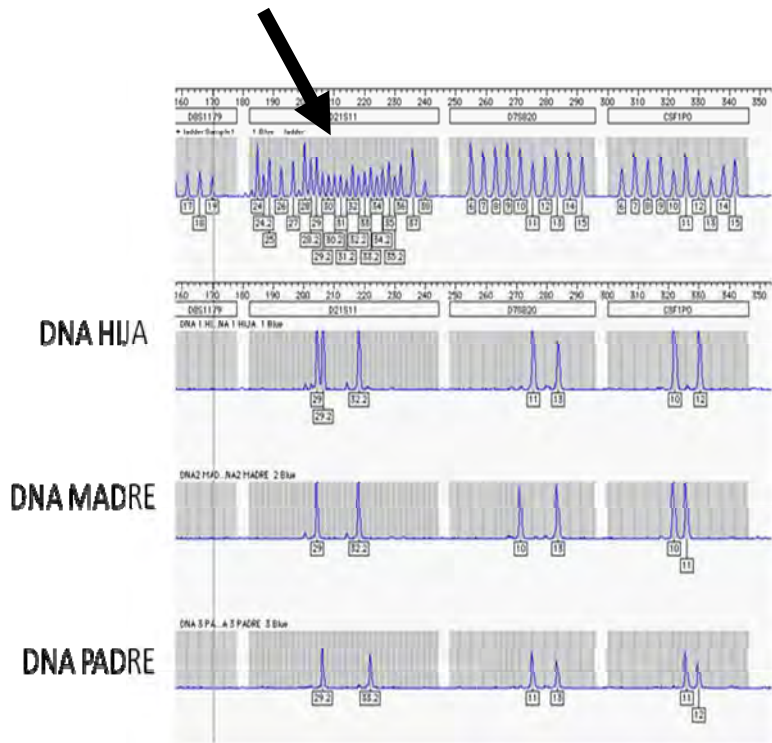


Fig. 17. El STR que corresponden al cromosoma 21 se denomina D21S11(flecha negra)  
 La hija hereda el STR 29.2 del padre y 29 y 32.2 de la madre  
 Por lo tanto la madre es quien proporciona la trisomía. Los otros paneles corresponden a otros marcadores localizados en otros cromosomas para los cuales la paciente es disómica al igual que sus padres y que se corrobora que sí es hija de ellos.

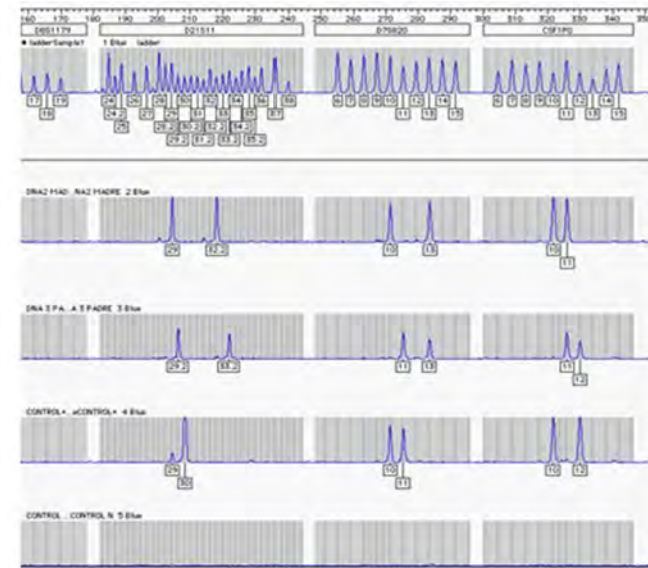


Fig. 18. Se muestran en la parte inferior los controles positivos y negativo.  
 El control positivo proviene de una persona no relacionada con la familia y el control negativo es todo el proceso sin DNA pon en el margen igual a que corresponde cada muestra para poder igualmente analizar el resultado.

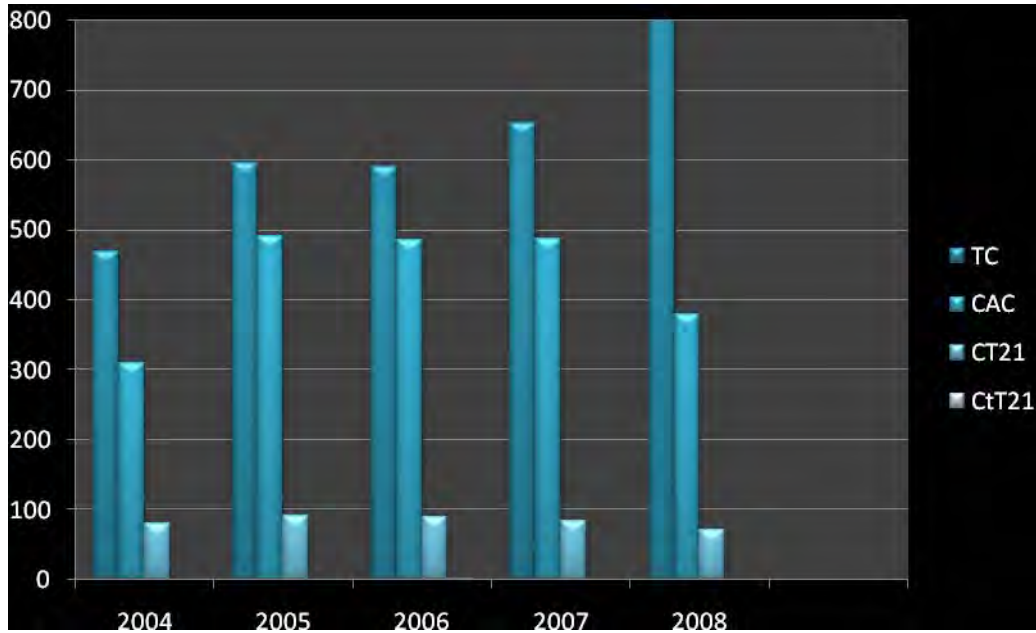
## 7. Discusión

En esta tesis se presenta el caso de una paciente con fenotipo clásico de T21 libre portadora de  $t(1;15)(q32;q22)$  familiar, la cual fue identificada al realizar el estudio genético integral de la paciente. Si bien la T21 es la trisomía no mosaico más frecuentemente diagnosticada en el ser humano, su asociación con otra alteración cromosómica numérica o estructural como una translocación recíproca balanceada, es particularmente rara con solo algunos casos reportados en la literatura.<sup>17,41</sup> Hasta donde sabemos este es el primer caso de T21 y  $t(1;15)$  familiar reportado a la fecha.

En el Servicio de Genética del Hospital Infantil de México Federico Gómez se realizó un promedio de 634 cariotipos por año en los últimos 5 años; de los cuales un promedio de 430 cariotipos mostraron alteraciones cromosómicas. De las alteraciones cromosómicas detectadas, la T21 es la más frecuente y en la mayoría de los casos corresponde a una T21 libre. De acuerdo a la literatura internacional el cromosoma 21 extra proviene más frecuentemente de una no disyunción materna<sup>40</sup>, este también fue el caso de nuestra paciente. Lo anterior está en concordancia con la literatura ya que el 95% de los casos de T21 resultan de la adquisición de un cromosoma 21 extra.<sup>4,7,37</sup> En los estudios del periodo de 2004 a 2008 el único caso en que se encuentra asociada la T21 a otra alteración cromosómica, es el de la paciente que se describe en este trabajo, con lo que se confirma la baja frecuencia de que se encuentren dos alteraciones cromosómicas en un mismo individuo como se describe en la literatura<sup>31</sup> y la importancia de su estudio.

La paciente no acudió a nuestra Institución desde el nacimiento, pero con los hallazgos encontrados al momento de la exploración y con lo interrogado en la Historia clínica se puede concluir que presentaba 8 de los 10 criterios de Hall, por lo cual desde el nacimiento se diagnosticó la T21.

Tabla 5. Estudios citogenéticos realizados en el departamento de Genética del Hospital Infantil de México Federico Gómez en los últimos 5 años



TC: Total de cariotipos, CAC: Cariotipos con alteración cromosómica, CT21: Cariotipos con trisomía 21 (regular, mosaicos y translocaciones robertsonianas), CtT21: Cariotipos con trisomía 21 y otra alteración cromosómica asociada. En los últimos 5 años solo hay un caso de Trisomía 21 y alteración cromosómica (la propósita)

Tabla 6. Relación de criterios de Hall y características encontradas en la propósita

Característica	Porcentaje	Paciente
Hipotonía	80%	✓
Reflejo Moro ↓	85%	
Hiperlaxitud articular	80%	✓
Piel redundante en cuello	80%	✓
Perfil plano	90%	✓
FP hacia arriba	80%	✓
Anomalía pabellones auriculares	60%	✓
Displasia pélvica	70%	
Clinodactilia 5º dedo	16%	✓

Pliegue único	45%	✓
---------------	-----	---

La revisión del fenotipo de la paciente fue cuidadosa para descartar un fenotipo de T21 modificado por la presencia de la  $t(1;15)$ , situación que fue descartada ya que el fenotipo de la paciente fue el clásico esperado en la T21. La propósita presentó: 1) hipotonía, 2) piel redundante en la parte posterior de cuello, 3) perfil plano.

Estas características han sido descritas en los pacientes con T21, la hipotonía se encuentra en el 90% de los casos, no sólo al momento del nacimiento, si no también en años posteriores. La piel redundante en la parte posterior del cuello, es muy importante sobre todo a nivel prenatal y neonatal ya que por medio de la translucencia nuchal por ultrasonido en la semana 11 a 13.6 de gestación y posteriormente la medición del pliegue nuchal en el segundo trimestre del embarazo se pueden calcular riesgos para T21 en fetos, posteriormente este sólo queda como cuello corto. En cuanto al perfil plano, éste se encuentra en el 80% de los pacientes con T21, se debe a hipoplasia malar y condiciona infecciones frecuentes de vías respiratoria.<sup>40,42</sup>

Es importante realizar potenciales evocados auditivos anualmente para evaluar la audición.<sup>40</sup> La hipoplasia malar y el mentón pequeño se deben a un defecto de migración y proliferación de precursores de la mandíbula relacionados con respuesta alterada a *Sonic Hedgehog*.<sup>42</sup> La paciente presenta fisuras palpebrales hacia arriba, clinodactilia y el pliegue transversal único, además de pabellones auriculares pequeños, todos los datos anteriores son característicos de T21.

Si bien el diagnóstico de T21 es clínico, es indispensable realizar cariotipo para determinar la presencia del cromosoma 21 extra ya sea por no disyunción, translocación, mosaicismo, isocromosoma de 21q o duplicación de la región crítica 21q22 (siendo los tres primeros las causas más frecuentes) y así poder otorgar un asesoramiento genético adecuado.

La translocación encontrada en este caso no tiene un efecto fenotípico en el padre y tampoco en la abuela paterna de la paciente, por lo que debe ser balanceada al igual que en la propósita ya que ella presenta solamente un fenotipo clásico de T21 sin otros datos adicionales.

En relación a los cromosomas involucrados en esta translocación debemos considerar que el cromosoma 1 es el cromosoma más grande de los cromosomas humanos, abarca 300 Mb de DNA que constituye 10% del genoma humano. Cuando hay ganancia del cromosoma 1 completo o una delección importante es incompatible con la vida (por la cantidad de genes involucrados).<sup>43</sup> Se ha descrito un síndrome de trisomía parcial de 1q41 cuyas principales características son bajo peso al nacimiento, megalencefalia, fontanela anterior grande, frente prominente, hipertelorismo, epicanto, alteraciones oculares, nariz pequeña, puente nasal plano, oídos malformados, micrognatia, cuello corto, piel redundante en nuca, dedos largos, sobreposición de dedos, pliegue palmar único, enfermedad cardíaca congénita, alteraciones gastrointestinales, alteraciones renales, malformación de tracto urinario, muerte perinatal, retraso en el crecimiento y retraso mental, los cuales no están presentes en nuestra paciente. Las características del síndrome de trisomía parcial del 1 que coinciden en la paciente son las que se sobrelapan con la trisomía 21 como son epicanto, retraso mental, cuello corto y piel redundante en nuca (Fig. 19). Los productos probables de una translocación son en la

segregación 2:2 en la alterna un gameto normal y uno portador de la translocación, el resultado de la adyacente uno son trisomias parciales de uno de los cromosomas con monosomía parcial del otro cromosoma y para adyacente dos son monosomías casi completas con trisomías casi completas, los productos de la segregación adyacente 1 y 2 por lo general son incompatibles con la vida debido a la pérdida o ganancia de material genético muy importante, así como los productos de la segregación 3:1 y 4:0 son incompatibles con la vida, por lo que los únicos productos que vemos en la familia son los provenientes de una segregación alterna.

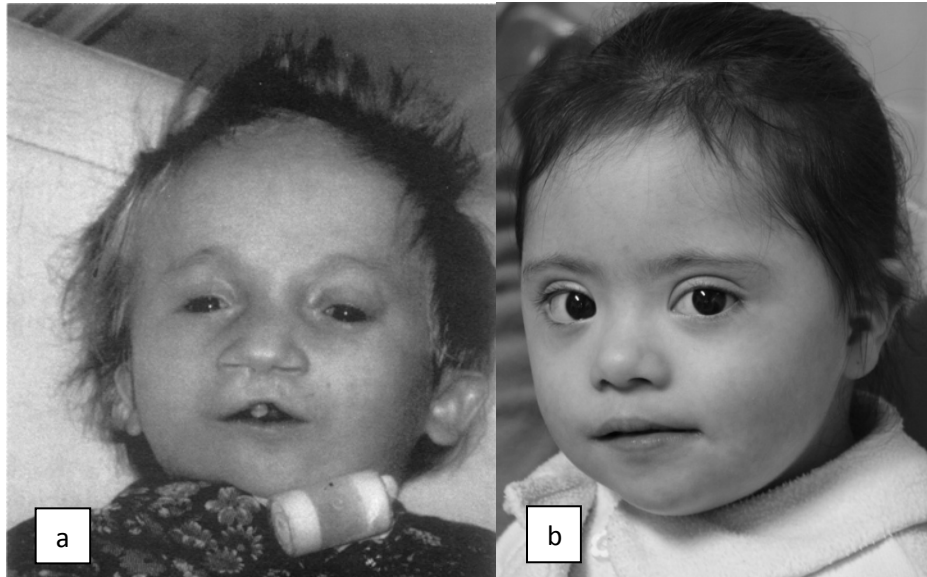


Fig. 19. a) paciente con trisomía parcial de 1q. b) Propósito con fenotipo trisomía 21  
Figura a modificada de Bartsch C. 2001.<sup>43</sup>

Por otra parte el cromosoma 1 en la región 1q32 es loci de diversos genes, algunos de los cuales han sido relacionados con patologías como lo son el gen *REN* asociado con hiperproteinemia, así como los genes *HHAT* y *LAMB3* relacionados al Síndrome hemolítico urémico.<sup>54</sup> Así mismo hay muchos genes en el cromosoma 15 en el punto de ruptura 15q22, algunos de ellos también relacionados con enfermedad como lo son los genes *PML* relacionado con leucemia promielocítica aguda y el gen *USH1H* relacionado con Síndrome de Usher tipo 1H.<sup>54</sup> Si bien éste cromosoma presenta una alta densidad génica, aparentemente ni el padre ni la abuela tienen características clínicas que nos sugieran que la translocación o el punto de ruptura influya en el fenotipo. Los estudios citogenéticos habituales con bandas GTG y moleculares con FISH corroboraron las regiones en los cromosomas involucrados.

Esta situación es importante ya que al ser el padre portador de una translocación balanceada, este rearrreglo debe ser considerado en el asesoramiento genético, dado que de acuerdo a su segregación meiótica pueden generar gametos balanceados y desbalanceados.

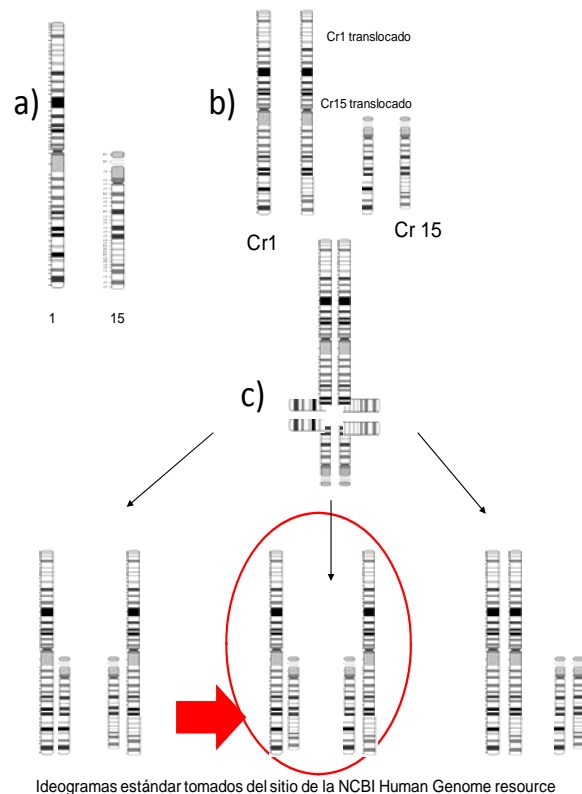


Fig.20. Cruz de paquiteno para  $t(1;15)(q32;q22)$

a) Idiograma de cromosoma 1 y 15

b) El cromosoma 1 se muestra de color rojo y el 15 de color verde.

c) Se muestran los cromosomas translocados y la cruz de paquiteno, con un círculo y flecha roja se observa la segregación alterna (producto de la cual fue obtenida la propóstita)

Como se observa en la Fig. 20, los productos de la segregación alterna tendrán un complemento cromosómico normal o serán portadores de translocación balanceada como es el caso de nuestra paciente y su padre y por ello era de esperarse que su desarrollo fuera normal; también existe la posibilidad que sean portadores sin fenotipo relacionado con la  $t(1;15)$ , que en relación a portadores de translocaciones balanceadas ha sido reportada como la segregación más frecuente en la literatura.<sup>12,27,43,46,47</sup>

Los productos derivados de la segregación adyacente 1 tendrán trisomía parcial de 1q32 y monosomía parcial de 15q22, la otra posibilidad es monosomía parcial de 1q32 y trisomía parcial del 15q22. En ambos casos es altamente probable que fueran abortos espontáneos y se aborten tempranamente o incluso ni siquiera se implanten.

Los productos derivados de la segregación adyacente 2 serán por una parte una trisomía del cromosoma 1 con monosomía del 15, la cual es mucho mayor que la observada en la adyacente

1 y podría considerarse incluso la no implantación del embrión. La otra posibilidad es la trisomía casi completa del 15 con monosomía de gran parte del 1, igualmente grave.

De esta manera, analizando las probabilidades de segregación de la  $t(1;15)$  parecería tener la posibilidad de productos normales, productos portadores de la translocación y pérdidas tempranas de productos anormales ya sea por trisomía o monosomía del 1 o del 15 que exista la posibilidad que se presenten clínicamente como abortos recurrentes o infertilidad. En este caso no hay antecedentes familiares de abortos o de productos malformados, solo encontramos productos de la segregación alterna como lo son la propósita, su padre y la abuela paterna, y productos normales como lo es el tío paterno de la propósita. Con lo cual solo tenemos productos derivados de una segregación alterna.

Los productos de concepciones trisómicas autosómicas generalmente se abortan en el primer trimestre del embarazo. La trisomía del cromosoma 15 es causante del 7.6% de los abortos espontáneos trisómicos y para el 1.68% de las pérdidas del primer trimestre. La trisomía parcial del 15 presenta un fenotipo característico.<sup>44</sup>

Se han reportado casos similares a nuestra familia con portadores balanceados fenotípicamente sanos, en el estudio realizado por Baptista y colaboradores<sup>45</sup> se describe a 13 individuos fenotípicamente normales portadores de translocaciones balanceadas, 10 mujeres y 3 varones. El análisis incluyó cariotipo, FISH y CGH. Interesantemente 2 de los pacientes tenían una translocación que involucraba al cromosoma 1 (y ninguno al cromosoma 15). Un portador de  $t(1;11)$  y una portadora de  $t(5;8)$  tenían historia familiar de T21, aparentemente libres. Junto con la translocación se observó también que en sólo 2 de los 13 pacientes los puntos de ruptura provocaban una disrupción en genes<sup>45</sup>; en el resto de los pacientes la translocación no les confería efecto fenotípico.

Lo anterior nos lleva a dos consideraciones para el asesoramiento genético, la primera es determinar los riesgos para esta pareja de tener productos con complemento cromosómico anormal derivados de la segregación de la  $t(1;15)$  y en segundo lugar el posible efecto inter cromosómico descrito en algunos casos.

En relación al primer punto, el cual es fundamental para el asesoramiento genético, como se ha descrito los portadores de translocaciones forman un cuadrivalente para apareamiento cromosómico para poder recombinar y segregar, siendo por lo general la segregación alterna la más frecuente, aunque siempre hay que tomar en cuenta que el tipo de segregación depende de los cromosomas y los fragmentos involucrados, así como de los sitios en donde se realice la recombinación.

La segunda consideración para el asesoramiento genético es la presencia de un posible efecto inter cromosómico en pacientes portadores de translocaciones balanceadas que causen no disyunción. Se ha propuesto que fallos en la sinapsis llevan a arresto meiótico, que puede ser rescatado a través de heterosinapsis; por razones que aún no se conocen bien, después de salir de esta etapa de arresto en el punto de control de la transición metafase-anafase, los quiasmas



se resuelven y la célula salta a la citosinesis, originándose así un esperma disómico que al fecundar a un ovocito da origen a un producto trisómico.<sup>31</sup> Esta teoría a su vez podría ser una explicación del incremento de fetos trisómicos en productos de concepciones de portadores de translocaciones balanceadas.

Además, para el asesoramiento genético deben considerarse los riesgos para productos con T21. La T21 es causada en un el 95% de los casos por adquisición de un cromosoma 21 extra, el 4% por translocación robertsoniana, 1% restante por mosaicismo y otras causas son raras.<sup>17</sup> Las translocaciones recíprocas que involucran autosomas diferentes al cromosoma 21 en asociación con T21 son poco frecuentes.<sup>17</sup>

La no disyunción es un evento bien conocido causante de la T21, el 80% de los casos es de origen materno, generalmente por error en meiosis I y se relaciona con edad materna. Si bien el riesgo para población general es de 1% con 1/650 RNV con T21 en México<sup>40</sup>, cuando la madre de la paciente concibió tenía un riesgo por edad para T21 de 1 en 1527<sup>42</sup>. Para calcular el riesgo de recurrencia de otro hijo con Trisomía 21 tendríamos que calcularlo dependiendo de la edad materna a la concepción (e incluso la semana de gestación a la cual se nos consulta) ya que este riesgo se va modificando.

Por otra parte la presencia de T21 libre con una translocación balanceada se ha intentado explicar por la presencia de efecto inter cromosómico,<sup>27,28,30,46</sup> el cual se refiere a la presencia de alteraciones en cromosomas que no están involucrados en la translocación, en pacientes portadores de translocaciones balanceadas.

El efecto inter cromosómico es un evento bien establecido en organismos como ratones y la *Drosophila*, aunque no se ha podido corroborar su presencia en humanos, ya que la evidencia es contradictoria.<sup>27,31,46</sup> Se ha reportado el incremento de disomía para el cromosoma 21 por posible efecto inter cromosómico en pacientes portadores de translocación t(3;15).<sup>31</sup> Por otra parte se ha considerado que el incremento en el riesgo de aneuploidías puede ser el resultado de oligoastenospermia severa y no tanto la presencia de la alteración cromosómica concomitante.<sup>31</sup>

En este respecto se ha demostrado incremento de disomías en pacientes portadores de al menos 4 tipos de translocaciones: t(14;21) (aparte del riesgo para T21 por translocación), t(2;14), t(6;11) y t(7;8), el análisis de FISH en espermatozoides de pacientes portadores de translocaciones vs grupo control (sin translocación), demostró una mayor frecuencia de diploidía y aneuploidía en los primeros, con lo cual se establece una relación entre la calidad del semen y eventos de no disyunción.<sup>47</sup> En un estudio realizado en 9 pacientes portadores de translocaciones comparados contra 3 controles, se observó en general un incremento en susceptibilidad para no disyunción de cromosoma 21 y X en portadores y no portadores de translocaciones<sup>47</sup>, es decir, que aquí NO se encontró diferencia entre los grupos.

Así mismo se han realizado diversos estudios en el esperma de hombres portadores de translocaciones balanceadas, demostrando que del 19-77% de los espermatozoides son

desbalanceados, en otros estudios van del 37-91%, incluso en un estudio de 4 miembros de una familia con translocación t(15;17) el 50% de los espermatozoides eran cromosómicamente desbalanceados. Estos estudios nos demuestran que el riesgo de desbalance meiótico está determinado principalmente por las características de los cromosomas involucrados y los puntos de ruptura. Muchos de los productos desbalanceados no son compatibles con la vida, la frecuencia de desbalances cromosómicos provenientes de translocaciones paternas es de 12%.<sup>50</sup>

Al padre de nuestra paciente se le realizó FISH en esperma con el objeto de evaluar formas estructurales anormales y estimar la posibilidad de un efecto intercromosómico. El estudio demostró aparentemente un incremento en el porcentaje de espermatozoides estructuralmente anormales y portadores de alteraciones cromosómicas para cromosomas sexuales y espermatozoides portadores de la translocación, lo cual apoyaría un efecto intercromosómico durante la espermatogénesis. Se requiere analizar 10, 000 núcleos para dar un resultado certero y este estudio se encuentra aún en progreso.

Para estudiar esta situación y saber cómo podría afectar el asesoramiento genético ya que la literatura no es concluyente al respecto, se decidió determinar el origen del cromosoma 21 libre de la paciente por el estudio de microsatélites de los padres y de la paciente, poniendo especial atención a los microsatélites del cromosoma 21, estudio que demostró que el cromosoma 21 extra era de origen materno, con lo cual se descartó la presencia de un efecto intercromosómico, aunque es importante considerar que a pesar de que en este caso el cromosoma extra fue de origen materno no se puede descartar que exista un efecto intercromosómico en algunos casos.

En relación a ésta consideración y como se mencionó anteriormente, en la mayoría de los casos de T21 el cromosoma 21 extra es resultado de una no disyunción en Meiosis I materna, entre los factores principales que se han considerado para tratar de explicar este fenómeno, se encuentran: 1) la edad materna avanzada (por una depleción de la reserva de ovocitos), 2) el acumulo de efectos tóxicos del ambiente durante el arresto del ovocito, 3) degradación de la maquinaria meiótica así como por cambios en la función ovárica secundarios a una señalización hormonal disminuida y degradación del ambiente uterino. Sin embargo debemos recordar que la madre de nuestra propósita es una persona joven de 21 años a la edad de la concepción, con lo cual no se apoya la hipótesis de no disyunción por edad materna avanzada, pero hay otros puntos a considerar como el que se ha estudiado que otro factor importante para la presencia de aneuploidías son tanto los patrones como los sitios de recombinación (siendo los intercambios pericentroméricos y teloméricos los sitios más susceptibles para aneuploidía). Por lo que para tener una segregación adecuada influye tanto lo que ocurrió in útero como los efectos posteriores de la edad. Se ha descrito que estos sitios de intercambio susceptibles a aneuploidía son más frecuentes en mujeres jóvenes que en mujeres con edad materna avanzada, así que a pesar de que la maquinaria meiótica tiene un funcionamiento óptimo, los patrones de intercambio entre los ovocitos son más susceptibles a cambios en su configuración.

<sup>51,52</sup> La mayoría de los niños con T21 de madres jóvenes provienen de cromosomas que no

recombinaron y por lo tanto fueron aquiasmáticos. Además, los puntos de control en meiosis femenina no son tan estrictos como en meiosis masculina.<sup>51,52</sup>

Otros factores que han intentado explicar la presencia de no disyunción en MI materna son radiación, tabaquismo, anticonceptivos orales, hábito alcohólico, diabetes materna, etc. aunque no se han podido relacionar directamente y en este caso no tenemos ninguno de estos antecedentes en la madre.<sup>51,52</sup>

Por lo cual se considera que si bien la edad materna estaba en los rangos idóneos para la concepción y al igual que en el 80% de los casos la no disyunción fue de origen materno. Esta situación no apoya un efecto intercromosómico en relación a no disyunción, si el cromosoma 21 extra hubiese sido de origen paterno, hubiera podido postularse que el efecto intercromosómico sería evidente también en relación al cromosoma 21 a pesar de que en el FISH en espermatozoides encontramos mayor número de espermatozoides anormales para cromosomas sexuales, en este caso se asoció a un ovocito disómico para el cromosoma 21.

A este respecto podríamos considerar la siguiente situación: ¿En qué momento de la meiosis (I ó II) se produjo la no disyunción de los cromosomas 21 maternos?. En relación a este punto y basados en el resultado de los análisis por microsatélites, puede considerarse que se trata de un evento de no disyunción ocurrido en meiosis I materna. Lo anterior se define al contar con el resultado de que la madre quien tiene los alelos 29 y 32.2 del STR del cromosoma 21 estudiado (DS21s11) y el padre tiene el alelo 29.2, la paciente tiene los alelos 29, 29.2 y 32.2. Lo cual indica que ambos alelos maternos (29 y 32.2) están presentes en la paciente, lo que a la vez señala que los dos cromosomas 21 maternos se encontraban en el ovocito, por lo que se trata de un error en la segregación de los cromosomas homólogos durante la primera división meiótica.

Hasta donde sabemos, el único reporte parecido al que se describe en esta tesis de una translocación cromosómica familiar asociada a T21 es el de Pazarbasi y colaboradores<sup>51</sup>. En este caso al igual que en el nuestro se identificó la t(12;16) en la madre en el cariotipo de un recién nacido con T21, los padres tenían el antecedente de 10 embarazos, (3 abortos, 2 hijos portadores balanceados, 5 hijos fenotípicamente normales sin translocación y el paciente); los productos desbalanceados de la translocación se implantaron, pero no fueron viables. En este caso la madre tenía 36 años y el padre 37 con riesgo para T21 de 1 en 280, en este caso no se determinó de quien provenía el cromosoma 21 extra pero se discute acerca del efecto intercromosómico.<sup>53</sup>

En esta tesis se enfatizan los siguientes puntos:

Se presenta el caso de una familia con translocación (1;15) diagnosticada por el estudio integral de una paciente con T21.

Se subraya la importancia del abordaje integral de los pacientes con T21 con realización de cariotipo para asesoramiento genético.

Se describen las posibilidades de segregación de la translocación en la familia así como el posible efecto fenotípico de cada caso. Se estableció que en relación a la t(1;15), el complemento cromosómico de la paciente correspondió a una segregación alterna.

Se discutió el efecto intercromosómico que ha sido debatido en la literatura en relación a la presencia de T21 y t(1;15) en esta familia, si bien se encontró un mayor número de alteraciones en espermatozoides, no se demostró que hubiese un efecto intercromosómico para la no disyunción del cromosoma 21 extra ya que éste fue de origen materno.

Con base a los estudios descritos se otorgó asesoramiento genético a la familia, tanto para los riesgos de aneuploidías, en particular Síndrome de Down, como para los portadores balanceados de la t(1;15).

## 8. Bibliografía

1. Trask JB (2002) Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting. *Nat Rev Genet* **3**: 769-78.
2. Miller O, Therman E. Human chromosomes. 4<sup>a</sup> ed. Nueva York. Springer-Verlag; 2001. p187-89, 239.
3. [www.ensembl.org/Homo\\_Sapiens](http://www.ensembl.org/Homo_Sapiens).
4. Rimoin D, Connor J, Pyeritz R, Korf B. Principles and practice of medical genetics. 5<sup>a</sup> ed. USA. Elsevier Ltd; 2007. p31-33.
5. Oliver JR (2006) Chromatine structure in the genomics era. *Trends Genet* **23**: 67-73.
6. Reece W (2004) Analysis of Genes and Genomes. 1<sup>a</sup> ed. USA. John Wiley & sons. p110-30.
7. Doenecke D (2005) Histones: From Gene Organization to Biological Roles. In: ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES. John Wiley & sons, Ltd: Chinchester <http://www.els.net/> [doi:10.1038/npg.els.001154].
8. Woodcock LCV (2006) Chromatin architecture. *Curr Opin Struct Biol* **16**:213-20.
9. Polo ES, Almouzni G (2006) Chromatin assembly: A basic recipe with various flavors. *Curr Opin Genet & Dev* **16**:104-11.
10. Strachan T, Read A. Genética Humana. 3<sup>a</sup>ed. México; Mc.Graw Hill-Interamericana; 2006. p34-51, 240-68.
11. Hizume V K (2007) Topoisomerase II, scaffold component, promotes chromatin compaction in vitro in a linker-histone H1-dependent manner. *Nucleic Acids Res* **35**: 2787-99.
12. Schueler GM (2006) Structural and Functional Dynamics of Human Centromeric chromatin. *Anu Rev Genomics Hum Genet* **7**:301-15.
13. Baird MD (2006) The organization and function of chromosomes. *EMBO reports* **7**: 372-376.
14. Bailey MS (2006) Telomeres, chromosome instability and cancer. *Nucleic Acids Res* **34**: 2408-17.
15. Bishop KD (2006) Meiotic Recombination Pathways. In: ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES. John Wiley & sons, Ltd: Chinchester <http://www.els.net/> [doi:10.1038/npg.els.0003875].
16. Champion M (2002) Playing for half the deck: The Molecular biology of meiosis. *Fertility Supplement Nat Cell Biol & Nat Med* **4**: 1-11.
17. Cyrus C (2007) A de novo reciprocal t(2;18) translocation with regular trisomy 21. *Genet Test* **11**:459-62.
18. Sharkey, FQ (2005) Chromosome analysis what and when to request. *Arch Dis Child* **90**: 1264-69.
19. *ISCN (2005): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, Shaffer L.G., Tommerup N (eds); S. Karger, Basel 2005.

20. Epstein C. The Consequences of Chromosome Imbalance. 1<sup>a</sup> ed. USA; Cambridge University Press; 2007.p3-6. 253-59.
21. Wiseman KF (2009) Down Syndrome: Recent progress and future prospective. *Hum Mol Genet* **18**: 34-37.
22. Patterson D (2005) Down syndrome and genetics - a case of linked histories. *Nat Rev Genet* **6**: 137-47.
23. Tybulewicz LJ (2006) New techniques to understand chromosome dosage: mouse models of aneuploidy. *Hum Mol Genet* **15**: 121-32.
24. Yoda K (2004) Centromere identity originates in the structure of CENPA/ H4 tetramer itself: a mechanism of aneuploidy. *The Lancet* **364**: 1022-24.
25. Bonet O, Navarro (2002) Aneuploid and unbalanced sperm in two translocation carriers: evaluation of the genetic risk. *Mol Hum Rep* **8**: 958-63.
26. Pujol A, Benet J (2006) The importance of aneuploidy screening in reciprocal translocation carriers. *Reproduction* **131**: 1025-35.
27. Benet J, Oliver M, Bonet O (2005) Segregation of chromosomes in sperm of reciprocal translocation carriers: a review. *Cytogenet Genome Res* **111**: 281-90.
28. Miluse V, Oracova E (2008) Sperm fluorescence *in situ* hybridization study of meiotic segregation and interchromosomal effect in carriers of t(11;18). *Hum Rep* **23**: 581-88.
29. Martin RH (2008) Meiotic errors in human oogenesis and spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* **4**: 523-31.
30. Gianaroli L (2002) Possible interchromosomal effect in embryos generated by gametes from translocation carriers. *Hum Rep* **17**:3201-07.
31. Blanco J (2000) Interchromosomal effects for chromosome 21 in carriers of structural chromosome reorganizations determined by fluorescence in situ hybridization on sperma nuclei. *Hum Genet* **106**: 500-5.
32. Simon T, Jacobs P (2006) Parental and chromosomal origin of unbalanced de novo structural chromosome abnormalities in man. *Hum Genet* **177**: 531-45.
33. Ciccone R, Giorda R (2005) Reciprocal translocations: a trap for cytogenetists?. *Hum Genet* **117**:571-582.
34. Wiland E (2006) The analysis of meiotic segregation patterns and aneuploidy in the spermatozoa of father and son with translocation t(4;15)(p15.1;p12) and the prediction of the individual probability rate for unbalanced progeny at birth. *J of Androl* **28**:262-72.
35. Blennow E (2005) Banding Techniques. In: ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES. John Wiley & sons, Ltd: Chinchester <http://www.els.net/> [doi:10.1038/npg.els.0005777].
36. Moore MC (2001) Chromosome Preparation and Banding. In: ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES. John Wiley & sons, Ltd: Chincgester <http://www.els.net/> [doi: 10.10381npg.els.0005776].
37. Salman M, Jhanwar SC (2004) Will new cytogenetics replace the old cytogenetics?. *Clin Genet* **66**: 265-75.
38. American College of Medical Genetics Guideline on the cytogenetic evaluation of the individual with developmental delay or mental retardation, **9**:650-54.

39. Eichenlaub RU (2006) Gender differences in germ-cell mutagenesis and genetic risk. *Environment Res B* **104**:22-36.
40. Lineamiento técnico de Atención Integral de la persona con Síndrome de Down, (2007) Secretaría de Salud México.
41. Lindenbaum RH (1985) The prevalence of translocations in parents of children with regular trisomy 21: a possible interchromosomal effect?. *J Med Genet* **22**: 24-28.
42. Nicolaidis (2004) La ecografía de la semana 11-13.6. *Fetal Medicine foundation*.
43. Bartsch C (2001) Duplication dup(1)(q32-q44) detected by Comparative Genomic Hybridization (CGH): Further Delineation of Trisomies 1q. *Fetal Diagn* **16**: 265-73.
44. Prontera P (2006) Trisomy 15 mosaicism owing to familial reciprocal translocation t(1;15): implication for prenatal diagnosis. *Prenatal Diagn* **26**:571-76.
45. Baptista J (2005) Molecular cytogenetic analyses of breakpoints in apparently balanced reciprocal translocations carried by phenotypically normal individuals. *Eur J Hum Genet* **13**: 1205-12.
46. Anton E (2008) Reciprocal translocations: tracing their meiotic behavior. *Genet Med* **10**: 730-8.
47. Anton E (2007) Role of sperm FISH studies in the genetic reproductive advice of structural reorganization carriers. *Hum Rep* **22**: 2088-99.
48. Pellestor F (2001) Study of the occurrence of interchromosomal effect in spermatozoa of chromosomal rearrangement carriers by fish and primed in situ labelling techniques. *Human reproduction* **16**:1155-64.
49. Gianaroli L (2002) Possible interchromosomal effect in embryos generated by gametes from translocation carriers. *Hum Rep* **17**: 3201-07.
50. Martin RH (2008) Cytogenetic determinants of male fertility. *Hum Repr Update* **14**:379-90.
51. Hassold T, Hunt P (2001) To err meiotically is human: the genetics of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* **2**: 280-91.
52. Sherman SL (2006) Relationship of recombination patterns and maternal age among non-disjoined chromosomes 21. *Bioq Soc Trans* **34**: 578-80.
53. Pazarbasi (2008) Inheritance of a translocation between chromosomes 12 and 16 in a family with recurrent miscarriages and newborn with Down Syndrome carrying the same translocation. *Genet Counsel* **19**: 301-8.
54. [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) NCBI Human Genome Resource. Copyright © 1966-2009 Johns Hopkins University.

## Anexo

### I. Técnica de Cariotipo bandas GTG.

- a. Se obtienen 3ml de muestra de sangre periférica, en una jeringa con 0.1ml de heparina sódica de 1, 000 U.I
- b. Se agregan 700µl de la muestra en 2 tubos de ensayo Falcon desechables de polipropileno esterilizados.
- c. Se agregan 5ml de medio de cultivo PB-MAX (contiene RPMI 1640, fitohemaglutinina, suero fetal, antibiótico estreptomycin y penicilina, glutamina).
- d. Se deja sembrando 72 horas en incubadora a 37-37.5°C.
- e. A las 72 hrs se agrega 35µl de colchicina, se agita y se incuban 30min.
- f. Centrifugo 10min a 3, 000 rpm.
- g. Se decanta y en agitación se lleva a un volumen de 5ml con solución hipotónica (Contiene 5.6g de KCL y 1L de agua destilada) a 37°C
- h. Se centrifuga 10min
- i. Se decanta y en agitación (en vortex) y se lleva a un volumen de 12ml con solución hipotónica
- j. Se incuba 30min
- k. Se agrega 1ml de fijador frío o solución de Carnoy (el fijador se prepara con metanol y ácido acético glasear en proporción 3:1), se centrifuga
- l. Con pipeta se retira el sobrenadante y en agitación se agrega fijador gota a gota y lo llevamos a volumen de 8ml.
- m. Se refrigera por 20 min
- n. Se centrifuga y se retira sobrenadante, se lleva a volumen de 8ml para el primer lavado
- o. Se centrifuga nuevamente, se retira el sobrenadante y se lleva a volumen de 6ml para el segundo lavado.
- p. Se gotea
- q. Se realizan técnica de bandeo GTG
- r. Se monta tren de bandeo
- s. Se utilizan 5 vasos koplick, en el primero se agregan 98ml de Buffer pH7+1ml de tripsina, en el segundo 100ml de Buffer pH7, en el tercero 90ml de Buffer 6.8 + 5ml de tinción de Wright, en el cuarto 90ml de Buffer 6.8 + 5ml de tinción de Giemsa y en el último Agua.
- t. Se estandarizó técnica para tiempos en tripsina y colorantes.
- u. Se fijan las laminillas y se observan al microscopio
- v. Se analizan 20 metafases.



## **II. 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.

### **2.-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 cubreobjetos.
- 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 dejo secar a TA en la oscuridad.
- A temperatura ambiente y sobre el área hibridada se ponen 5  $\mu\text{l}$  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.

Materiales y métodos. Babu y Verma (1994) modificado por Guevara y col.

### **III. Preparación de muestras de esperma.**

Controles: Las muestras de esperma fueron obtenidas por eyaculación, de 8 donadores sanos, de fertilidad probada, con cariotipo normal y sin presentar ninguna enfermedad de transmisión sexual aparente, no consumir drogas ni fármacos en los últimos cinco años. Las edades de los mismos fueron de 18 a 49 años.

Se mide el volumen del eyaculado y el aspecto físico del mismo y se mide el pH, a una alícuota de la muestra se le practicó una espermatobioscopia completa siguiendo los criterios de la OMS (23). Las laminillas para el análisis de esperma se realizaron de la siguiente manera: el sobrante

de la muestra se dejó licuar 1 hora, 30 min, a temperatura ambiente (TA), en campana de flujo laminar o cerca de un mechero la muestra se afora hasta 10 ml con medio de cultivo (RPMI 1640) (usar guantes, cubreboca y lentes protectores) sin enriquecer se centrifuga por 10 minutos a 1500 rpm a TA, retirar el sobrenadante, este procedimiento se repite dos veces más, en el siguiente paso se adiciona lentamente y resuspendiendo un volumen de 10 ml de solución hipotónica de KCl/EDTA (0.75M/0.1%) mantenida a 37 °C, se deja actuar durante 1 hora, 30 min a TA y se fija el botón con solución de Carnoy (ácido acético glacial/ metanol 1:3 a -10 °C) fresca, centrifugar durante 5 min a 2000 rpm, quitar sobrenadante realizar el paso anterior tres veces seguidas, la suspensión de espermatozoides se deja en un volumen de 2 ml de fijadora, a partir de aquí se gotea sobre laminillas nuevas limpias y conservadas en alcohol de 96% helado, se transfieren en agua helada (observar que se forme un espejo de agua antes de gotear la muestra) se dejan caer dos gotas de la suspensión a una altura de 20 cm se sopla sobre la muestra e inmediatamente se fija a la laminilla la muestra, por medio del calor en la flama de un mechero de alcohol (parte azul de la flama), se deja enfriar a TA, y se enjuaga en agua destilada, para ver la concentración de núcleos de espermatozoides y la morfología de los mismos, se tiñe una laminilla en una solución de Giemsa al 4% en amortiguador de fosfatos 0.25M pH 6.8 durante 3.30 min enjuagar en agua destilada y dejar secar al aire y observar bajo microscopio en el objetivo de 100X ajustar la dilución de manera de poder observar entre 10 y 20 núcleos de espermatozoides por campo en inmersión; en ese momento se puede continuar con la técnica de relajación o guardar las laminillas a -20 °C en atmósfera de nitrógeno líquido, hasta su uso.

Los núcleos de espermatozoides son desnaturalizados con NaOH 3M a TA, se utilizan 100 µl de sosa sobre la muestra y se le pone un cubreobjetos de 40x40, se deja actuar de 1.30 a 5 min, se monitorea el tiempo de relajación observando la muestra bajo un microscopio de contraste de fases objetivo 100X, en el momento que los núcleos se observan hinchados pero que aun no han perdido el flagelo se debe observar todavía unido al núcleo por la pieza de unión, se detiene la reacción deslizando el cubreobjetos y sumergiendo la laminilla en agua destilada, agitando durante 30 segundos. Se puede continuar con las técnicas moleculares o guardar las laminillas a -20 grados en atmósfera de nitrógeno líquido, hasta su uso.

#### IV. Técnica de FISH.

Para esta metodología se emplearon sondas  $\alpha$ -satélite para los cromosomas X/Y/18 y con sondas de secuencia de copia única para los cromosomas 13/21 (ANEUVISION de VYSYS). Si se cuenta con el hybrite se obvian los siguientes pasos solo se programa el aparato con dos temperaturas una de coodesnaturalizacion y otra de alineación (Las laminillas se sumergen en una serie de alcoholes (etílico) 70,85,96% durante 2 minutos TA, dejar secar al aire e introducir las en una solución de 2XSSC durante 10 min a 37° C, volver a deshidratar en la serie creciente de alcoholes a TA, 2 min cada uno dejar secar al aire y meter la laminillas durante 3.30 min en una solución de formamida al 70% en 2XSSC, a 72 ° C, pH 7.0, detener la reacción sumergiendo la laminilla en una serie de alcoholes helados de 70,85 y 96%, durante dos minutos, dejar en el último alcohol hasta que vaya a adicionar la mezcla de hibridación en el área previamente elegida para la misma, dejar evaporar el alcohol sobre una platina a 55-60° C,) adicionar la mezcla de reacción según lo indica el fabricante poner un cubreobjeto de 18X18mm sobre la mezcla y el área de elección, no permitir que se formen burbujas sellar con cemento y dejar sobre la hybrite 5 minutos a 72 grados en cámara húmeda y posteriormente durante 24 horas a 37° C. pasado este tiempo quitar el cemento lavar en solución de 0.4SSC np40 o tween 80, 40 o 20 al 0.3% pH 7.0 dos minutos en baño maría a 72° C, pasar a una solución de 2XSSC np40 o tween 80, 40 o 20 al 0.1% pH 7.0 TA dos minutos, secar a TA montar con 5ul de 4',6-diamino-2 fenilindol (DAPI II) en solución antidesvanecente (VYSYS), dejar en refrigeración 20 minutos y observar bajo microscopio de fluorescencia con filtro de triple banda

Leer por dos observadores 10.000 núcleos para cada cóctel de sondas.

## V. Técnica de Extracción de DNA (utilizando el Kit Gentra Puregene).

1. Se obtienen 5ml de sangre periférica en tubo con EDTA.
2. Se obtienen 300µl de sangre total y se le agregan 900µl de solución de lisis RBC, se mezcla e invierte 10 veces.
3. Se incuba 1 min a temperatura ambiente.
4. Se centrifuga 20 segundos a 13, 000-16, 000 revoluciones; se observa botón blanco.
5. Cuidadosamente se retira el sobrenadante (se puede repetir hasta 3 veces esta paso).
6. Se agregan 300µl de solución de lisis celular y se pipetea vigorosamente.
7. Se añaden 100µl de solución de precipitación de proteínas y dar vortex vigoroso por 20seg.
8. Centrifugar por 1 minuto.
9. En un tubo diferente agregar 300µl de isopropanol y aplicar el sobrenadante obtenido del paso anterior.
10. Mezclar e invertir 50 veces, el DNA se va haciendo visible.
11. Centrifugar por 1 minuto.
12. Retirar cuidadosamente el sobrenadante y secar el tubo invirtiéndolo en un papel absorbente limpio.
13. Agregar 300µl de etanol al 70% e invertir para lavar el exceso de isopropanol.
14. Centrifugar por 1 minuto a 13, 000 a 16, 000 rpm.
15. Secar bien el tubo en un pedazo de papel absorbente limpio.
16. Agregar 100µl de solución de Hidratación de DNA y dar vortex por 5 s.
17. Incubar a 65° C por 1hr para disolver el DNA.
18. Incubar a temperatura ambiente.

## VI. Microsatélites.

PROC  
EDIMI  
ENTO  
MICR  
OSATÉ  
LITES

Parentesco	DNA	Concentración (ng/ $\mu$ l)	Pureza
Hija	DNA 1	513.87	1.87
Mamá	DNA 2	276.37	1.76
Papá	DNA 3	371.16	1.93

- Se recibieron tres alícuotas de 5 $\mu$ l de DNA marcadas con la siguiente información.
- Se realizaron dobles diluciones de estas muestras para obtener una concentración de DNA cercana a 0.125 ng/ $\mu$ l de la siguiente manera

DNA	1era Dilución	2da Dilución	Concentración final
1	1:100	1:40	0.128 ng/ $\mu$ l
2	1:50	1.50	0.122 ng/ $\mu$ l
3	1:65	1.45	0.126 ng/ $\mu$ l

Una vez terminadas las diluciones y con la finalidad de identificar la herencia de los alelos del cromosoma 21 en la hija (DNA 1) en esta familia, se utilizó el kit AmpFeSTR®Identifiler™ (Applied Biosystems), para realizar la amplificación por PCR de estos de la siguiente manera:

- Se homogenizaron en vórtex a baja velocidad los tubos del kit
- Se centrifugaron con picofuga 5 segundos
- Se preparó un MasterMix agregando por cada prueba los siguientes volúmenes

REACTIVO	Vol. 1 reacción ( $\mu$ l)	MasterMix ( $\mu$ l)
AmpFeSTR PCR Reaction Mix	10.5	52.5
AmpliTaQ Gold DNA Polymerase	0.5	2.5

AmpFeSTR Prime Set	Profiler Plus	5.5	27.5
-----------------------	---------------	-----	------

- Esta mezcla se homogenizo en vórtex a baja velocidad y se centrifugó en picofuga 5 segundos
- Se agregaron 15.0µl de MasterMix a tubos de 0.2 mL, los cuales se rotularon adecuadamente incluyendo un control positivo y uno negativo
- Posteriormente se agregaron 10.0µl de la segunda dilución de DNA a sus tubos correspondientes (0.2 ml)
- Al tubo marcado como control positivo se le adiciono 10.0 µl del DNA control 9947A (0.10 ng/µl)
- Al tubo marcado como control negativo se adicionaron 10µl de agua estéril
- El volumen final para cada uno de los tubos fue de 25.0µl
- Se homogenizaron en vórtex a baja velocidad y se centrifugaron en picofuga 5 s.
- El programa de amplificación se realizo en el termociclador Perkin Elmer 2400 bajo las siguientes condiciones

Paso inicial de incubación	Desnaturalization	Alineamiento	Extensión	Extensión final	Paso final
HOLD	28 Ciclos			HOLD	HOLD
95 °C 11 min	94°C 1 min	59 °C 1 min	72°C 1min	60 °C 60 min	4°C ∞

#### PREPARACIÓN DE LA MUESTRAS PARA INYECCIÓN

- Se agregaron 24.0 µl de Formamida + 1.0 µl de GenScan-500Liz tamaño estándar por cada muestra en tubos de 0.5 mL
- Se agrego posteriormente 1.5 µl de los productos de PCR obtenidos, en sus tubos correspondientes y se taparon con septas.

- Esta mezcla se homogenizo en vórtex con baja velocidad y se centrifugo en picofuga 5 seg.
- Se colocaron a 96.0 °C por 3 minutos en termoblock, terminado este tiempo se colocan inmediatamente en hielo.
- Se Analizaron las muestras en ABI 310 Applied Biosystems





HOSPITAL INFANTIL de MÉXICO  
 FEDERICO GÓMEZ  
 Instituto Nacional de Salud

## VII. Consentimiento Informado

### HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA TOMA DE MUESTRA DE DNA PARA EVALUACIÓN DIAGNÓSTICA

México D.F., a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Por medio de la presente autorizo al Dr. (a) \_\_\_\_\_ para realizar el siguiente procedimiento.

1.- Extracción de 3ml de sangre venosa del brazo de mi hijo (a)

Nombre: \_\_\_\_\_

El propósito de la toma de la muestra es la obtención de ADN para realizar el estudio de \_\_\_\_\_

Mi consentimiento se condiciona a que se mantenga en forma confidencial los datos de mi hijo (a) y mi familia. Entiendo que el procedimiento de obtención de sangre puede causar molestias.

Mi firma en este documento manifiesta mi participación voluntaria, la responsabilidad de los investigadores de respecto a mi persona y mis derechos, y que puedo terminar en cualquier momento la participación en este estudio sin que se perjudique mi futura atención. Se me entrega una copia del documento.

La información anterior fue explicada por \_\_\_\_\_  
 Para cualquier duda puedo contactar a la Dra. Verónica Fabiola Morán Barroso en el Departamento de Genética del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Tel: 52 28 99 17 Ext. 1495 o a la Dra. Mónica Villa Guillen, Subdirectora de Asistencia Médica.

\_\_\_\_\_  
 Nombre y Firma del Padre o Tutor

\_\_\_\_\_  
 Testigo

\_\_\_\_\_  
 Testigo