



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO
FEDERICO GÓMEZ

**EXPERIENCIA DE ALTERACIONES ESTRUCTURALES DEL CROMOSOMA
22 EN EL HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ EN EL
PERIODO 1979-2009: PRESENTACIÓN DE DOS CASOS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA**

P R E S E N T A:

DRA. JIMENA BARRAZA GARCIA

TUTORA: DRA. VERÓNICA FABIOLA MORÁN BARROSO

ASESORES: DRA. CONSTANZA GARCÍA DELGADO

M. EN C. ROBERTO GUEVARA YÁÑEZ



MÉXICO, D.F.

FEBRERO 2012.



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.

Directora de tesis:

Dra. Verónica Fabiola Morán Barroso
Profesora Titular de la Especialidad de Genética Médica
Hospital Infantil de México Federico Gómez

Asesores de tesis:

Dra. Constanza García Delgado
Profesora adjunta de la Especialidad de Genética Médica
Hospital Infantil de México Federico Gómez

M. en C. Roberto Guevara Yáñez
Laboratorio BIOGEN

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

DEDICATORIA

A mis padres y a Carlos

Por estar. Por todo. Ya saben.

A la Dra Verónica Morán Barroso

Gracias por sus enseñanzas, orientación y apoyo durante toda residencia.

A mis maestros, Dra. Constanza García Delgado, Dra. Rosa Isela Ortíz de Luna y
Dr.Francisco Flores Ramirez

Gracias por compartirme su experiencia y conocimientos.

Al M. en C. Roberto Guevara Yañez y la M. en C. Alicia Cervantes Peredo

Por todas sus enseñanzas y apoyo brindado para la realización de este proyecto.

A los residentes y ex - residentes, por su amistad.

Gracias al Hospital Infantil de México Federico Gómez y a sus pacientes.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.	
I.1	Bases cromosómicas de la herencia	5
I.2	Estructura, organización y clasificación de los cromosomas	7
I.3	Ciclo celular: mitosis y meiosis	12
I.4	Alteraciones cromosómicas	16
I.4.1	Alteraciones numéricas	17
I.4.2	Alteraciones estructurales	18
I.4.3	Translocaciones	21
I.5	Técnicas citogenéticas	23
I.6	Indicación para la realización de estudios citogenéticos	26
I.7	Estructura del cromosoma 22	29
I.8	Síndromes por alteraciones estructurales del cromosoma 22	32
II.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	34
III.	JUSTIFICACIÓN	35
IV.	OBJETIVOS	36
	IV.1 General	
	IV.2 Específicos	
V.	MATERIAL Y MÉTODOS	37
V.1	Descripción de la metodología	37
V.2	Criterios	38
V.3	Análisis de la información	41

VI.	RESULTADOS.	
	VI.1 Revisión de la frecuencia y tipo de alteraciones del cromosoma 22	42
	VI.2 CASO 7	45
	VI.3 CASO 8	62
VII.	CONCLUSIONES	80
VIII.	BIBLIOGRAFIA	83
IX.	ANEXOS	90

I. INTRODUCCIÓN

I.1. BASES CROMOSÓMICAS DE LA HERENCIA

La naturaleza hereditaria de cada ser se define por su genoma, que consiste en las secuencias de ácido nucleico que proveen la información necesaria para construir un ser vivo². En el ser humano está conformado por 3.2×10^9 pares de bases, y se conocen 21,257 genes codificantes para proteínas¹, es decir el 1.5-2% de la longitud total del genoma³. Físicamente puede dividirse en un número de moléculas de ADN (ácido desoxirribonucleico) diferentes, que poseen una estructura compleja. Estas moléculas fueron llamadas cromosomas (del griego *chroma-color*, *soma-cuerpo*). Un cromosoma es una molécula de ADN lineal de doble cadena con un alto grado de compactación, que contiene histonas y otras proteínas no histónicas que colaboran en su estructura³.

En el ser humano existen 24 cromosomas diferentes, los cuales se clasifican en pares correspondiendo 22 de ellos a autosomas y el par 23 o cromosomas sexuales, X o Y⁴. Los organismos diploides poseen dos copias de cada cromosoma, siendo cada una de éstas heredada de uno de los padres².

La teoría cromosómica de la herencia, una de las piedras angulares de la genética actual, fue descrita entre 1902 y 1904 por Boveri y Sutton, quienes identificaron a los cromosomas como las partículas de la herencia descritas previamente por Gregorio Mendel en el siglo XIX⁸.

En base a los experimentos realizados en 1956 por Tijo y Levan se estableció que el complemento cromosómico normal de los seres humanos es de 46 cromosomas, 46,XX en el caso de las mujeres y 46,XY en el caso de los varones, constituyendo el número diploide (el número haploide de 23 cromosomas se encuentra en los gametos). Este descubrimiento fue la base para que en 1959 fueran identificadas entre otras las alteraciones cromosómicas del Síndrome de Down o trisomía 21, el síndrome de Turner o monosomía del X y el síndrome de Klinefelter (47,XXY), es decir, había nacido el campo de la citogenética⁷. En 1960 Nowell y Hungerford describieron el cromosoma Filadelfia y en 1973 Janet Rowley demostró que era el producto de una t(9;22).

Tradicionalmente, el término “citogenética” se refiere al estudio de los aspectos celulares de la herencia, especialmente la descripción de la estructura cromosómica y la identificación de alteraciones cromosómicas relacionadas con la enfermedad³⁹. Durante los siguientes años, la citogenética humana se vio transformada por avances tecnológicos en los que convergen además la química y la biología molecular^{6,7}.

Algunos autores consideran que la resolución y sensibilidad de los análisis citogenéticos ha mejorado en más de 10 mil veces cuando se compara con los primeros estudios reportados, primero con la introducción en 1960 de las técnicas de tinción desarrolladas por Caspersson, posteriormente con la introducción en 1980 de las técnicas de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) por Pinkel y recientemente el uso de CGH-microarreglos. Estas últimas técnicas permiten un análisis cromosómico fino para detectar pérdidas o ganancias cromosómicas en una resolución sin precedentes. Estos avances han tenido un enorme impacto en nuestro conocimiento acerca de las bases moleculares de la enfermedad humana y de la estructura, función y evolución de nuestros cromosomas⁶.

I.2. ESTRUCTURA, ORGANIZACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LOS CROMOSOMAS

En las células eucariotas, el ADN genómico se encuentra empaquetado, participando proteínas histonas y no histónicas para formar la cromatina. El material genético se organiza con diferentes niveles de compactación los cuales inician desde la doble hélice de ADN y la formación del nucleosoma, que contiene 200 pares de bases de DNA, enrollado en un octámero de histonas^{9,12,14}. El octámero está compuesto de dos dímeros de histonas H2A y H2B, y un tetrámero compuesto de 2 proteínas histónicas H3 y H4¹⁰. Las histonas están conectadas por una secuencia DNA espaciadora, donde se encuentra la histona H1/H5 monomérica¹⁰: esta secuencia estabiliza la estructura del nucleosoma, y determina la trayectoria de entrada y salida del DNA⁴. Los tractos polinucleosómicos se observan en el microscopio electrónico como “cuentas de collar”, donde los nucleosomas serían las cuentas y el hilo sería el DNA espaciador^{11,12,13,14} (Figura 1.1).

Las enzimas modificadoras de histonas, los complejos remodeladores de la cromatina y la metilación del ADN son componentes de complejos mecanismos epigenéticos que ayudan a la compactación y la organización del genoma: esta organización también se relaciona con muchos aspectos de la expresión de los genes contenidos en los cromosomas, así como los procesos de transcripción, recombinación y reparación del ADN⁹.

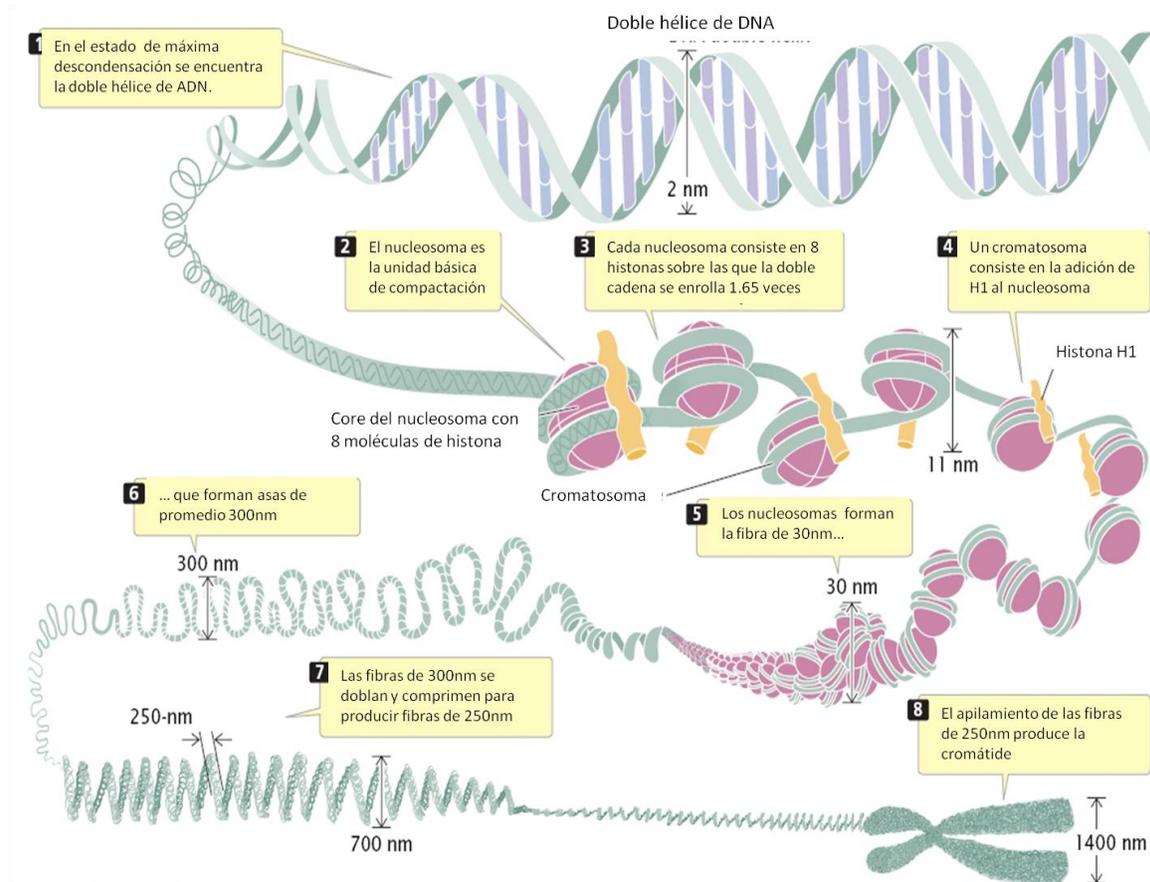


Figura 1.1. Niveles de compactación del material genético.
 Imagen modificada de Nature Education, 2008³⁴.

El siguiente nivel de compactación de ADN corresponde a la fibra de 30nm; se han propuesto dos modelos principales para explicar su estructura¹². En el modelo del solenoide, los nucleosomas se enrollan de forma circular alrededor del eje. El segundo modelo propuesto es llamado en zig-zag, en donde el ADN espaciador conecta a los nucleosomas en lados opuestos de la fibra^{13,14}.

Además, se han propuesto varios modelos para el enrollamiento de la fibra de 30nm¹⁵. El modelo del cromonema propone la formación de una estructura de orden superior a partir de la compactación progresiva de la fibra de 30nm hacia una fibra de aproximadamente 130 nm o fibra de cromonema, que se une en zig-zag a un andamiaje proteico. Por otra parte, el modelo del asa gigante sugiere que grandes asas de cromatina condensada, de 3 a 5 megabases, están unidas al azar a un esqueleto proteico dentro del núcleo. Dentro de este modelo se encuentra la propuesta de asas múltiples ancladas al andamiaje en forma de rosetas¹⁵.

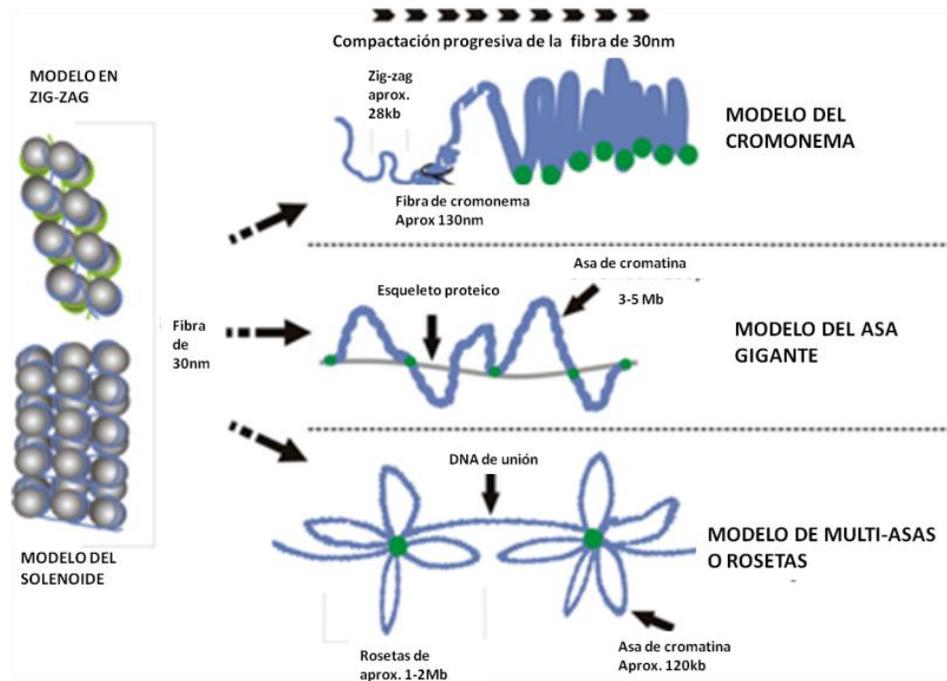


Figura 1.2. Modelos de compactación de la fibra de 30nm.
 Imagen modificada de *Current Opinion in Structural Biology*, 2006¹³.

Al microscopio de luz transmitida, los cromosomas se visualizan como estructuras individuales durante la profase tardía o en metafase, conformados por un brazo corto (p), un brazo largo (q), una constricción primaria (centrómero) y dos extremos distales (telómeros).

Los elementos funcionales de los cromosomas son principalmente los telómeros y el centrómero. El centrómero es el sitio de ensamblaje para el cinetocoro, una compleja estructura proteica que coordina el movimiento cromosómico en la división celular, tanto en mitosis como en meiosis. También sincroniza la formación de heterocromatina y la cohesión de las cromátides hermanas, así como favorece la condensación cromosómica y la unión de los cromosomas al huso¹⁸.

La región del centrómero se clasifica en dos dominios funcionales proteicos que codifican funciones de cromatina/cinetocoro y ensamblaje de heterocromatina. Los cinetocoros se observa como una estructura trilaminar situada en lados opuestos de la heterocromatina centromérica en el cromosoma mitótico. Cuando los microtúbulos no están anclados se observa la corona fibrosa, que junto con la capa externa, contienen la mayoría de las proteínas de interacción con los microtúbulos (CENP-E, dineína), así como proteínas del punto de control del huso. La capa interna está inmediatamente adyacente y comprende también heterocromatina centromérica especificada por la presencia de la variante de histona H3, CENP-A¹⁹.

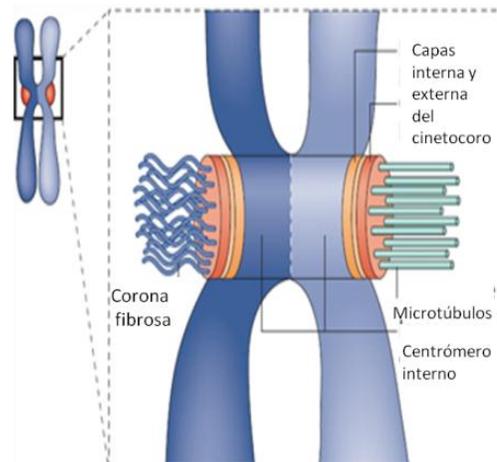


Figura 1.3. Estructura del cinetocoro.
 Modificada de *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2008⁸⁵.

Los telómeros tienen dos funciones biológicas principales las cuales son proteger la integridad de los cromosomas, y asegurar la replicación completa de los extremos de la molécula de DNA, lo cual es crucial para la supervivencia de la célula^{20,21}. Los telómeros están formados de varios miles de repetidos de doble cadena con secuencia TTAGGG, y terminan con una extensión unicadena en el extremo 3'; en conjunto con otras proteínas específicas del telómero, participan en la formación de una estructura terminal en asa, o *T loop*^{20,21}.

Las proteínas que se unen al ADN de doble cadena en los telómeros son TRF1 y TRF2. La proteína POT 1 (o de "Protección de los telómeros 1") reconoce al ADN de cadena sencilla de los telómeros en conjunto con la proteína TIN2 (o "proteína nuclear que interactúa con TRF1"). El complejo proteico sirve para formar y proteger el telómero y se denomina telosoma o shelterina^{13,21}.

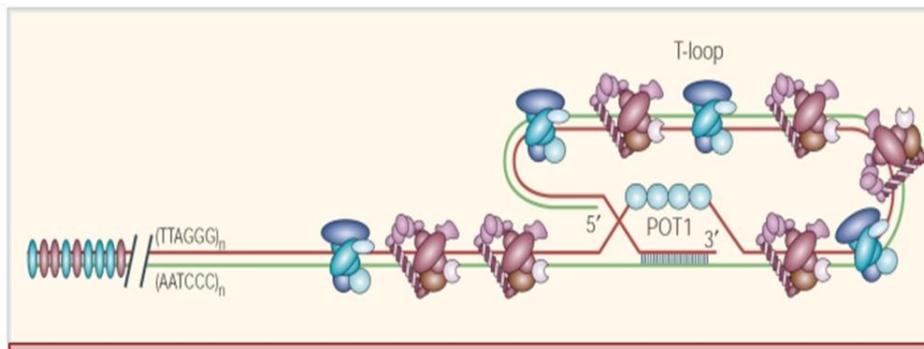


Figura 1.4. Estructura propuesta para el complejo telomérico humano.
 Modificada de *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2004⁸⁶.

De acuerdo a la posición del centrómero los cromosomas se clasifican en:

- a) Metacéntrico: El centrómero se encuentra en la parte media del cromosoma y los brazos tienen la misma longitud.
- b) Submetacéntrico: El centrómero se sitúa más cercano a uno de los extremos, lo que define a un brazo corto (p) y uno largo (q).
- c) Acrocéntrico: El centrómero está muy desplazado hacia uno de los extremos y el brazo corto tiene una longitud muy reducida, incluyendo una estructura denominada satélite.

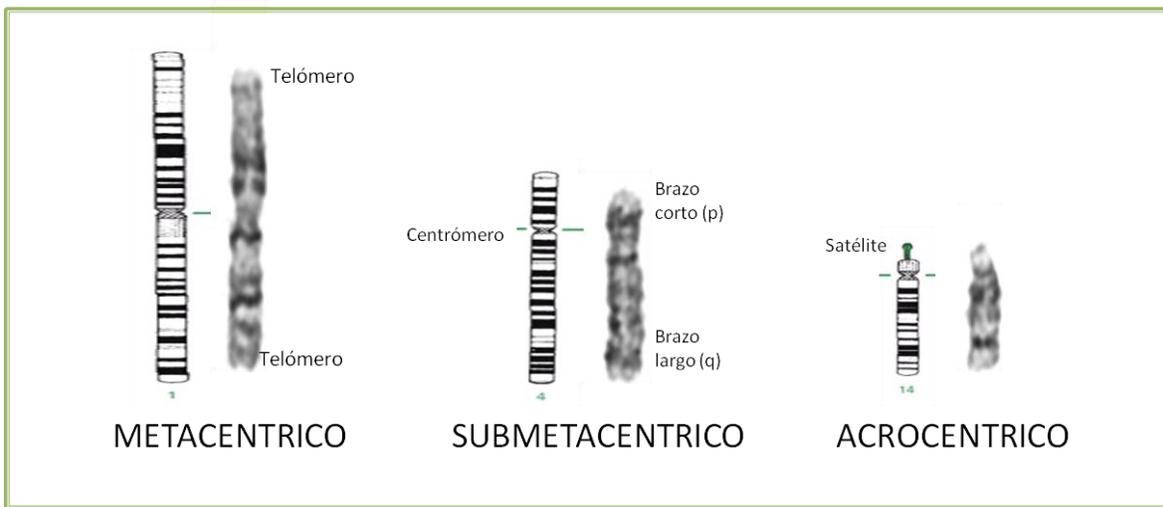


Figura 1.5. Clasificación de los cromosomas con referencia a su centrómero.
Imagen modificada de Oxford Desk Clinical Genetics, 2005 con imágenes del Laboratorio de Citogenética, HIMFG.

Los satélites de los cromosomas acrocéntricos humanos están formados por secuencias repetitivas en tándem de complejidad variable, que no presentan actividad transcripcional. En los tallos de los cromosomas acrocéntricos se localizan los genes que codifican para el ARN ribosomal (rARN). Es por ello que la pérdida de los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos debido a rearrreglos de este tipo de cromosomas no se relaciona con traducción clínica⁴. Otras regiones cromosómicas que corresponden a heterocromatina constitutiva sin actividad transcripcional los centrómeros y las constricciones secundarias de los cromosomas 1, 9 y 16 así como la porción distal del brazo largo del cromosoma Y.

I.3. CICLO CELULAR: MITOSIS Y MEIOSIS

El evento mediante el cual una célula se reproduce y hereda su material genético es el ciclo celular: sus puntos principales son los que conciernen al copiado y a la división del material hereditario. El proceso por el cual una célula da origen a dos células hijas con igual número de cromosomas se denomina mitosis, en la que de forma previa la célula debe duplicar su material genético para obtener finalmente dos células hijas idénticas. Por otro lado, la meiosis permite la reducción del número de cromosomas por medio de dos divisiones celulares sucesivas con una sola duplicación previa de los cromosomas, y se lleva a cabo únicamente en las células germinales. La meiosis es esencial para la reproducción sexual y para la continuidad de los organismos diploides.

La mitosis o fase M se divide en 5 fases sucesivas principales: profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis. En cada división celular se asegura que se mantenga el número cromosómico^{3,4,5}. Las etapas se describen en la figura 1.6.

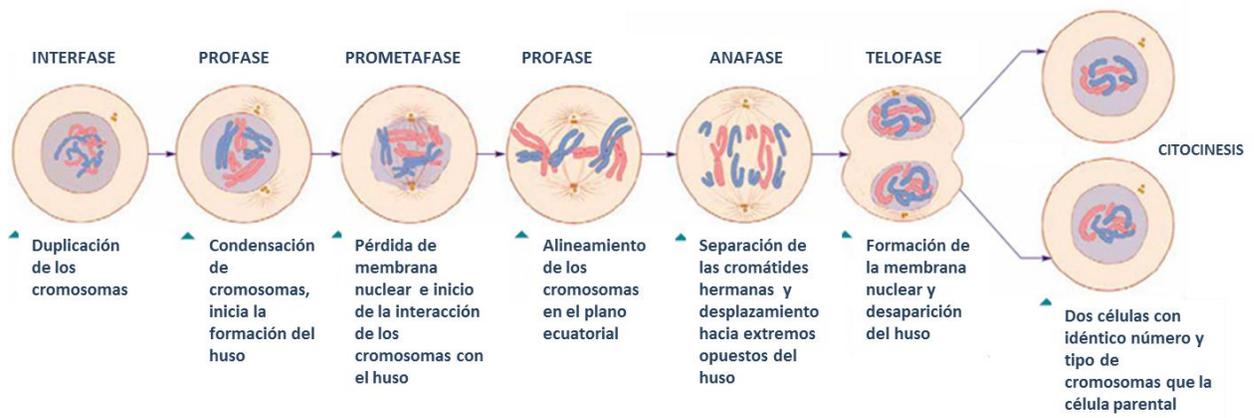


Figura 1.6. Fases de la Mitosis. Modificada de Saltsman et al, 2005⁸⁷.

En lo que respecta a la meiosis, los organismos sexuales deben reducir a la mitad su número cromosómico en los gametos. En esta división celular, tras una sola ronda de replicación del ADN se llevan a cabo dos divisiones sucesivas (meiosis I y meiosis II)^{22,23,24}. La correcta ejecución de la meiosis es esencial para la fertilidad, para mantener la integridad del genoma y asegurar el desarrollo normal de la descendencia. Los errores pueden resultar principalmente en aneuploidías (alteraciones cromosómicas numéricas) y puede llevar a la muerte del producto o a alteraciones en su desarrollo.

Lo anterior es una causa importante de defectos congénitos en seres humanos²³. El evento de mayor importancia en la meiosis es la recombinación homóloga, que da origen a la variación en los gametos²⁴. Es un aspecto del metabolismo del ADN altamente conservado y tiene otro importante papel en la reparación de las rupturas de doble cadena²⁴.

Antes de la meiosis, la replicación del ADN en la fase S premeiótica, normalmente más larga que en la mitosis, permite a las células tener un complemento cromosómico con 46 cromosomas dobles los cuales pasarán por dos divisiones celulares que son^{23,24,25,26,27}:

- Meiosis I (fase reduccional): Separación de los homólogos.
- Meiosis II (segregación ecuacional): Separación de las cromátides hermanas.

La profase de la primera división meiótica se divide a su vez en:

- Leptoteno- Los homólogos no apareados se observan como cintas gruesas, que son las cromátides hermanas, e inicia el proceso de apareamiento así como el intercambio de segmentos homólogos entre dos de las cuatro cromátides.
- Cigoteno- Los homólogos paternos y maternos inician el proceso de sinapsis para formar los bivalentes.
- Paquiteno- Se completa la sinapsis, cada par de homólogos forma un bivalente. Termina la recombinación.
- Diploteno- Acortamiento de cromosomas; comienza la separación de los bivalentes. Los cromosomas homólogos solo están unidos por quiasmas, resultado del entrecruzamiento.
- Diacinesis- Continua la condensación cromosómica, los bivalentes son compactos. Terminalización de los quiasmas.

En la etapa de anafase I se lleva a cabo la separación de los homólogos, lo que resulta en dos gametocitos secundarios: cada uno tiene un contenido cromosómico haploide, pero cada cromosoma está formado de dos cromátides. En la segunda división meiótica, o de segregación ecuacional, se lleva a cabo la separación de las cromátides hermanas para dar origen a cuatro gametos de contenido haploide^{23,24,25}.

MEIOSIS I

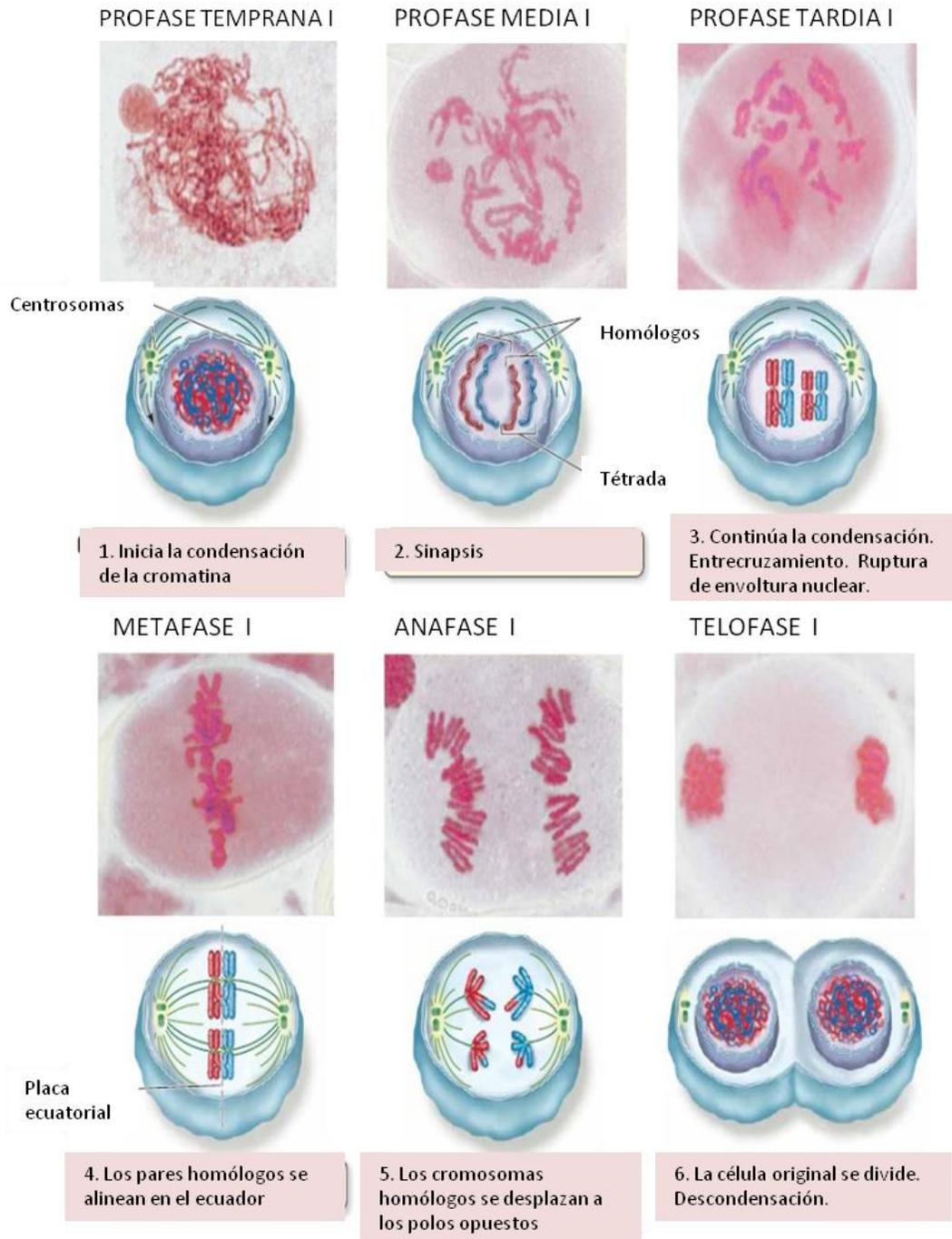
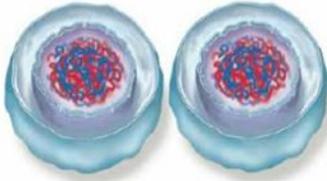


Figura 1.7. Fases de la Meiosis I. Modificada de Nature Education, 2008⁸⁸.

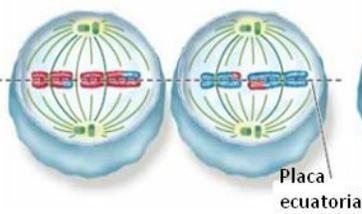
MEIOSIS II

PROFASE II



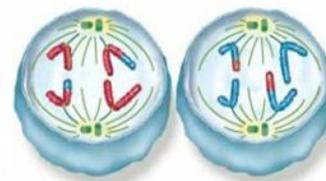
7. Inicia la condensación, no replicación previa

METAFASE II



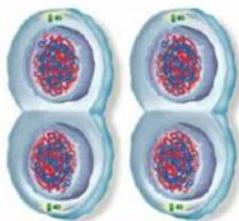
8. Alineamiento en las placas ecuatoriales de centrosomas homólogos

ANAFASE II



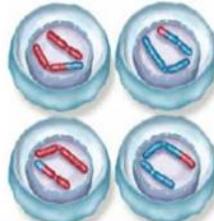
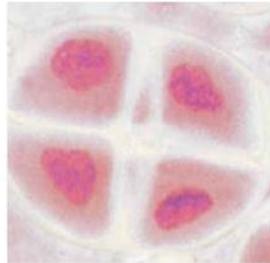
9. Desplazamiento de las cromátides hermanas hacia polos opuestos. El material genético será exclusivo de cada célula.

TELOFASE II



10. Descondensación y división celular

PRODUCTOS



11. Cuatro células con número cromosómico haploide

Figura 1.8. Fases de la Meiosis II. Modificada de Nature Education, 2008⁸⁸.

I.4. ALTERACIONES CROMOSÓMICAS

Las alteraciones cromosómicas son una causa importante de malformaciones congénitas y alteraciones del desarrollo, y se presentan en el 0.8% de todos los recién nacidos vivos²⁸. Pueden clasificarse en:

Numéricas: Pérdida o ganancia de cromosomas completos.

Estructurales: Alteraciones en la secuencia genómica de cromosomas individuales. Estas alteraciones pueden ser balanceadas (cuando no hay pérdida o ganancia de material en el rearrreglo cromosómico), o desbalanceadas (que resulta en alteración de la dosis génica) (Tabla 1.1)^{29,30}.

Tabla 1.1 Clasificación de las alteraciones cromosómicas. Modificada de Luthardt et al., 2001²⁹.

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

Para fines de esta tesis interesa en particular revisar aneuploidías y translocaciones.

I.4.1 ALTERACIONES CROMOSÓMICAS NUMÉRICAS

Como ya se ha mencionado, los errores en la disyunción durante la meiosis y la mitosis pueden dar lugar a cambios en el número cromosómico del individuo. Aneuploidía se refiere a la alteración que es numéricamente mayor o menor al múltiplo exacto del número haploide^{35,36,37}. Es la alteración cromosómica clínicamente significativa más común en el ser humano, y se presenta en el 3-4% de todos los embarazos reconocidos médicamente. Usualmente es una trisomía que resulta de no disyunción meiótica. La monosomía autosómica se observa en menos del 1% de las alteraciones cromosómicas en abortos espontáneos del primer trimestre³⁶ (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Incidencia de aneuploidías durante el desarrollo. Hassold, T., et al, 2001³⁷.

INCIDENCIA DE ANEUPLOIDÍAS DURANTE EL DESARROLLO							
SEMANAS DE GESTACION							
			0	6	8	20	40
	Espermatozoide	Oocito	Pre-implantación	Aborto preclinico	Aborto espontáneo	Óbito	Recién nacido vivo
Icidencia de aneuploidías	1-2%	+/- 20%	+/- 20%	?	35%	4%	0.3%
Aneuploidías comunes	Varias	Varias	Varias	?	45,X/ t16 / t18/ t21	t13 / t18/ t21	t13/ t18/ t21/ Cr sexuales

En la no disyunción en meiosis I, ambos homólogos de un cromosoma se mueven al mismo polo durante la anafase I en lugar de moverse a polos opuestos, dando origen a una célula con dos copias de un cromosoma y una célula sin copias del cromosoma. En meiosis II, son las cromátides hermanas las que presentan falla para la separación. La no disyunción puede también presentarse en la meiosis II, en la cual daría lugar a una aneuploidía en mosaico³⁶. Un mecanismo alternativo se basa en la separación prematura de las cromátides en la meiosis I por cromosomas aquiasmáticos, con la formación de una estructuras univalentes y no una bivalente, que segregan de modo independiente durante la anafase⁴⁴.

I.4.2. ALTERACIONES CROMOSÓMICAS ESTRUCTURALES

Las alteraciones estructurales son el resultado de una interrupción de la continuidad de uno o más cromosomas; las rupturas ocurren ya sea en respuesta al daño al ADN, o como parte del mecanismo de recombinación y pueden involucrar una o dos cromátides de acuerdo al estadio del ciclo celular en que se presenten.

Cuando se presentan dos rupturas en la misma célula, los mecanismos de reparación pueden unir los segmentos rotos originando una nueva configuración cromosómica. Estas alteraciones pueden originarse a partir de un padre portador o presentarse *de novo*.

Los rearrreglos balanceados originan (entre otros aspectos), infertilidad en el individuo o una descendencia con rearrreglos desbalanceados. Los rearrreglos desbalanceados dan lugar a defectos congénitos así como a retraso del crecimiento y del desarrollo. Las alteraciones somáticas adquiridas suelen relacionarse con neoplasias (Tabla 1.3)^{29,30}.

Tabla 1.3. Efectos de las alteraciones cromosómicas constitucionales. Modificada de Gardner et al., 2004⁴⁴.

EFFECTOS DE ALTERACIONES CROMOSOMICAS CONSTITUCIONALES
Interrupción de la blastogénesis, con implantación transitoria o no implantación del producto
Interrupción de la embriogénesis, con aborto espontáneo, usualmente en el primer trimestre
Alteración importante de la morfogénesis, con aborto tardío o muerte neonatal temprana
Alteración de la morfogénesis que permite la supervivencia extrauterina
Supervivencia extrauterina, sin efectos fenotípicos visibles

Los cromosomas se pueden romper en cualquier punto, pero hay sitios de ruptura preferente (*hot spots o sitios frágiles*)²⁹. Estas rupturas pueden ser reparadas, pero se pueden reunir y dar origen a múltiples alteraciones estructurales. Una ruptura en un brazo en la que no se afecta el centrómero origina un cromosoma corto con un fragmento acéntrico. Los fragmentos sin centrómero son inestables y generalmente se pierden durante la división celular generándonos un cromosoma más corto⁴⁴.

Si hay dos rupturas cromosómicas dentro de una misma célula, enzimas reparadoras pueden reunir los extremos rotos, originando una nueva configuración de los cromosomas implicados. Los cromosomas se pueden romper en cualquier punto y los extremos rotos se pueden reunir para formar una variedad de nuevas combinaciones.

Los rearrreglos cromosómicos pueden provocar: pérdida (deleción) o ganancia (duplicación) del material genético; dos rupturas en un cromosoma puede dar una deleción intersticial, anillo cromosómico o una inversión o reunión de segmentos cromosómicos interrumpidos en una configuración anormal sin pérdida o ganancia de material genético (translocación balanceada o inversión); dos rupturas en 2 diferentes cromosomas pueden incluir cambios estructurales incluyendo translocaciones recíprocas y robertsonianas^{29,44}.

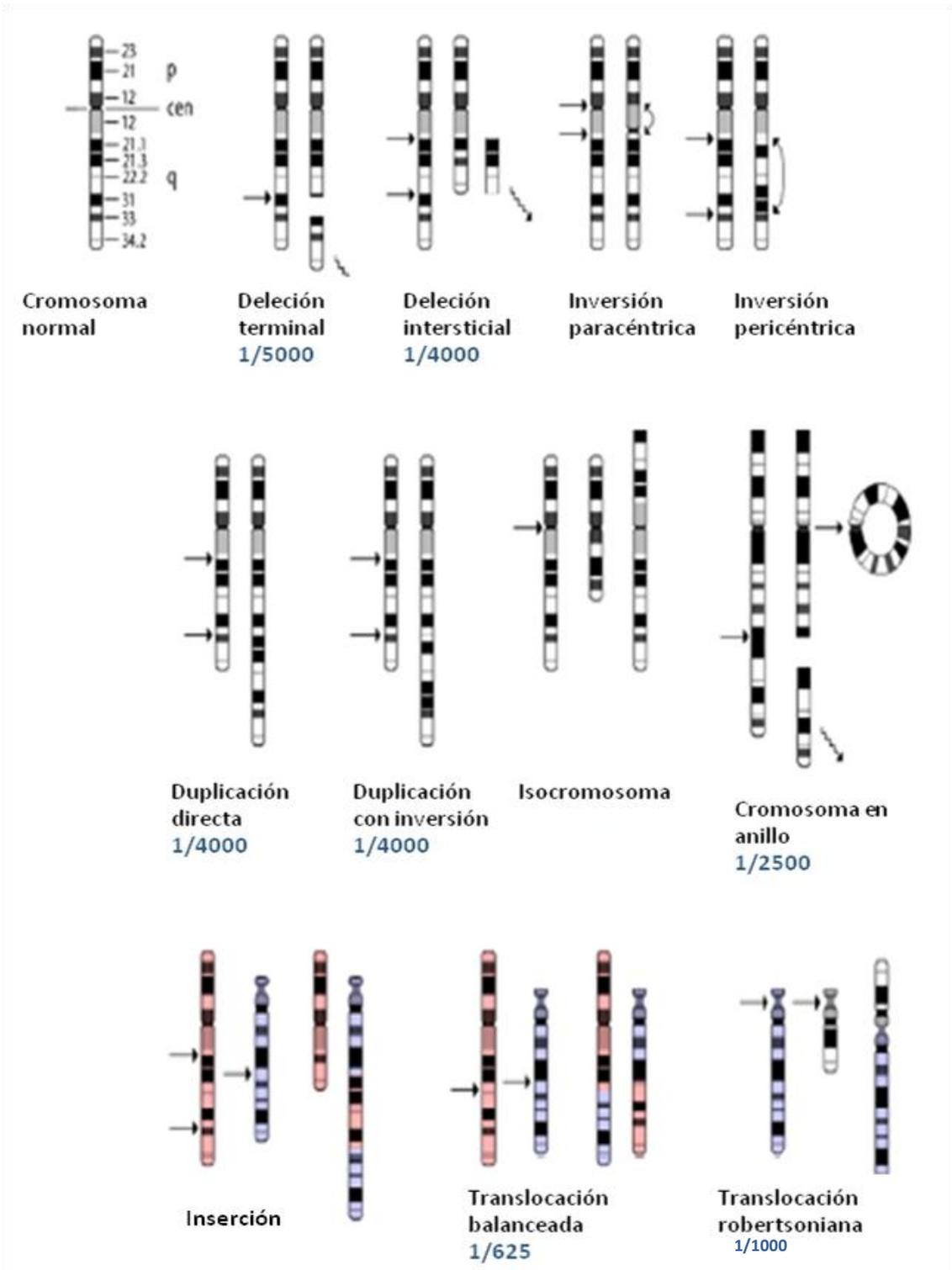


Figura 1.9. Esquemas de las alteraciones cromosómicas estructurales y su prevalencia. Imagen modificada de Luthardt et al, 2001²⁹.

I.4.3. TRANSLOCACIONES

Una translocación se origina por el intercambio de segmentos de cromosomas no homólogos. Si la información genética transferida entre los dos cromosomas es completa y no se asocia a pérdida o ganancia o no afecta la integridad de la información del material genético, la translocación es recíproca y balanceada. Las translocaciones recíprocas son producto de un intercambio de los segmentos terminales provenientes de dos cromosomas diferentes y representan la forma más común de alteración cromosómica estructural, con una frecuencia de 1 en 625 recién nacidos vivos²⁷. Las translocaciones robertsonianas, originadas de la fusión céntrica de dos cromosomas acrocéntricos, son menos comunes y se presentan en aproximadamente 1 en 1000 individuos²⁶.

Los portadores de una translocación familiar balanceada casi siempre son fenotípicamente sanos y son diagnosticados cuando un miembro de la familia presenta infertilidad, abortos de repetición, o tiene descendencia fenotípicamente anormal, producto de un gameto desbalanceado. Cada translocación específica dará origen a proporciones diferentes de posibles productos de segregación (Figura 1.10)^{31,32}.

Durante la meiosis I los cromosomas reorganizados por la translocación con sus homólogos forman un cuadrivalente y en la anafase I se separan de acuerdo a diferentes tipos de segregación 2:2 (alterna, adyacente 1 o adyacente 2), segregación 3:1 o menos frecuentemente segregación 4:0. Estas diferentes posibilidades tienen un impacto importante en la fertilidad del portador, e incrementan el riesgo para una descendencia con una alteración cromosómica no balanceada^{34,35}.

Las alteraciones cromosómicas ya descritas pueden analizarse mediante diversas técnicas citogenéticas y moleculares, que se describen brevemente en el siguiente apartado.

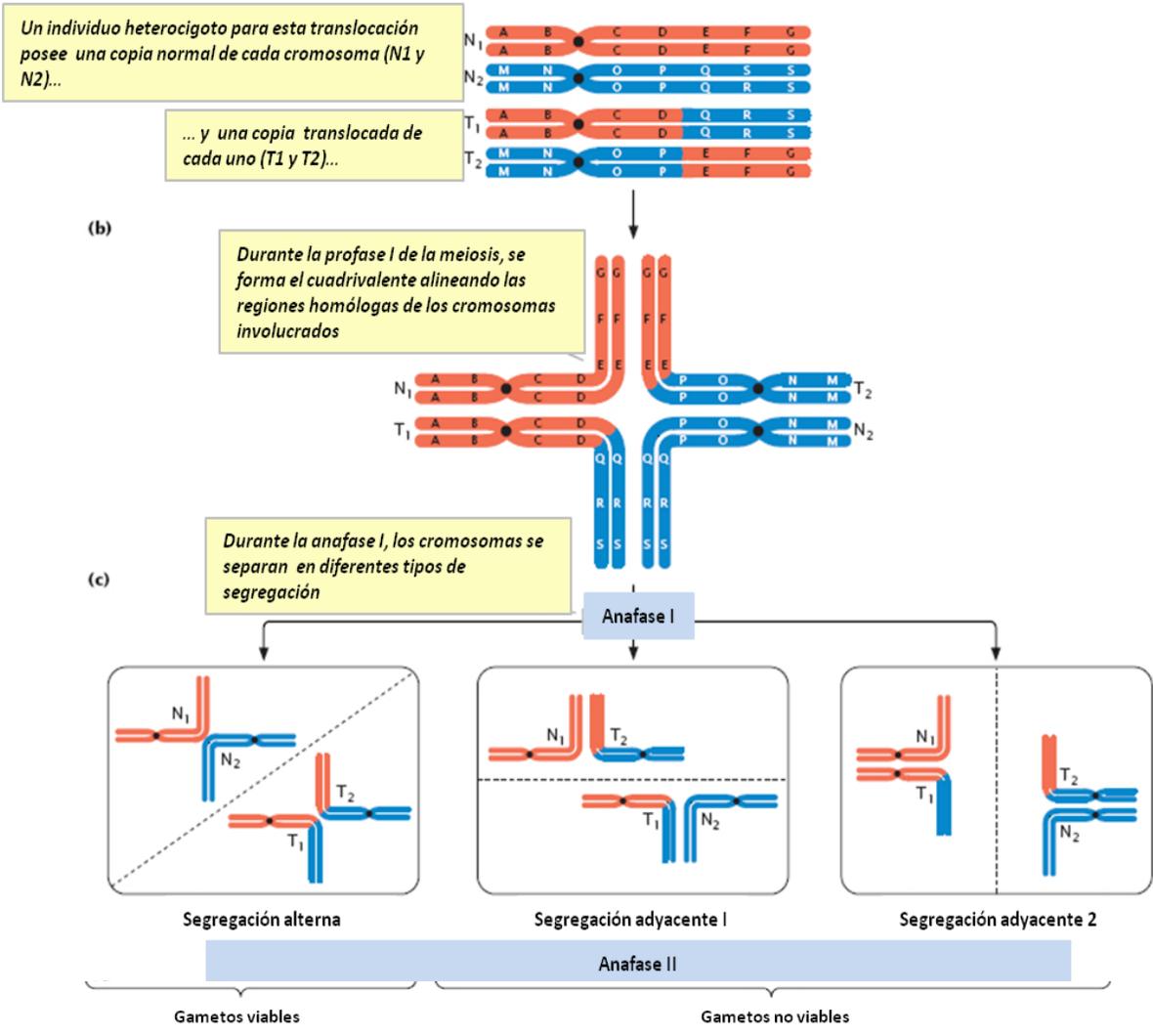


Figura 1.10. Análisis de la segregación en Meiosis de una translocación balanceada
 Imagen modificada de Nature Education, 2008⁸⁹.

I.5. TÉCNICAS CITOGÉNÉTICAS

La caracterización cromosómica mediante métodos simples, rápidos y confiables, es uno de los principales intereses en la citogenética humana y animal⁴⁰. El cariotipo es utilizado de forma rutinaria para la determinación de alteraciones en el número o la estructura cromosómica. El término se refiere al análisis organizado (apareamiento y alineamiento) del contenido cromosómico de una célula específica, donde los cromosomas son ordenados y numerados de acuerdo a su tamaño, del mayor al menor y de la posición del centrómero. Se cuenta con una nomenclatura estandarizada para la descripción del complemento cromosómico normal o alterado¹⁷. Es posible identificar cada cromosoma utilizando diferentes técnicas de tinción, en base a la presentación de franjas claras u oscuras (bandas) o la presencia, ausencia o la anomalía de algunas estructuras cromosómicas (centrómero, satélites, etc.). Las principales técnicas de bandeado se muestran en la Tabla 1.4.

Tabla 1.4. Técnicas de tinción para cariotipo. Modificada de Miller, 2001⁴³.

TÉCNICAS DE TINCION PARA CARIOTIPO	
TECNICA	CARACTERISTICAS
BANDAS G o GTG	Los cromosomas se tratan con tripsina para desnaturalizar las proteínas cromosómicas y luego se tiñen con Giemsa. Cada par de cromosomas se tiñe con un patrón característico de bandas claras y oscuras.
BANDAS Q	Los cromosomas se tiñen con quinacrina y se examinan por microscopía de fluorescencia. Los cromosomas se tiñen en patrones específicos de bandas brillantes y opacas. Las bandas brillantes corresponden casi exactamente a las bandas G oscuras.
BANDAS R	Los cromosomas se calientan antes de colorearlos con Giemsa, también se producen bandas claras y oscuras. El patrón de bandas claras y oscuras es opuesto o reverso al observado con bandas GTG.
BANDAS C	Se tiñe específicamente la región centromérica y otras regiones que contienen heterocromatina constitutiva. Implica un tratamiento secuencial con ácido y álcali.
BANDAS NOR	Se utiliza nitrato de plata, definiéndose los tallos de los satélites de los cromosomas acrocéntricos, al teñir complejos de ribonucleoproteína.
BANDAS T	En esta técnica se utiliza naranja de acridina, tiñéndose la región telomérica.
ALTA RESOLUCION	La técnica consiste en hacer bandas G o R en preparaciones cromosómicas en prometafase, cuando los cromosomas no están tan condensados. El bandeado en profase solo se utiliza cuando se sospecha una anomalía estructural.

La técnica convencional de bandeo GTG (Bandas G con tripsina y tinción por Giemsa) continúa siendo la regla o referencia de oro para el resto de técnicas citogenéticas, ya que se encuentra adecuadamente estandarizada, es fácil de realizar y su costo es (relativamente) bajo.

Sin embargo, presenta importantes restricciones técnicas, entre las principales se cuentan: a) el análisis se hace de forma exclusiva observando los patrones de tinción y la morfología de los cromosomas; b) el origen del material adicional en un cromosoma a menudo se desconoce; c) la capacidad de análisis depende de la adecuada dispersión de la metafase⁴⁰. Su nivel de resolución permite identificar alteraciones estructurales de entre 3 y 5Mb.

En los últimos 25 años se han desarrollado diversas técnicas con un poder de resolución cada vez mayor y en la actualidad existen dos plataformas esenciales para el desarrollo de técnicas citogenéticas: la hibridación con fluorescencia *in situ*, y la hibridación genómica comparativa^{39,41}.

La hibridación con fluorescencia *in situ* (FISH) puede utilizarse para estudiar intercambios cromosómicos y rearrreglos complejos, amplificaciones y deleciones, desde un nivel basado en una sola célula¹⁷. En esta técnica una sonda ADN (secuencia de ADN conocida) marcada con un fluorocromo es hibridada con sus secuencias complementarias en blancos citológicos como cromosomas en metafase, núcleos en interfase, fibras extendidas de cromatina, o lo más recientemente desarrollado, microarreglos de ADN³⁹.

La mayoría de las sondas utilizadas en el laboratorio se encuentran disponibles comercialmente. La mayor parte de las sondas caen en cuatro categorías: a) centroméricas; b) locus-específicas; c) teloméricas y subteloméricas; d) específicas para pintado o marcado de un cromosoma completo¹⁷.

Las sondas específicas de gen señalan secuencias blanco de ADN presentes generalmente en una copia en un cromosoma específico. Son utilizadas para identificar translocaciones cromosómicas, inversiones, duplicaciones y deleciones, síndromes genómicos, cromosomas marcadores y amplificaciones, en cromosomas tanto en interfase como en metafase^{5,41}.

Las sondas de secuencias repetitivas se unen a pequeños segmentos con múltiples copias, como por ejemplo las sondas centroméricas o teloméricas. Las sondas centroméricas se utilizan principalmente para la identificación de cromosomas marcadores y detección de alteraciones del

número cromosómico en núcleos en interfase. Las sondas subteloméricas poseen la capacidad de identificar translocaciones crípticas⁴². Las sondas para marcado cromosómico completo (o “whole chromosome painting”) son sondas complejas de ADN que muestran afinidad por la totalidad del cromosoma excepto las regiones centroméricas y teloméricas⁴¹. Existen dos variantes de esta técnica, el M-FISH (multicolor) y el SKY (cariotipo espectral) y difieren en la forma en que los dispositivos de imagen son aplicados al análisis de las combinaciones de fluorocromos⁴².

La hibridación genómica comparativa, o CGH, es un método que proporciona un análisis general del genoma completo y permite la detección de cambios en el número de copias en el ADN. Desde su introducción se ha convertido en un poderoso método alternativo: esta técnica permite el tamizaje del genoma, para la búsqueda de duplicaciones o deleciones, sin ser necesario el conocimiento previo de la región genómica de interés, utilizando la comparación del ADN a estudiar con un control de referencia^{17,41}. En metafases, la resolución del estudio de CGH es de 2-5Mb. La tecnología de CGH basada en microarreglos ofrece una resolución que varía desde 45 kb a 1 Mb, dependiendo de la densidad del arreglo⁴².

Estos métodos se utilizan ampliamente para el diagnóstico clínico prenatal³⁸ y postnatal, el estudio del cáncer, y de forma más reciente, para el análisis de las variaciones en el número de copias a fin de estudiar su contribución en enfermedades. Proveen también una herramienta para analizar la organización tridimensional del genoma³⁹. El uso de estas nuevas tecnologías forma un puente entre los abordajes citogenético y molecular y su mayor ventaja es su alto poder de resolución⁴².

El adecuado diagnóstico de las alteraciones cromosómicas tanto de tipo estructural como numéricas requiere del uso de técnicas de análisis citogenético, la técnica habitual corresponde a la técnica de bandas GTG y el uso de otras técnicas dependerá de la indicación clínica que tenga el paciente.

1.6. INDICACIONES PARA LA REALIZACIÓN DE ESTUDIOS CITOGENÉTICOS

Se estima que no menos de un millón de análisis citogenéticos y moleculares son realizados anualmente en Estados Unidos y representan parte del abordaje convencional en distintos campos médicos, así como la primera línea de estudio para muchos pacientes que presentan malformaciones congénitas, enfermedades mentales, cáncer, o infertilidad. Además, la investigación biomédica básica contemporánea utiliza ampliamente las técnicas de citogenética molecular⁴¹.

Una de las áreas del hacer del médico genetista corresponde el diagnóstico, identificación y manejo de pacientes con cromosomopatías, quienes se encuentran en estudio ya sea por presentar síndromes bien definidos con etiología cromosómica como alteraciones de tipo retraso mental o aborto habitual, entre otras^{44,45}. Las indicaciones clínicas para la realización de estudios citogenéticos se presentan en la Tabla 1.5. En la figura 1.11 se describe la secuencia de intervenciones que debe realizar el genetista clínico para la adecuada evaluación del paciente.

Tabla 1.5. Indicaciones para la realización de estudios citogenéticos. Modificado de Shaffer, 2005⁴⁵.

INDICACIONES PARA ESTUDIO CITOGENETICO	
ETAPA	DATO CLINICO
Todas las etapas	Retraso mental/Falla del crecimiento
	Rasgos dismórficos compatibles con una cromosomopatía particular
	Malformaciones múltiples
	Crisis convulsivas crípticas o de difícil manejo
	Historia familiar de alteración cromosómica
	Neoplasias
Prenatal	Madre mayor de 35 años o padre mayor de 40 años
	Triple marcador anormal
	Sospecha ultrasonográfica de cromosomopatía
	Antecedente de cromosomopatía en progenitores
Neonatal	Malformación mayor o 3 o más malformaciones menores
	Genitales ambiguos
	Óbito de causa desconocida/Muerte neonatal inexplicable
Adolescente	Ginecomastia
	Falta del desarrollo puberal
	Amenorrea primaria/secundaria inexplicada
Adulto	Padres de niños con alteración cromosómica estructural
	Abortos recurrentes/infertilidad inexplicable
	Diagnóstico prenatal

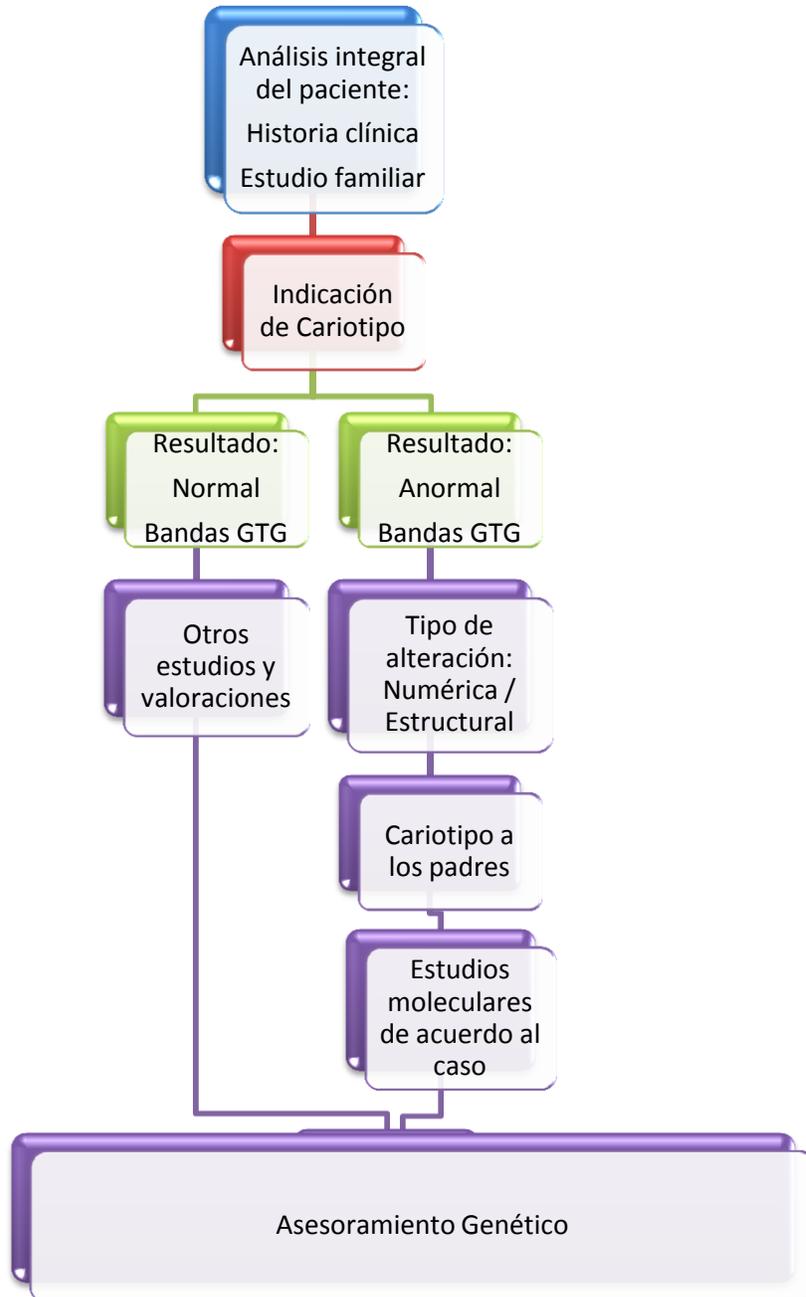


Figura 1.11. Diagrama de flujo que ilustra el abordaje del paciente en cuanto a realización de estudios de citogenética convencional y molecular.

I. 7. ESTRUCTURA DEL CROMOSOMA 22

El cromosoma 22 es el segundo más pequeño de los cromosomas autosómicos humanos, comprende alrededor del 1.6% al 1.9% de la totalidad del ADN genómico. Es uno de los cinco cromosomas acrocéntricos, cada uno de los cuales comparte una importante similitud de secuencias en sus brazos cortos, que contienen genes de rRNA repetidos en tándem. Los estudios de mapeo genético sugieren que el brazo largo del cromosoma 22 (22q) es rico en genes comparado con otros cromosomas⁴⁶. Desde la descripción original por Dunham et al. en 1999 se ha señalado que más del 50% del cromosoma 22 está ocupado por secuencias codificantes⁴⁷.

Las 936 estructuras genómicas descritas para el cromosoma 22 comprenden 445 genes codificantes para proteínas, 24 genes en estudio, 105 transcritos para ARN y 275 pseudogenes⁴⁷.

La longitud de los genes identificados en este cromosoma varía de 1 kb a 583 kb, siendo el tamaño promedio de 19.2 kb. Numerosas estructuras génicas complejas parecen contener exones únicos, mientras que el mayor número de exones encontrados es de 54 (que corresponden al gen *PIK4CA*). El número promedio de exones es 5.4. El tamaño promedio de los exones es 266 bp. El exón más pequeño identificado tiene una longitud de 8 bp (Figura 1.12)⁴⁶.

LONGITUD (pb)	51,304,566
GENES CODIFICANTES CONOCIDOS	445
GENES CODIFICANTES EN ESTUDIO	24
PSEUDOGENES	275
GENES miRNA	31
GENES rRNA	5
GENES snRNA	23
GENES snoRNA	23
OTROS GENES RNA	23

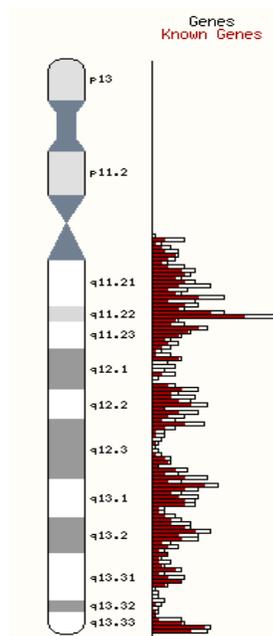


Figura 1.12. Ideograma del cromosoma 22 y su densidad génica
Imagen modificada de Ensembl, 2010¹.

Alrededor del 41.9% de la secuencia del cromosoma 22 comprende familias de secuencias repetidas, dispersas o en tándem⁴⁶. La región 22q11.2 es particularmente rica en repetidos de bajo número de copias, o LCRs. Las secuencias LCR (*low copy repeats* o repetidos de bajo número de copias) se definen como bloques de 1 a 200 kb que se encuentran duplicadas en una o más localizaciones cromosómicas, parecen tener un origen evolutivo reciente ya que comparten una marcada similitud de secuencias y están ausentes en las especies más cercanamente relacionadas al ser humano⁵⁰.

Un total de 8 LCR han sido identificadas en la región 22q11.2. Los LCR22 comprenden bloques de secuencias genómicas que contienen genes, pseudogenes y fragmentos génicos, cada uno de los cuales comparte un 99% de similitud con su secuencia equivalente en otro repetido, aunque cada LCR22 difiere en su tamaño y organización general⁵⁰. Por ejemplo, cinco de los LCR22 contienen copias de los genes codificantes para gamma-glutamil transferasas y genes relacionados⁴⁶. (Figura 1.13)

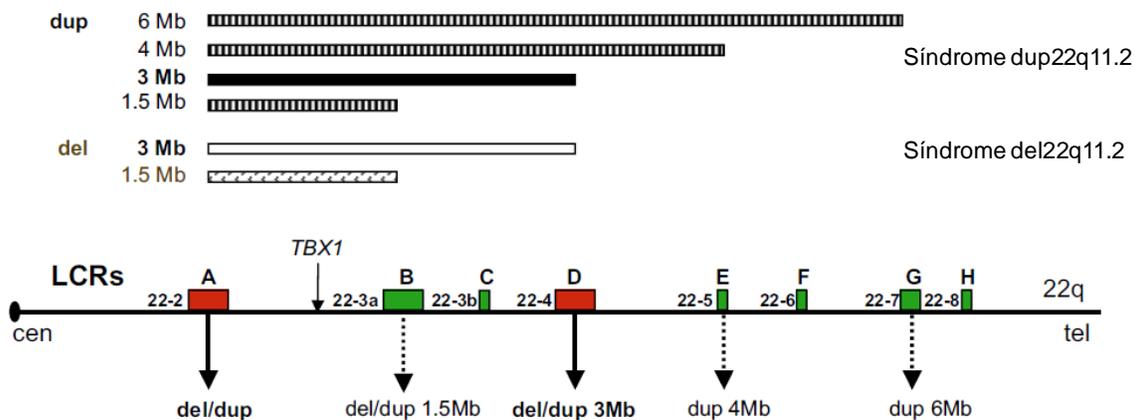


Figura 1.13. Representación esquemática de la región 22q11.2 que muestra la localización de los LCR22 y la mayoría de los puntos de ruptura en deleciones y duplicaciones de 22q11.2 implicadas en síndromes. Modificado de Torres-Juan et al, 2007⁵⁹.

Se ha identificado una secuencia rica en repetidos A-T palindrómicos (PATRR) en el cromosoma 22. En la actualidad se reconocen tres regiones asociadas con rearrreglos cromosómicos: PATRR11, PATRR22 y PATRR17⁴⁹. Los estudios *in vitro* indican que las regiones PATRR adoptan una configuración cruciforme inestable que podría contribuir a la ruptura cromosómica y recombinación^{48,49}.

Varios desórdenes genómicos constitutivos recurrentes, entendidos como alteraciones citogenéticas que involucran un segmento cromosómico que contiene más de un gen²⁹, se relacionan con la estructura genómica de la región 22q. Éstos incluyen los rearrreglos implicados en el síndrome velocardiofacial (VCFS) y el rearrreglo que origina el síndrome de trisomía parcial del 22 derivada de la t(11;22) o Síndrome de Emanuel. Los puntos de ruptura de los rearrreglos se agrupan en la región 22q11. Mientras que las deleciones son resultado de recombinación homóloga no alélica (NAHR) de las LCR22, la translocación t(11;22) es el resultado de la interacción entre las regiones palindrómicas ricas en A-T (PATRR) de los cromosomas implicados⁵¹.

I.8. SÍNDROMES POR ALTERACIONES ESTRUCTURALES DEL CROMOSOMA 22

Los síndromes que pueden asociarse a alteraciones de dosis génica del cromosoma 22 pueden ser por ganancia o pérdida de regiones en este cromosoma.

En la actualidad, los dos síndromes genéticos que se atribuyen a incremento de la dosis génica de 22q11.2 son⁵⁴:

- El Síndrome de Cat-Eye (CES) (MIM 115470)
- El Síndrome de Emanuel (ES) (MIM 609029)

Los pacientes con Síndrome de Cat-Eye presentan una tetrasomía parcial de la región del cromosoma 22 que se expande desde el brazo corto hasta la región 22q11. Las copias extra de esta región se encuentran en la forma de un cromosoma supernumerario, bisatelitado y dicéntrico, aunque puede existir también la duplicación intersticial. Las características clínicas de este síndrome incluyen coloboma del iris y otras características asociadas también a duplicaciones intersticiales de la región 22q11⁶⁰.

El segundo síndrome asociado con incremento de la dosis génica de la región 22q11 es el síndrome del derivado del 22 de la translocación entre los cromosomas 11 y 22 o síndrome de Emanuel (ES). Se presenta en los descendientes de los portadores asintomáticos de la translocación recurrente $t(11;22)(q23;q22)$ que origina una trisomía parcial del cromosoma 11 y del cromosoma 22 por una segregación 3:1, principalmente en las madres⁵². Muchas de sus características clínicas son similares a las encontradas en el síndrome de Cat-eye (cardiopatía congénita, principalmente defecto septal atrial, malformación renal, alteraciones craneofaciales como apéndices preauriculares, pits, y paladar hendido; alteración del tracto genital masculino, estenosis o atresia anal, defectos esqueléticos y retardo mental), aunque también presenta características únicas⁶⁰.

El síndrome hereditario asociado a la microdelección 22q11.2 es:

- Síndrome velo-cardio-facial (MIM 192430)

El síndrome de del22q11.2 es el desorden genómico de mayor frecuencia (1: 2500 - 1:4000 y 1:3800 para población hispana⁶²) y se encuentra entre los síndromes de mayor variabilidad clínica, con más de 180 características asociadas. La deleción 22q11.2 puede ser heredada de forma autosómica dominante o presentarse de forma esporádica⁵⁴.

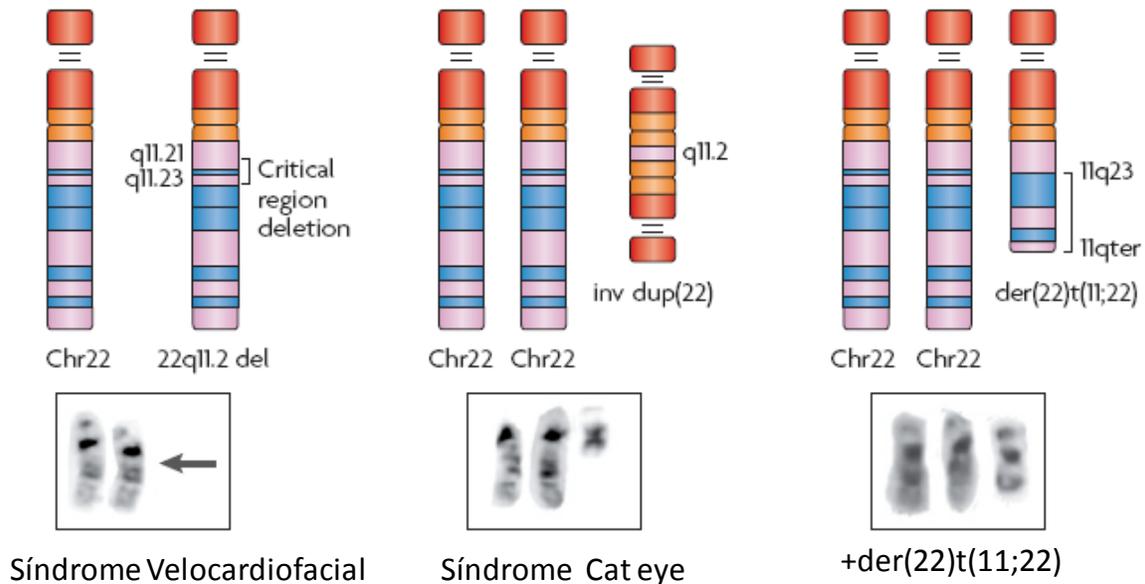


Figura 1.14. Ideograma y cariotipo parcial de anomalías del cromosoma 22. La del22q11.2 está indicada por la flecha, asociada con el SVCF. La inv dup(22) es asociada con el síndrome de Cat eye y el der(22)t(11;22) es un derivado del 22 generado por la translocación entre los cromosomas 11 y 22. Modificado de Emanuel, 2001⁶³.

Otras regiones del cromosoma 22 asociadas con enfermedades humanas son el locus de la susceptibilidad a la esquizofrenia y las secuencias que se asocian con la ataxia espinocerebelosa 10 (SCA10). También se han relacionado con el cromosoma 22 procesos malignos, como el cáncer de mama, Sarcoma de Ewing, meningioma y neurofibroblastoma⁵², así como la translocación t(9;22)(q34;11.2) presente en más del 95% de los casos de leucemia mieloide crónica y en 20-30% de las leucemias linfoides agudas en el adulto.

Dada la frecuencia, relevancia y variabilidad fenotípica de los síndromes relacionados con el cromosoma 22, se decidió estudiar sus características en la población de nuestra Institución en la presente tesis.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Un porcentaje importante de pacientes que acuden a nuestra Institución requieren evaluación con análisis de cariotipo para descartar alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales. Uno de los cromosomas que en años recientes ha llamado la atención al asociarse a síndromes clínicos bien definidos es el cromosoma 22. Con este antecedente, nos propusimos determinar cuál es la frecuencia y qué tipo de alteraciones del cromosoma 22 se han reportado en la población atendida en el Departamento de Genética del Hospital Infantil de México Federico Gómez en el periodo 1979 a 2009. Además, en base en este análisis nos propusimos identificar aquellos casos que podrían beneficiarse de los estudios actualizados tanto de citogenética clásica como molecular. Por ello nos propusimos contestar las siguientes preguntas de investigación:

- 1.- ¿Cuál es la frecuencia de alteraciones del cromosoma 22 reportadas en estudios cromosómicos convencionales con bandas GTG en la población atendida en el Departamento de Genética del Hospital Infantil de México Federico Gómez en el periodo 1979 a 2009?
- 2.- ¿Cuál es el tipo de alteraciones del cromosoma 22 reportadas en el periodo bajo estudio?
- 3.- ¿Cuáles son los síndromes clínicos que pueden asociarse a estas alteraciones?

III. JUSTIFICACIÓN

El HIMFG es un centro referencia de tercer nivel de atención, en donde se atiende a pacientes provenientes de todo el país. Una parte importante corresponde a pacientes con criterios clínicos que requieren la aplicación de estudios citogenéticos, ya sea por presentar características clínicas de síndromes cromosómicos bien conocidos, malformaciones congénitas múltiples o retraso mental. Se ha reportado una alta frecuencia de alteraciones tanto numéricas como estructurales de diferentes cromosomas y en particular del cromosoma 22. Entre estas últimas, el síndrome Velo-cardio-facial (síndrome por microdelección más frecuente en el ser humano), sin embargo no es ésta la única alteración descrita de este cromosoma. Conocer el perfil epidemiológico en relación al tipo y frecuencia de alteraciones de este cromosoma, nos permitirá conocer sus características en nuestra población, los síndromes clínicos o alteraciones del desarrollo asociados a anomalías del cromosoma 22 y además nos permitirá identificar casos de pacientes que podrían beneficiarse de técnicas actualizadas de citogenética clásica y citogenética molecular.

IV. OBJETIVOS

IV.1 General

- Identificar las alteraciones cromosómicas estructurales y numéricas del cromosoma 22 reportadas por cariotipo con técnica de bandas GTG en el laboratorio de Citogenética del Departamento de Genética del HIMFG durante el periodo de 1979 a 2009.

IV.2 Específicos

- Determinar la frecuencia de las alteraciones del cromosoma 22 reportadas en el periodo mencionado.
- Clasificar el tipo de alteraciones identificadas del cromosoma 22.
- Identificar los casos de pacientes quienes pudiesen beneficiarse de los avances de técnicas citogenéticas moleculares.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Se trata de un estudio retrolectivo y descriptivo y de revisión de casos.

V.1 DESCRIPCIÓN DE LA METODOLOGÍA

El análisis que se presenta se realizó en dos fases:

Fase A. Se identificaron los casos reportados por el laboratorio de Citogenética del HIMFG para alteraciones del cromosoma 22, en el periodo de 1979 a 2009, se analizaron los datos obtenidos y se compararon los tipos y la frecuencia encontrados con lo reportado en la literatura.

Fase B. Se seleccionaron aquellos casos de pacientes reportados con alteración cromosómica, quienes podrían beneficiarse del empleo de otras técnicas citogenéticas actualizadas.

La fuente de obtención de datos de los estudios de citogenética fueron las libretas de reporte de resultados de cariotipo del Laboratorio de Citogenética del Departamento de Genética en el periodo de 1979 a 2009. Una vez identificada la alteración cromosómica, se procedió a revisar el expediente clínico correspondiente (en el caso de encontrarse disponible) y en su caso decidir quiénes podrían beneficiarse de estudios complementarios.

V.2 CRITERIOS

V.2.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

FASE A.

- Reporte de cariotipo con bandas GTG que identificara alteraciones numéricas o estructurales del cromosoma 22, realizada en linfocitos de sangre periférica.
- Reporte de cariotipo registrado entre 1979 y 2009.
- Reporte de cariotipo legible y sin ambigüedad en su nomenclatura.

FASE B.

- Caso clínico con expediente disponible.
- Paciente con alteración numérica o estructural del cromosoma 22 cuyo análisis se pudiese beneficiar de técnicas de citogenética molecular.
- Que se contara con consentimiento informado del paciente y su familia para el análisis del caso.

V.2.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

FASE A.

- Reporte de resultado no legible.

FASE B.

- Expediente clínico incompleto o no disponible.
- Casos en los que no se consideró factible la realización del estudio por no ofrecer beneficio.
- Casos en que los pacientes o sus familias no desearan participar en el estudio.

V.2.3. CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

FASE A.

- Resultado registrado con fórmula cromosómica no concluyente.

FASE B.

- Registro hospitalario del expediente clínico del paciente no correspondiente con el registro en la libreta de resultados.
- No hubo posibilidad de obtener muestra o esta fuese insuficiente para los análisis.

V.3 ANALISIS DE LA INFORMACIÓN

Fase A. De los reportes identificados como con alteraciones del cromosoma 22, se analizaron las fórmulas cromosómicas correspondientes y se clasificaron de acuerdo a la nomenclatura internacional y (en los casos necesarios) se actualizaron de acuerdo a la nomenclatura del ISCN 2009⁶⁷. Se realizó análisis de estadística descriptiva y porcentajes identificándose los tipos de alteraciones ya fuesen numéricas o estructurales y en este último caso, los tipos de alteraciones estructurales encontradas.

Fase B. Se identificaron a los pacientes que pudieran beneficiarse del uso de otras técnicas citogenéticas, con expediente clínico disponible y que continuaran asistiendo a nuestra Institución. Con consentimiento informado, aprobación institucional y del comité de tesis se analizaron dichos casos y se ofrecieron técnicas citogenéticas moleculares disponibles. Cada caso se analizó y se proporcionó consejo genético.

VI. RESULTADOS

VI.1 Fase A. Revisión de la frecuencia y el tipo de alteraciones del cromosoma 22

La presente revisión fue realizada en las libretas del laboratorio de citogenética y permitió la identificación un total de 16,128 estudios solicitados correspondientes a las muestras procesadas para cariotipos con técnica de bandas GTG, realizados a pacientes que acudieron a nuestra Institución en el periodo de 1979 a 2009.

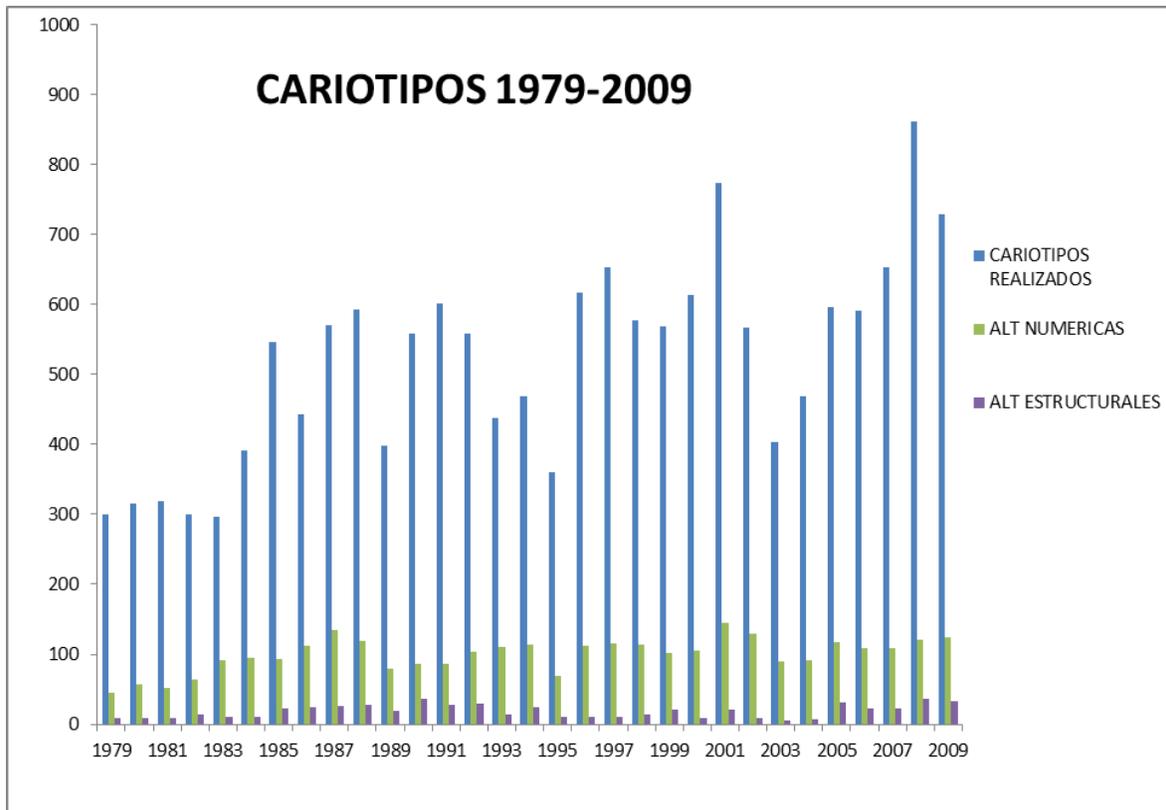
Se obtuvo un resultado en 13,294 de los casos de solicitud. De estos, fue posible identificar algún tipo de alteración citogenética en 3,664 casos. Asimismo se identificó que 3,092 casos correspondían a alteraciones numéricas, siendo el resto (572 estudios) alteraciones de tipo estructural (Tabla 6.1). Del grupo de casos con alteraciones cromosómicas, diez pacientes presentaron una alteración del cromosoma 22 detectada por bandas GTG, siendo todas éstas de tipo estructural.

Tabla 6.1. Cariotipos realizados en el periodo 1979-2009 y alteraciones del cromosoma 22.

CARIOTIPOS REALIZADOS 1979-2009		
CARIOTIPOS	TOTAL	PORCENTAJE
REALIZADOS	16,128	100%
REPORTADOS	13,294	82.42%
CARIOTIPOS SIN ALTERACION	9,630	59.7%
CARIOTIPOS ANORMALES	3,664	22.71%
ALTERACIONES NUMERICAS	3,092	19.17%
ALTERACIONES ESTRUCTURALES	572	3.54%
ALTERACIONES DEL 22 (sin considerar polimorfismos)	10	0.062%

La información descrita, se presenta concentrada en la Gráfica 6.1 en la que se especifica por año el número de resultados de cariotipos reportados con las alteraciones asociadas.

Se encontraron 33 alteraciones de tipo estructural del cromosoma 22, incluyendo polimorfismos.



Gráfica 6.1. Cariotipos realizados en el Departamento de Genética con alteraciones numéricas y estructurales.

En el análisis de las alteraciones reportadas del cromosoma 22 incluyendo polimorfismos, se identifica que hubo 9 cromosomas 22 descritos como bisatelitados, el resto correspondió a casos con alteración estructural. Se consideraron 10 casos relevantes para el análisis ya que fue posible establecer en base a la nomenclatura y sin ambigüedades la alteración relacionada: estos 10 casos se muestran en la tabla 6.2. De éstos, dos casos fueron reportados como cromosomas derivados (que correspondieron a trisomía 22 parcial o síndrome de Emanuel). Un caso correspondió a una probable tetrasomía 22 o síndrome de Cat-Eye. Dos casos se reportaron con cromosoma marcador. En cinco casos se identificó una translocación cromosómica que involucraba a diferentes cromosomas (incluyendo en un caso al cromosoma 22 homólogo). Los cromosomas implicados en la translocación fueron el 5, 12, 18, 17 y 22. El sexto caso identificado como translocación, en el análisis con bandas GTG solo fue posible identificar una del22q, sin embargo por análisis de FISH fue posible determinar que se trata de una translocación recíproca balanceada t(11;22). Este caso corresponde a la madre del paciente registrado en la Tabla 6.2 con el número 9.

Por lo anterior se concluye que los casos con translocación fueron 6, uno de ellos con presentación familiar.

Tabla 6.2. Cariotipos reportados con alteraciones del cromosoma 22.

CARIOTIPOS REPORTADOS CON ALTERACION ESTRUCTURAL DEL CROMOSOMA 22 1979 A 2009		
CASOS	EDAD	FORMULA CROMOSOMICA
CASO 1	N/R	45,XY,t(17;22)
CASO 2	N/R	45,XX,t(22;22)(q10;q10)
CASO 3	1a 10m	46,XY,dup(22)(q ?)
CASO 4	22a	46,XX,der(22)t(18;22)
CASO 5	1a 2m	45,XY,der(5)t(5;22),-22
CASO 6	6 años	46,XX,der(22)t(?;22)
CASO 7	15 años	45,XX,der(12)t(12;22)(q24.2;q11.2),-22
CASO 8	3 años	47,XY,+der(22)t(11;22)(q23;q11.2)mat [25]
CASO 9	35 años	46,XX,t(11;22)(q23;q11.2)
CASO 10	1 año	47,XX,+der(22)(pter-q12)

En relación a sus características epidemiológicas, las edades de los pacientes estuvieron entre los 12 meses y 35 años. Seis pacientes fueron de sexo femenino y 4 de sexo masculino.

El motivo de consulta más frecuente fueron las cardiopatías congénitas. El caso número 4 tuvo indicación para estudio el ser la madre de un paciente con cromosomopatía, pero no fue posible identificar con los datos disponibles en los registros al paciente, su fórmula cromosómica o la impresión diagnóstica.

De los casos anteriores, se consideró factible que dos de ellos, que corresponden a los casos 7 y 8 de la tabla 6.2, podrían beneficiarse de estudios actualizados con técnicas citogenéticas moleculares o se encontraban en proceso actual de estudio. Estos casos fueron estudiados en extenso y se revisan a continuación en la Fase B de esta tesis.

VI.2 CASO 7

Antecedentes prenatales y perinatales.

Paciente femenino actualmente de 15 años de edad, producto de primer embarazo de padres jóvenes, no consanguíneos (Figura 6.1). Padre de 34 años a la concepción con antecedente de hiperuricemia. Madre de 32 años con diagnóstico de arritmia cardíaca desde la infancia, de causa no especificada. Hermano de 8 años sano. Embarazo con control prenatal desde el primer mes, se diagnosticó preeclampsia en el tercer trimestre. Obtenida a las 37 SDG mediante cesárea indicada por hipertensión materna. Pesó 2450gr (p3), talla se desconoce, Apgar 7/8, aparentemente presentó asfixia perinatal moderada.

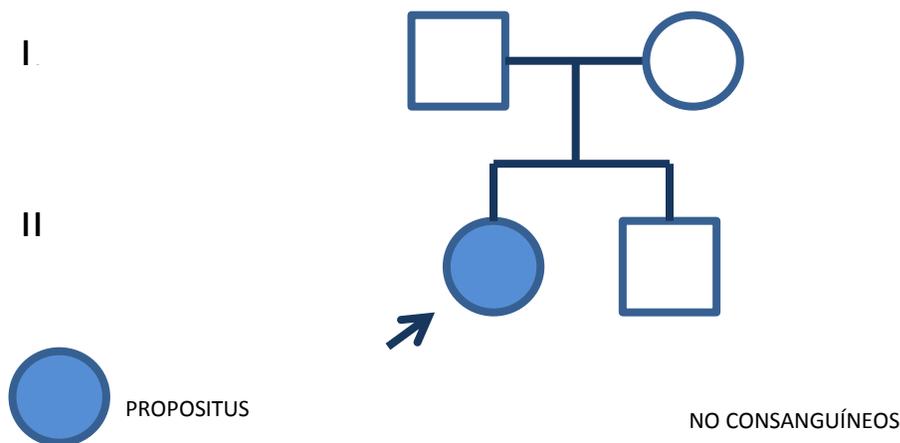


Figura 6.1. Árbol genealógico del caso 7.

Antecedentes personales patológicos.

Se egresó a los 9 días de vida y se diagnosticó estenosis valvular pulmonar. A los dos años de edad se identificó que presentaba hipoacusia conductiva moderada bilateral. Cursó con reflujo gastroesofágico los primeros meses de vida. Fue conocida en nuestra Institución a los cinco años de edad en que acude por cardiopatía, erosión dental anormal y microtia bilateral grado I. Presentó dificultades del aprendizaje e hiperactividad desde los 6 años, así como retraso

importante en el lenguaje, secundario a insuficiencia velofaríngea. Se diagnosticó nevo de Ota derecho a los 12 años. Presentó menarca a los 10 años de edad. Tiene un coeficiente intelectual de 70 puntos.

A la exploración física presenta: Talla de 145cms (<p5), peso 49.6 kgs (<p50). Cráneo braquicéfalo, frente estrecha, cejas escasas, fisuras palpebrales horizontalizadas, puente nasal ancho y alto, punta nasal bulbosa, nariz de base ancha. Filtrum corto y mal definido, labio superior delgado, paladar alto. Pabellones auriculares pequeños, dismórficos, asimétricos y de baja implantación (Figuras 6.2, A y B). Cuello corto y ancho. Tórax ancho con soplo sistólico Grado III/VI. Manos con pulgares largos. Tanner púbico II-III, Tanner mamario III.



Figura 6.2. Fenotipo de la paciente.

Figura A:

Nótense las fisuras palpebrales horizontalizadas, puente nasal ancho y alto, punta nasal bulbosa, nariz de base ancha. Filtrum corto y mal definido, labio superior delgado. Nevo de Ota en región periorbitaria derecha.

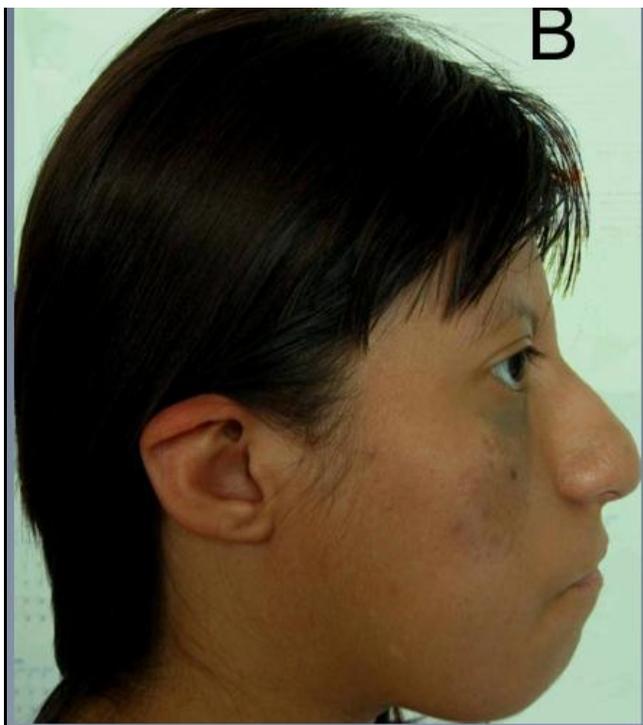


Figura B:

Se observa pabellón auricular pequeño, dismórfico, y de baja implantación.

A los 5 años edad fue valorada por el Departamento de Genética y se consideró un diagnóstico clínico de síndrome Velo-cardio-facial (SVCF). Se solicitó estudio cromosómico con bandas GTG. Continúa su atención en nuestra Institución hasta la actualidad y ha sido valorada por los Departamentos de Adolescentes, Audiología y Foniatría, Cardiología, Dermatología y Pediatría. Psiquiatría diagnosticó trastorno de déficit de atención a los 5 años, tratada farmacológicamente hasta los 14 años. No ha requerido intervenciones quirúrgicas u otra medicación. Presenta hipoacusia profunda bilateral. Tiene escolaridad primaria y colabora en las tareas del hogar.

Estudios de laboratorio de citogenética.

Estudio cromosómico con técnica de bandas GTG.

El estudio de cariotipo con bandas GTG realizado a los 5 años de edad (Biol. Elda Lucía González Rivera) demostró una fórmula cromosómica de 45,XX,der(12)t(12;22)(q24;q11),-22. El estudio cromosómico de ambos padres fue normal. La madre de la paciente se embarazó por segunda ocasión y fue referida a Institución especializada de tercer nivel de atención, no se realizó amniocentesis y se obtuvo producto masculino sano. Se tomó nueva muestra de sangre periférica en 2008 para análisis cromosómico con el objetivo de descartar un mosaico y también para realizar análisis de FISH para definir los puntos de ruptura. La indicación de este estudio se debió a que la banda 12q24, implicada en el rearreglo cromosómico de esta paciente de acuerdo al análisis citogenético convencional, es locus para Síndrome de Noonan, y la paciente presenta algunos datos craneofaciales y estenosis valvular pulmonar que podrían ser compatibles con este diagnóstico. Todos los anteriores son aspectos de gran trascendencia para el asesoramiento genético.

El análisis de 100 metafases confirmó la alteración cromosómica y demostró que no existía mosaicismo (Biol. Mónica Quintana Palma) (Fig. 6.3).

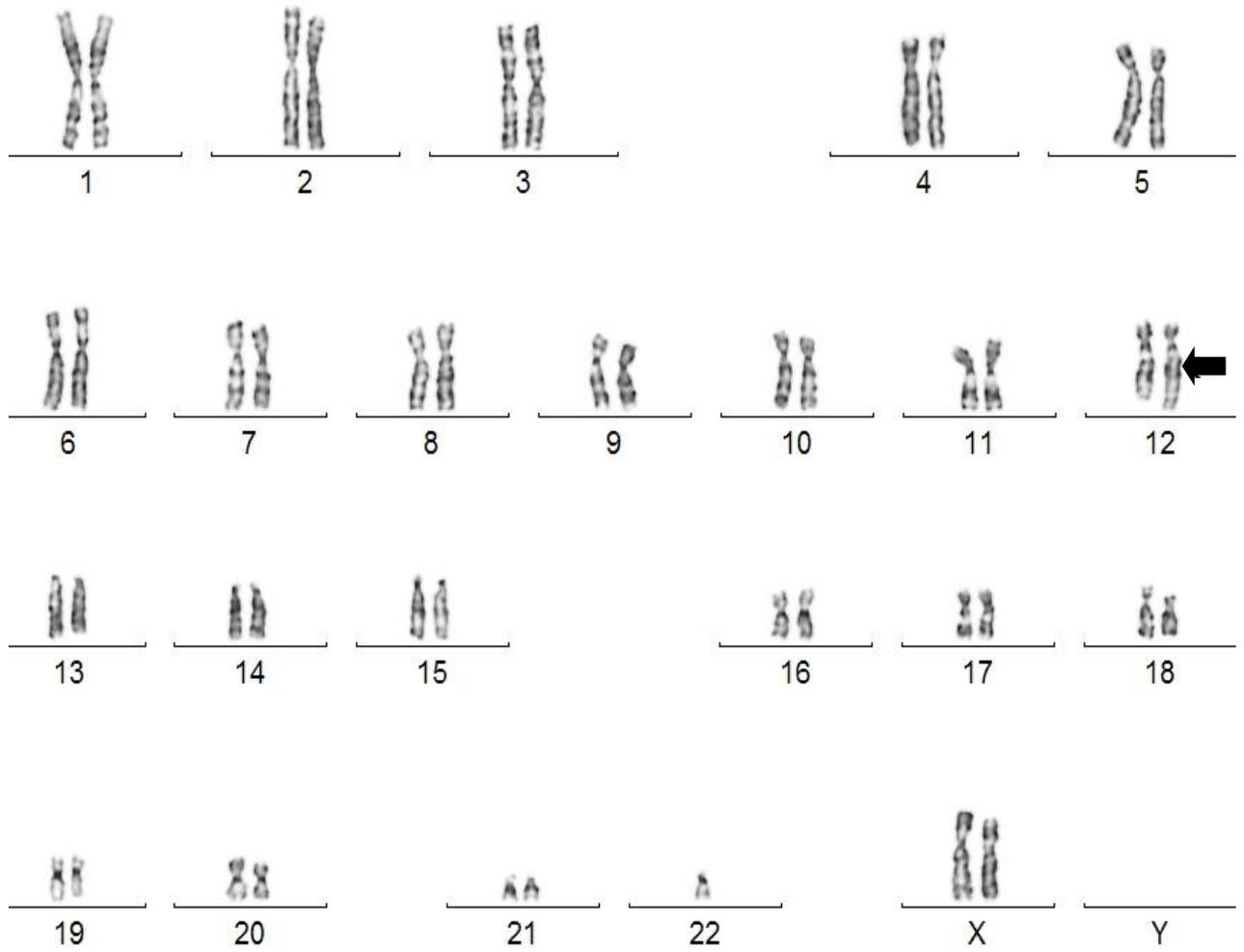


Figura 6.3. Cariotipo de la paciente del caso 7 con bandas GTG. Se observa un único cromosoma 22. El derivado del cromosoma 12 es señalado por la flecha.

Estudio por FISH.

Se realizó análisis por FISH (Dra. Rocío Sánchez Urbina y M. en C. Roberto Guevara Yáñez) con sonda para la región subtelomérica de 12q (Telvysion 12q, Vysis®) y sonda LSI TUPLE1 (Vysis®) para la región 22q11 asociada a síndrome Velo-cardio-facial. El análisis demostró pérdida de sólo los telómeros del cromosoma 12 y que el punto de ruptura en el cromosoma 22 se encuentra en la región 22q11 pero está ausente la región para el síndrome Velo-cardio-facial, lo que se demostró por medio del estudio de FISH. La fórmula cromosómica del análisis por FISH fue:

45,XX,der(12),t(12;22)(qter;q11),-22.ish der(12)t(12;22)(q24.33,q11.2)(VIJyRM2196+,TUPLE1-,ARSA+).

Figura 6.4. Análisis por FISH con sonda Telvysion 12q, Vysis® (señal color naranja). Se identifican dos señales (flechas blancas) que corresponden a ambos cromosomas 12. Se observa la ausencia de la región distal en uno de los cromosomas 12.

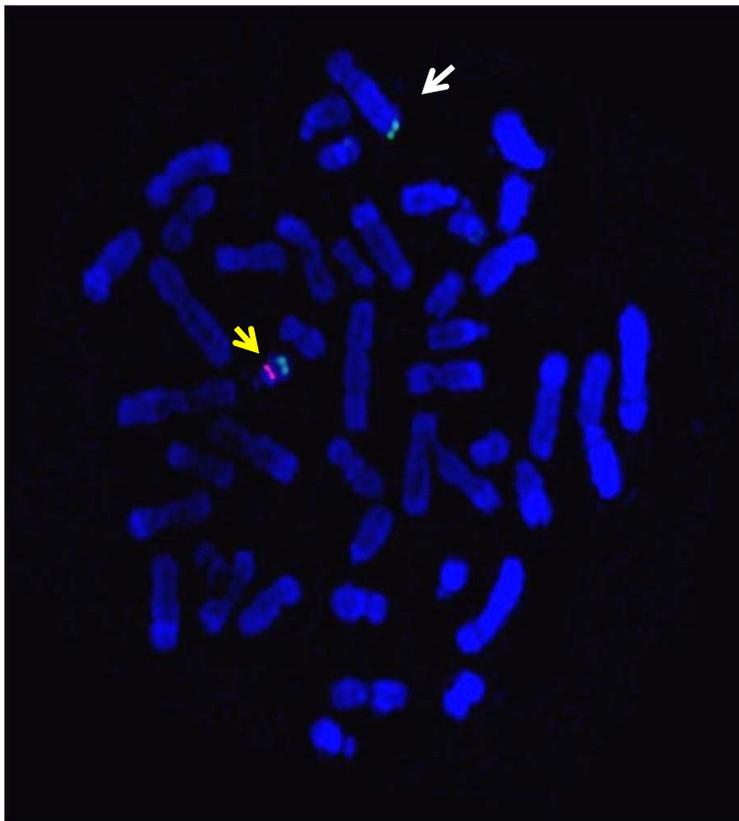
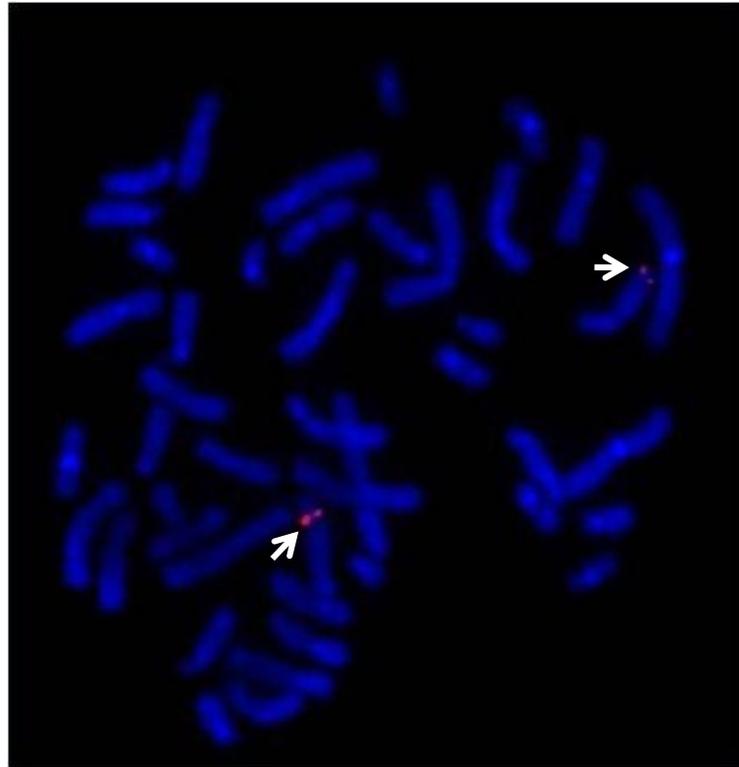


Figura 6.5. Análisis por FISH con sondas LSI TUPLE1 Vysis® (señal color naranja para 22q11.2 y señal verde para región control 22q13.) Se observa solamente una señal naranja, por lo que se concluye que el punto de ruptura en la región 22q11.2 debe estar por debajo de TUPLE1 ya que no está en el derivado del 12. La flecha amarilla señala el cromosoma 22 normal. La flecha blanca indica el derivado con ausencia de señal 22q11.2

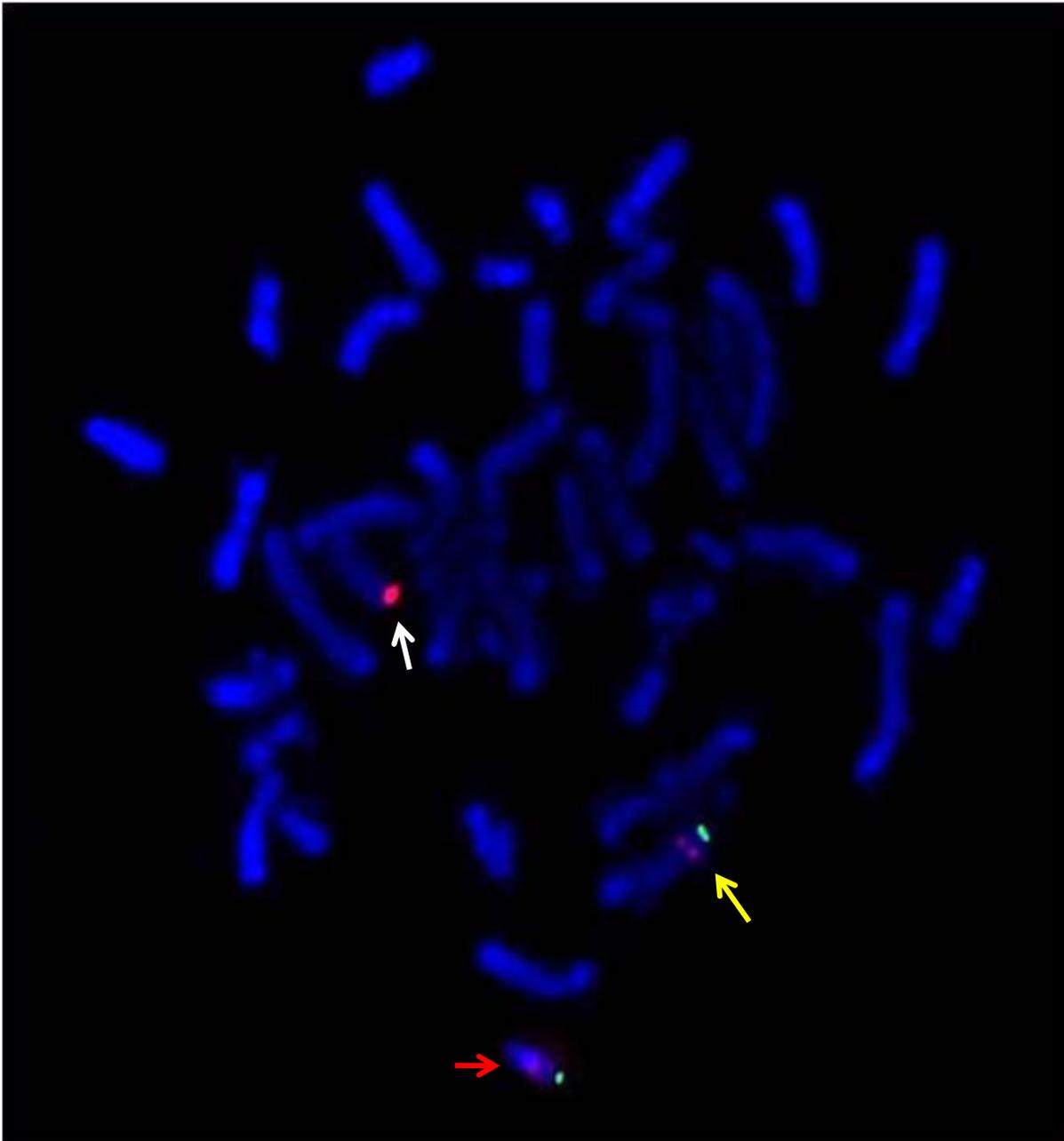


Figura 6.6. Análisis por FISH utilizando las sondas Telvysion 12 y LSI TUPLE1 22q11.2 (Vysis®). Se observa la región subtelomérica del cromosoma 12 normal (flecha blanca). Se identifica el cromosoma 22 normal (flecha roja). El cromosoma 12 derivado presenta una señal para 22q13 y 12q, así como ausencia de la región 22q11.2 (flecha amarilla).

Discusión del caso.

Para el análisis del caso de nuestra paciente con translocación t(12;22) consideramos que deben ser considerados tres aspectos principales. El primero de ellos es el diagnóstico clínico, el segundo las características y diagnóstico del estudio citogenético tanto convencional como molecular y finalmente las implicaciones para el asesoramiento genético de la paciente y su familia.

En relación al primer punto, el diagnóstico clínico de la paciente fue desde el principio un SVCF. Una parte de la evaluación de este diagnóstico es la realización del estudio cromosómico. El análisis citogenético por bandas GTG demostró una translocación t(12;22), afectando los puntos de ruptura identificados en este rearrreglo a la región 22q11.2, lo que por una parte apoya el diagnóstico de SVCF y en un inicio, con las técnicas disponible en la época, se consideró que involucraba a la región telomérica del cromosoma 12 y afectaba la región q24, lo que podría orientar a un diagnóstico diferencial con el Síndrome de Noonan. Al ser los cariotipos de ambos padres considerados como sin alteraciones por citogenética convencional, se concluyó que la presentación de esta alteración era *de novo*. La revisión clínica de la paciente fue cuidadosa para identificar cualquier anomalía y en particular orientada a descartar dismorfias o malformaciones que pudiesen estar asociadas a SVCF y/o a alteración del cromosoma 12.

El síndrome de delección 22q11.2 o SVCF es el desorden genómico que con mayor frecuencia se diagnostica en los seres humanos, con una frecuencia de 1: 2500 - 1:4000 recién nacidos vivos^{56,62}. Se considera entre los síndromes de mayor variabilidad clínica ya que a la fecha se han descrito más de 180 características asociadas. Los datos clásicos reportados incluyen dismorfias faciales, defectos cardiacos troncoconales, hipoparatiroidismo e hipocalcemia, inmunodeficiencia por depleción de células T, así como alteraciones del paladar⁵⁶. Es un espectro fenotípico muy amplio con variabilidad de expresión, que va desde alteraciones faciales o cardiacas aisladas (como serían algunos casos de tetralogía de Fallot, 6% según Krieger y colaboradores, 2007) hasta presentaciones muy severas que incluyen al Síndrome de DiGeorge^{55,56}. Por lo anterior, el establecimiento del diagnóstico clínico de este síndrome abarca a un gran número de pacientes pero se considera que sólo en los que por análisis de FISH se identifica la del22q11.2 corresponden a este diagnóstico.

En cuanto a los rasgos dismórficos faciales pueden incluso ser poco evidentes; lo más destacado es una nariz característica, prominente y tubular, con la raíz nasal ancha y aplanada y surco subnasal corto, y los ojos con hendidura palpebral estrecha, así como retrognatia^{55,56}. Las orejas suelen ser pequeñas, asimétricas y con implantación baja⁶⁵. Nuestra paciente presentaba todos los datos clínicos anteriores. (Tabla 6.3).

Tabla 6.3. Características reportadas en pacientes con SVCF y presentadas por la paciente^{56,62}.

CARACTERÍSTICAS REPORTADAS EN PACIENTES CON SVCF Y PRESENTADAS POR LA PACIENTE	
Fascies hipotónica	Retraso del desarrollo
Hipoplasia de esmalte y/o caries	Retraso de lenguaje
Retrognatia	Hipernasalidad
Insuficiencia velofaríngea	Falla en el crecimiento
Retraso leve del desarrollo/ Talla baja	Hipoacusia neurosensorial
Falla en el crecimiento	Alteraciones del aprendizaje
Puente nasal prominente, ancho	IQ bajo en edad escolar
Punta nasal bulbosa	Deficit de atención / Hiperactividad
Fisuras palpebrales estrechas	Pabellones auriculares dismórficos

Otros defectos asociados son las cardiopatías conotruncales: nuestra paciente presentaba estenosis valvular pulmonar, la cual corresponde a este grupo y además llama la atención que es uno de los tipos de alteración menos frecuentes⁵⁵. Se han diagnosticado defectos renales y musculoesqueléticos, los cuales no presentaba nuestra paciente.

Por lo anterior, la evaluación de la paciente demostró que presentaba criterios para considerar el diagnóstico de SVCF, lo cual fue confirmado por el análisis de FISH. La literatura internacional, indica que no existe correlación entre el tamaño de la deleción y el cuadro clínico, este puede ser muy variable inclusive dentro de la misma familia^{66,69}.

En la esfera neuropsicológica pueden presentar retraso mental habitualmente leve, retraso en el desarrollo motor y del lenguaje, problemas de aprendizaje, déficit de atención y dificultades en las relaciones sociales. Recientemente se ha descrito también su relación con trastornos psiquiátricos, entre los que se incluyen autismo, trastornos afectivos, trastorno por déficit de atención e hiperactividad y esquizofrenia, que es una manifestación tardía que puede aparecer hasta en un

30% de los casos^{65,66}. Consideramos que la alteración del aprendizaje y de la atención así como del lenguaje que presenta nuestra paciente se asocia al diagnóstico de del22q11.2.

Por otra parte, se ha reportado que alteraciones subtelméricas se relacionan con retraso mental⁹⁰ (Sisternans y colaboradores, 2004), al tener nuestra paciente la alteración identificada por FISH en el cromosoma 12 si bien es en la región telomérica, no podemos descartar que esta situación se sume al cuadro clínico ya que para ello se requeriría de análisis del tipo CGH-microarreglos.

En relación a la región cromosómica afectada, en los pacientes con del22q11.2 y a pesar de la presentación clínica heterogénea, se encuentran deleciones marcadamente homogéneas y sólo se han reportado un pequeño número de deleciones atípicas. Aproximadamente 90% de los pacientes tienen una región deletada (RTD) de 3Mb, que contiene alrededor de 45 genes, mientras que el 8% presenta una deleción de 1.5Mb, que contiene aproximadamente 24 genes⁶⁷. Se han caracterizado secuencias repetidas cortas en la región 22q11 (LCR22), que flanquean la Región Típica Deletada (RTD) y la región de 1.5Mb. Los eventos de recombinación desigual entre las LCR flanqueantes explican la recurrencia de deleciones de tamaño uniforme (Figura 6.7). Se estima que en el 5-10% de los casos la deleción es heredada, siendo el resto deleciones *de novo*^{69,64}.

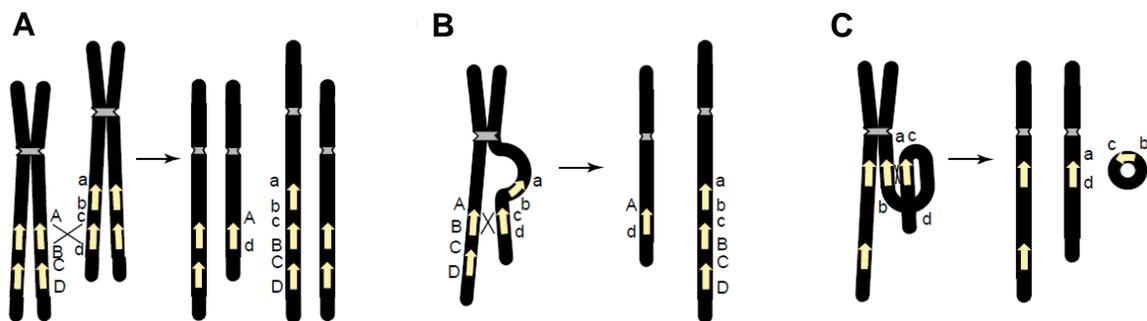


Figura 6.7. Representación esquemática de rearrreglos cromosómicos por recombinación homóloga no alélica basada en la alineación entre repetidos en bajo número de copias (flechas amarillas). La figura describe los LCR de forma horizontal acorde a la orientación y estructura. A) Recombinación intercromosómica B) Recombinación intracromosómica. C) Recombinación intracromátide. Modificada de Lupski, 2006⁹⁰.

La región 22q11.2 contiene al menos 8 LCR22s cuatro de las cuales se localizan en o flanquean las deleciones más frecuentes (Figura 1.14). Estas LCR22s han sido nombradas en orden secuencial, de centroméricas a teloméricas: LCR22-2 (o LCR22-A); LCR22-3a (o LCR22-B); LCR22-3b (o LCR22-C); y LCR22-4 (o LCR22-D) (Figura 6.8)⁶⁷.

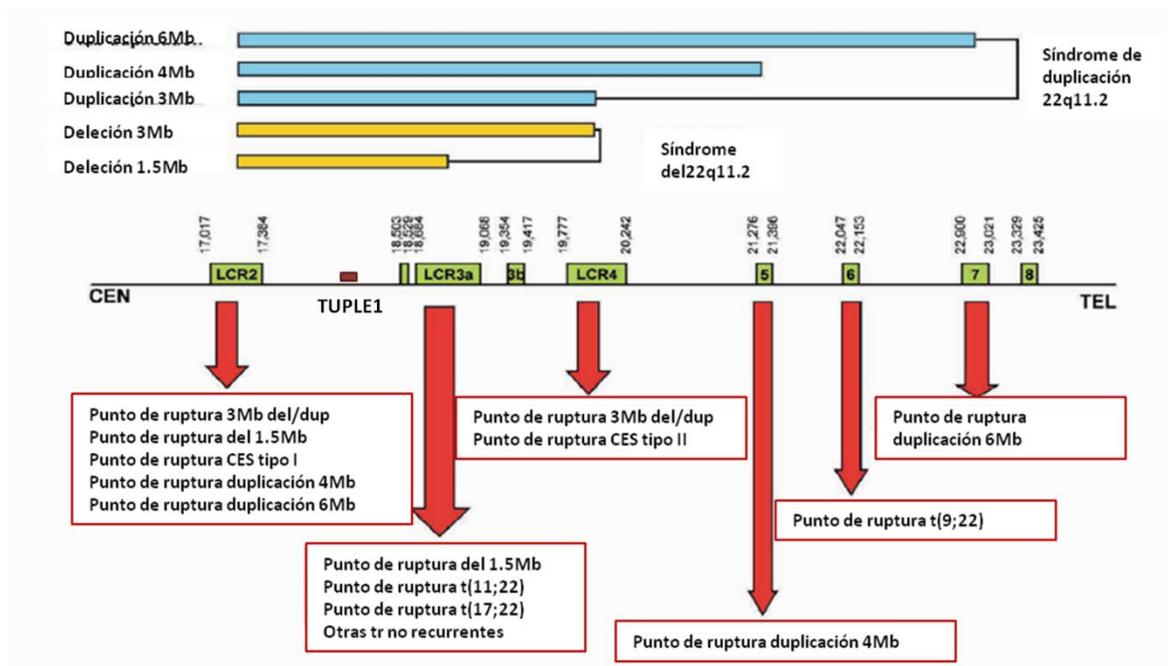


Figura 6.8. Puntos de ruptura recurrentes en las deleciones germinales y somáticas, duplicaciones y translocaciones que han sido descritas dentro de la región 22q11.2. Las líneas amarillas muestran la longitud de las deleciones y las azules muestran la longitud de las duplicaciones. Imagen modificada de Heine-Suñer, 2007⁵⁹.

La gran mayoría de los pacientes que presentan la deleción (97%-98%) presentan un punto de ruptura proximal dentro de LCR22-2 (o LCR22-A), mientras que el punto de ruptura distal puede variar, y en el 90% de los pacientes cae dentro de LCR22-4 (o LCR22-D), lo que produce una deleción de 3Mb (Región Típica Deletada o RTD); o en el 7% de los pacientes se presenta dentro de LCR22-3a (o LCR22-B), produciendo una deleción de 1.5 Mb⁶⁷. Para el diagnóstico definitivo de SVCF para las alteraciones de la dosis de la región 22q11.2 se utiliza la hibridación fluorescente *in situ* y generalmente se utilizan dos sondas comerciales conocidas como LSI TUPLE1 o N25⁶⁸. La sonda TUPLE1 consta de 110kb y abarca los segmentos D22S553, D22S609 y D22S942 en la región 22q11.2. La localización precisa se indica en la figura 6.8.

Entre los genes localizados en la región 22q11.2 se considera que el de mayor relevancia para el fenotipo de los pacientes con SVCF es *TBX1*. Este gen pertenece a la familia de factores de transcripción T-box, los miembros de esta familia están implicados en el desarrollo del mesodermo y endodermo, en el desarrollo del corazón y en la morfogénesis de las extremidades. Jerome y Papaioannou en el 2001 reportaron el fenotipo de ratones homocigotos y heterocigotos para mutaciones en *Tbx1*⁶¹. Los homocigotos morían en el período perinatal y mostraban características compatibles con el síndrome por delección 22q11 como defectos cono-troncales, dismorfias faciales, paladar hendido e hipoplasia de timo y paratiroides. Los heterocigotos sólo presentaban alteraciones del arco aórtico y aunque no mostraban todo el fenotipo, los resultados muestran que *TBX1* es determinante en el fenotipo del SVCF¹⁶¹.

Si bien lo más frecuente en los pacientes con SVCF es identificar por FISH la del22q11.2, se considera que el análisis de cariotipo por bandas GTG sigue siendo relevante ya que permitirá descartar otros rearrreglos cromosómicos que pudiesen contribuir al fenotipo. Por otra parte, estas alteraciones también tendrán un impacto en el asesoramiento genético. La mayoría de los casos de SVCF, como se ha comentado, son *de novo* y existen pocos casos familiares reportados.

Excepto por los rearrreglos que incluyen a los cromosomas 11 y 17, la base molecular de otras traslocaciones recíprocas que involucran a 22q11.2, a la fecha se desconoce⁷¹. En este contexto, Morrow y colaboradores (2003)⁷⁰ reportaron 14 individuos, en cinco de los cuales los puntos de ruptura ocurrieron en el mismo LCR22 que en la translocación (11;22) mencionada anteriormente. (Tabla 6.4⁷⁰).

Entre los rearrreglos cromosómicos menos frecuentes en esta región, se han reportado a la t(1;22) y t(4;22) en pacientes con SVCF. Estas translocaciones, de manera interesante, comparten el mismo punto de ruptura dentro de LCR22B, en una región aún no completamente secuenciada⁷⁰. Se ha descrito una región rica en repetidos A-T en el punto de ruptura dentro de LCR22B así como en los puntos de ruptura de los otros cromosomas implicados en estos rearrreglos. Lo anterior es relevante ya que su naturaleza palindrómica se ha relacionado con la formación de estructuras cruciformes o en asa, lo que promovería los rearrreglos mediante la producción de rupturas de doble cadena seguidas de reparación mediante unión de extremos no homólogos⁶³.

Tabla 6.4. Casos reportados en la literatura de rearrreglos cromosómicos que involucran la región 22q11.2. Modificado de Morrow et al, 2003⁷⁰.

TRANSLOCACIONES QUE INVOLUCRAN LA REGION 22q11.2	FENOTIPO
46,XY,t(10;22)(q26;q11.2)	Normal. Hijo con translocación no balanceada y diagnóstico de Síndrome de DiGeorge
46,XY/46,XY,t(14;22)(q32.2;q11.2)	Poliposis adenomatosa de colon
46,XX,t(15;22)(q26.1;q11)	Malrotación del duodeno, agenesia renal derecha
46,XX,t(16;22)(q24.2;q11.2)	SVCF
46,XX,t(16;22)(p13.31;q11.2)	Normal. Hija con translocación no balanceada y anoftalmía, cardiopatía congénita, pabellones de situación asimétrica, pliegue palmar transverso
46,XX,t(17;22)(p13;q11)	Normal
46,XX,inv(5),t(17;22)(p13;q11)	Normal
45,XY,-1,-22,+t(1;22)(p36;q11)	SVCF
45,XY,-3,-22,+t(3;22)(q29;q11)	Ausencia de timo y paratiroides, labio y paladar hendido, cardiopatía
45,XY,-4,-22,+t(4;22)(q35;q11)	DiGeorge parcial
45,XX,-11,-22,+t(11;22)(q25;q11)	SVCF, retraso del desarrollo, anemia persistente, talla baja, microcefalia, pabellones de baja implantación, nariz aplanada, estenosis pulmonar, doble arco aórtico, retardo mental
45,XY,-13,-22,+t(13;22)(q34;q11.2)	No disponible
45,XY,-18,-22,+t(p11.3;q11)	SVCF
25,XX,-21,-22,+t(q22;q11)	Peso bajo para la edad gestacional, pulmones hipoplásicos, hidrocefalo, cardiopatía congénita.

De acuerdo a las estimaciones de Morrow y colaboradores (2003), en estudios de amniocentesis se ha demostrado existe una frecuencia de 1:2000 casos en que los productos son portadores de una translocación recíproca *de novo*⁷⁰. En relación a los puntos de ruptura, en el caso del cromosoma 22, estos ocurren cerca de los LCR22. Se ha encontrado que el 57% de las translocaciones de 22q11.2 involucran las bandas más terminales de los demás cromosomas involucrados. (Morrow⁶⁹, Warburton⁷⁹).

También se ha reportado que en un análisis de portadores de translocaciones recíprocas, diagnosticados en 200 casos de amniocentesis, 39% tenían uno de los puntos de ruptura en su banda más telomérica. Por lo anterior se ha sugerido que existe un incremento en la frecuencia de rearrreglos que involucran bandas teloméricas y la región 22q11.2, y que esto no sea precisamente una situación al azar⁶⁹. Existe la posibilidad de que estos rearrreglos sean viables e

incluso que la monosomía de pequeños segmentos teloméricos de los cromosomas sea mejor tolerada (en relación a la viabilidad de los productos) que aquellas alteraciones que ocurran en puntos de rupturas más proximales, ya que éstas resultarían en un mayor desbalance cromosómico⁷⁰.

Aunque no es la intención de esta tesis, debe mencionarse por su frecuencia la translocación t(9;22)(q34;11.2) presente en más del 95% de los casos de leucemia mieloide crónica así como en 20-30% de las leucemia linfocítica aguda en el adulto, y cuyo punto de ruptura en el cromosoma 9 es de localización distal. Esta translocación es usualmente recíproca, y el cromosoma 22 derivado del rearrreglo es llamado cromosoma Philadelphia. El mecanismo molecular de este rearrreglo está comenzando a ser estudiado y se ha relacionado con recombinación homóloga no alélica mediada por duplicaciones segmentales en ambos cromosomas⁸³.

En nuestra paciente se consideró que el mecanismo de translocación ocasionó una del22q11.2 con manifestación fenotípica de SVCF. A la fecha y en las diversas bases consultadas, no existen otros casos reportados en la literatura que incluyan específicamente la t(12;22).

Al tener la paciente una translocación, es importante para el proceso de asesoramiento genético el considerar el impacto que tiene en la posible segregación de los cromosomas afectados. En este respecto debe tomarse en consideración que existe la posibilidad de 3 tipos de segregación: alterna, adyacente 1 y adyacente 2.

En caso de presentarse la fecundación de gametos derivados de la segregación alterna, los posibles productos serían un producto con cariotipo normal y por ende fenotipo normal y un producto con el derivado del 12 de la translocación t(12;22), al cual faltaría el derivado del 22 y por ende tendría delección desde la región centromérica del cromosoma 22 hasta la región 22q11.2, lo que correspondería al tipo de alteración vista en la paciente.

Para los productos de la segregación adyacente 1, las posibilidades serían una monosomía del 22 y una trisomía parcial del cromosoma 22.

En el caso de presentarse una segregación de tipo adyacente 2, se obtendría un producto con trisomía prácticamente completa del cromosoma 12 y una monosomía parcial del cromosoma 22 con delección de la región 22q11.2. La otra posibilidad en este tipo de segregación es un producto con monosomía completa del cromosoma 12.

En relación a estas posibilidades, en principio solamente los productos de la segregación alterna son los que podríamos considerar como viables, uno siendo cromosómicamente normal y el otro con la $t(12;22)$, lo que corresponde a un riesgo del 50% de presentar la delección de la región 22q11.2 y por ello presentar el fenotipo de la paciente.

Estas posibilidades se ilustran en la Fig. 6.9.

Es importante recordar que en el caso de nuestra paciente, desde su primer abordaje clínico genético se estableció el diagnóstico de SVCF y también se determinó la $t(12;22)$ por técnica de bandas GTG. La posibilidad de aplicar técnicas citogenéticas actualizadas pone de manifiesto que puede proporcionar información importante para el conocimiento y mejor entendimiento de los fenotipos.

También se aporta información valiosa sobre los síndromes y su relación con las diferentes alteraciones citogenéticas. Es importante también destacar la importancia del estudio integral de los pacientes ya que si bien el fenotipo estaba bien establecido, al realizarse el protocolo de abordaje de este tipo de pacientes se identifica (como en este caso), rearrreglos poco frecuentes, aspecto relevante para el asesoramiento genético.

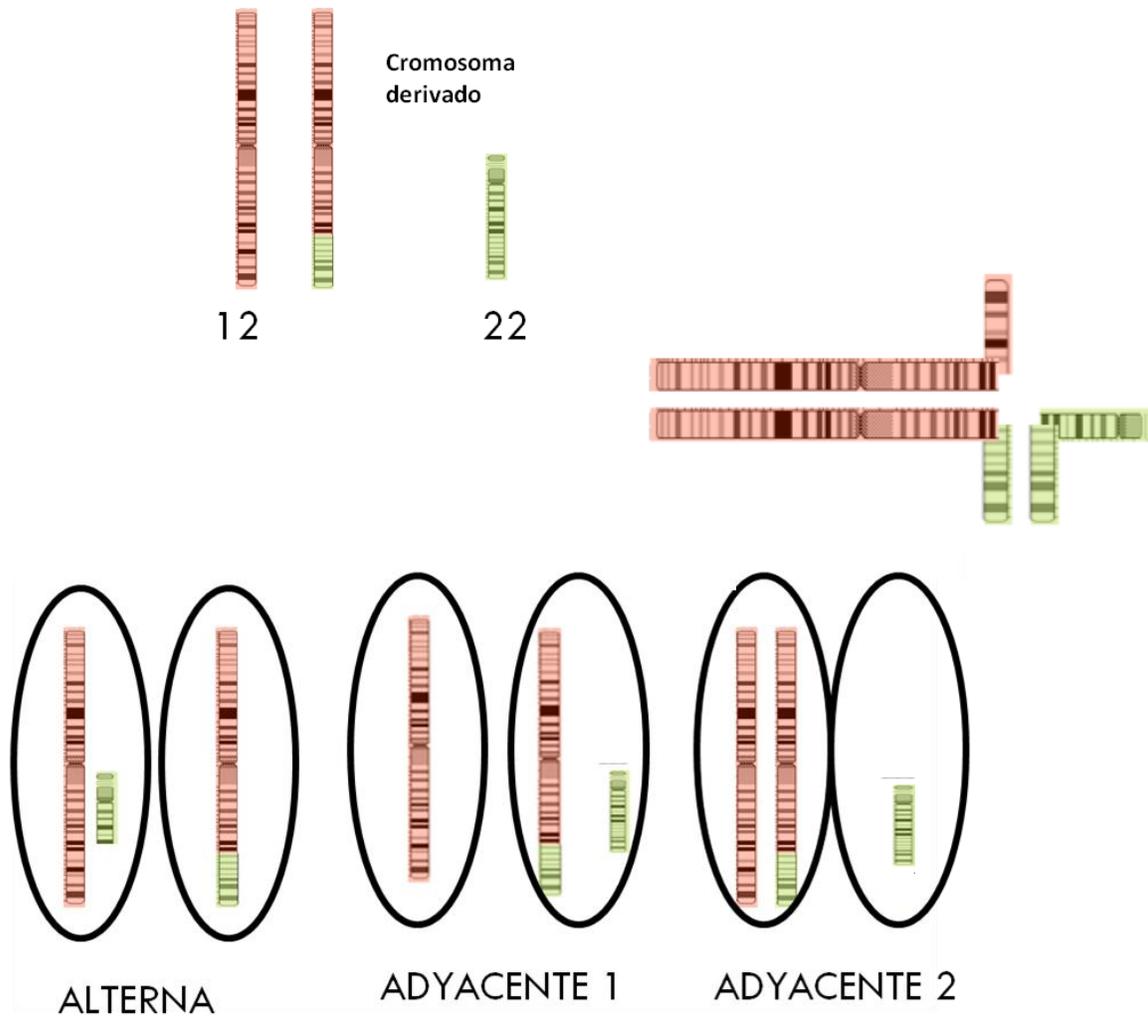


Figura 6.9. Análisis de la segregación meiótica.
 Ideogramas de los cromosomas modificados de Stratchan, 2004⁴.

VI.3 CASO 8

Antecedentes prenatales y perinatales.

Masculino de tres años y tres meses de edad, producto de la segunda gesta de padre de 44 años, diagnosticado con vitiligo. Madre de 35 años, con antecedente de alergia a la proteína del huevo y probable miomatosis. Antecedente de un aborto previo del primer trimestre de causa no especificada. Abuelo materno con diagnóstico de cáncer óseo no especificado y diabetes mellitus, abuela materna con hipertensión arterial. Abuelo paterno con hipertensión arterial, abuela paterna con artritis reumatoide, tío paterno con esquizofrenia. Niegan consanguinidad (Figura 6.10).

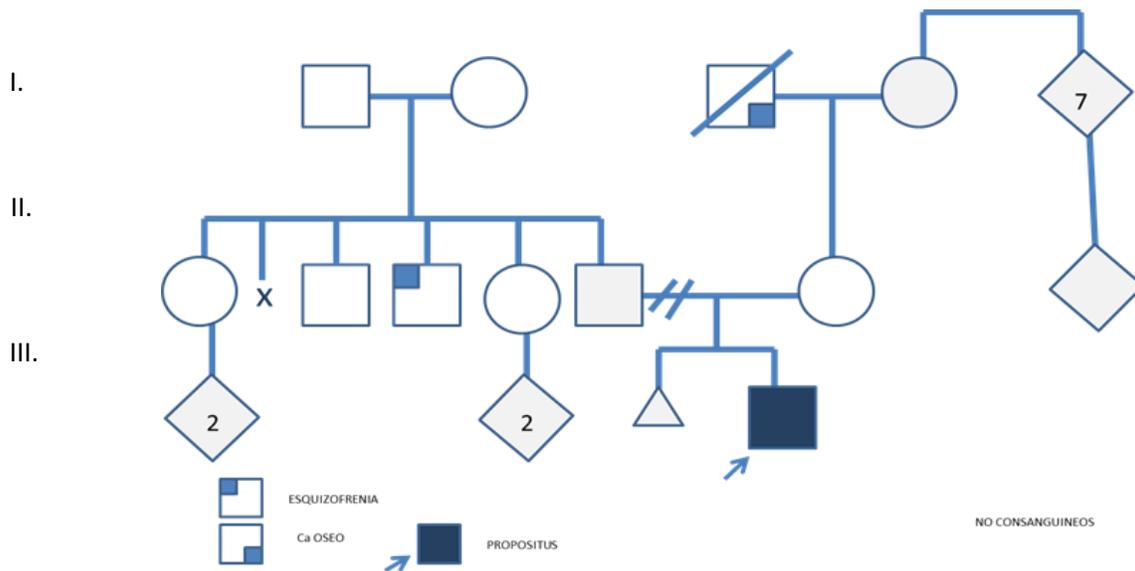


Figura 6.10. Árbol genealógico del caso 8.

Producto de embarazo que cursó con cervicovaginitis por candida durante el primer trimestre, tratamiento no especificado. Hipertensión arterial a partir del sexto mes sin tratamiento farmacológico. Se realizó ultrasonido prenatal a la semana 26 de gestación en el que se diagnosticó hernia diafrágica izquierda. Fue obtenido a las 36 semanas de gestación por trabajo de parto prematuro, se realizó cesárea indicada por antecedente de malformación mayor. Presentó llanto y respiración espontánea al nacimiento, peso 2900 gr (p75), talla 48 cm (p50), Apgar 8/9 y Capurro de 36 semanas de gestación.

Antecedentes personales patológicos.

Requirió de intubación al nacimiento, se realizó cirugía correctiva de hernia diafragmática izquierda a las 32 horas de vida. Durante su estancia hospitalaria requirió de apoyo ventilatorio por 6 días así como de nutrición parenteral por una semana. Se realizó tamiz metabólico ampliado que fue reportado como normal. Se egresó al mes de edad, iniciándose tratamiento antirreflujo. Continuó en revisiones periódicas con médico pediatra particular.

Al mes de vida cursó con polipnea, por lo que es valorado por cardiólogo pediatra quien indica ecocardiograma el cual demostró datos de hipertensión pulmonar. Se inició manejo diurético con captopril, furosemide y espirolactona.

A los dos meses de vida es valorado por médico oftalmólogo quien descarta retinopatía. A los seis meses se realizó nueva valoración cardiológica, encontrándose presión normal de la arteria pulmonar. Cursó con neumonía que ameritó manejo intrahospitalario en dos ocasiones, a los 5 y 7 meses de edad. Es valorado a los siete meses de vida por nutrióloga pediatra por peso bajo y pobre ganancia ponderal, se inicia manejo dietético.

Fue enviado a nuestra Institución al año y cinco meses de edad para evaluación integral con los siguientes diagnósticos: defecto congénito mayor corregido, pobre ganancia ponderal a pesar de manejo nutricional, retraso del desarrollo psicomotor y perímetro cefálico por debajo de la p3 con estudio de imagen por resonancia magnética normal. Tiene antecedente de realización de cariotipo realizado en el lugar de origen del paciente, en el cual se reporta una trisomía 22.

En nuestra Institución fue valorado inicialmente por el Departamento de Gastroenterología, se indicó tratamiento por reflujo gastroesofágico y desnutrición. Fue referido al Departamento de Genética al año y 10 meses de edad. Presenta retraso del desarrollo psicomotor y del lenguaje. A los 2 años 3 meses requirió resección intestinal de 50 cm, secundaria a enterocolitis aguda realizada en hospital de segundo nivel.

A la exploración física a los 2 años y 10 meses de edad presentaba una talla de 83.6 cm, peso de 8,150 grs. Se encontró íntegro y reactivo. Frente amplia, cejas pobladas, ojos simétricos, fisuras

palpebrales oblicuas hacia abajo. Nariz pequeña con puente nasal deprimido y narinas antevertidas, filtrum largo y prominente. Boca con paladar íntegro, alto y estrecho, mentón triangular con retrognatia. Pabellones auriculares prominentes, dismórficos, de baja implantación y con fosetas preauriculares bilaterales. Tórax con pezones de baja implantación y red venosa aparente. Campos pulmonares con adecuada transmisión de murmullo vesicular, ruidos cardiacos rítmicos. Abdomen blando depresible, sin visceromegalias. Criptorquidia izquierda. Extremidades íntegras con tono disminuido. Actualmente el paciente tiene 3 años y 10 meses de edad, su fenotipo no ha mostrado cambios mayores (Fig.6.11).



Figura 6.11. Fenotipo del paciente.

A, Se observa frente amplia, cejas pobladas, ojos simétricos, fisuras palpebrales oblicuas hacia abajo, nariz pequeña con narinas antevertidas, filtrum largo, prominente, mentón triangular.



B. Pabellones auriculares prominentes, dismórficos, de baja implantación. Retrognatia.

Estudios de laboratorio de citogenética.

Estudio cromosómico con técnica de bandas GTG.

Ante el antecedente del reporte de estudio cromosómico, se solicitó nuevo cariotipo del paciente a fin de corroborar el diagnóstico de envío y realizar el estudio familiar para otorgar asesoramiento genético.

Se realizó de cariotipo con técnica de bandas GTG en linfocitos de sangre periférica, el cual demostró el diagnóstico de trisomía parcial del cromosoma 22 con una fórmula $47,XY,+der(22)$ (Biol. Mónica Quintana Palma) (Figura 6.12). Por lo anterior se realizó estudio citogenético a ambos padres.

El cariotipo del padre fue normal. El cariotipo de la madre presentó una deleción en el cromosoma 22, con fórmula cromosómica $46,XX,del(22)(q13)$ (M. en C. Judith Villa Morales) (Fig. 6.13). El cariotipo de la abuela materna fue normal. Es importante destacar el polimorfismo de los tallos de los satélites en el cromosoma 22 con el rearreglo, que se observa en la madre y el paciente.

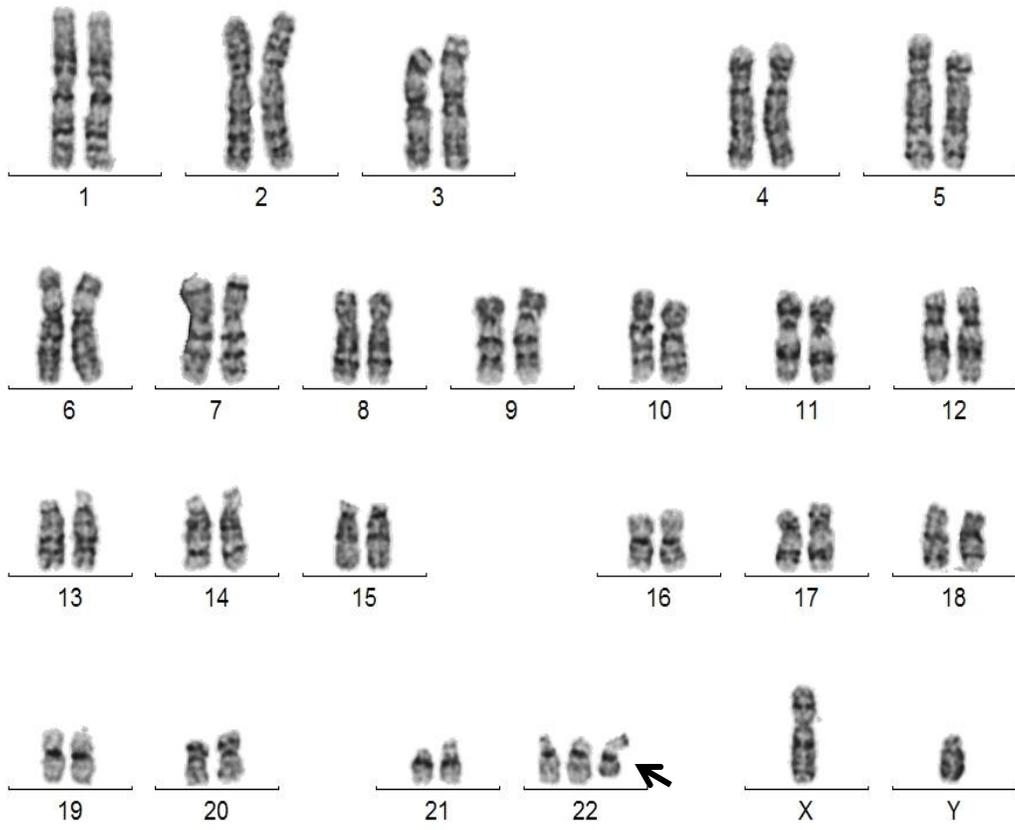


Figura 6.12. Cariotipo con bandas GTG realizado al paciente. El cromosoma derivado se señala con una flecha.

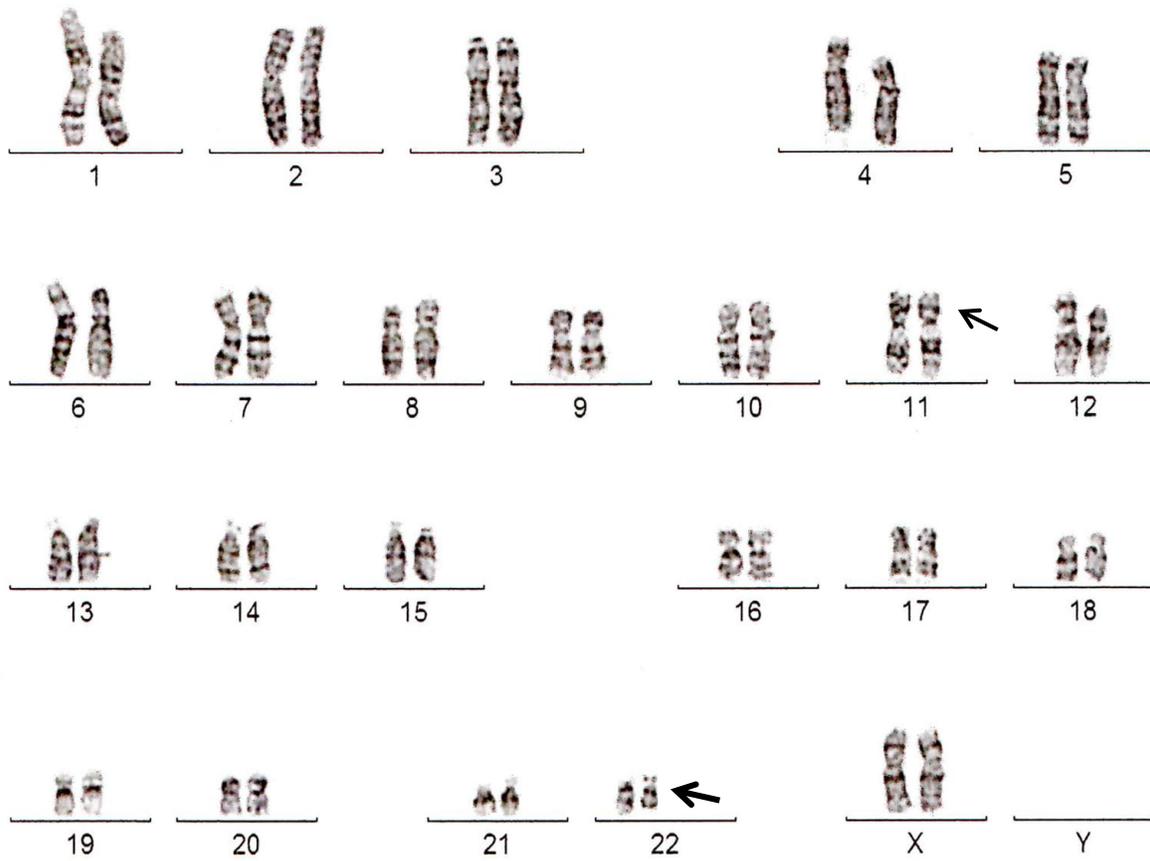


Figura 6.13. Cariotipo de la madre (caso 9) con técnica de bandas GTG. Las flechas señalan los cromosomas 11 y 22 implicados en la translocación.

Estudio por FISH.

Considerando las características clínicas del paciente y de los hallazgos citogenéticos, un diagnóstico diferencial a considerar fue el de Síndrome de Emanuel. Para ello se realizó análisis por FISH utilizando la sonda TUPLE1 (Vysis®) la cual identifica a las regiones 22q11.2 y 22q13 (Dra. Rocío Sánchez Urbina) (Figuras 6.14 y 6.16.) Así mismo, se realizó FISH con la sonda dual LSI MLL (Vysis®) para la región 11q23 (M. en C. Roberto Guevara Yáñez). Estos análisis fueron realizados al paciente y a su madre (Figuras 6.15 y 6.17). En el caso del paciente, el análisis por FISH demostró un complemento cromosómico:

47,XY,+der(22),t(11;22)(q23;q13)mat [25].

El análisis en el caso de la madre del paciente fue:

46,XX,t(11;22)(q23;q13)[25].

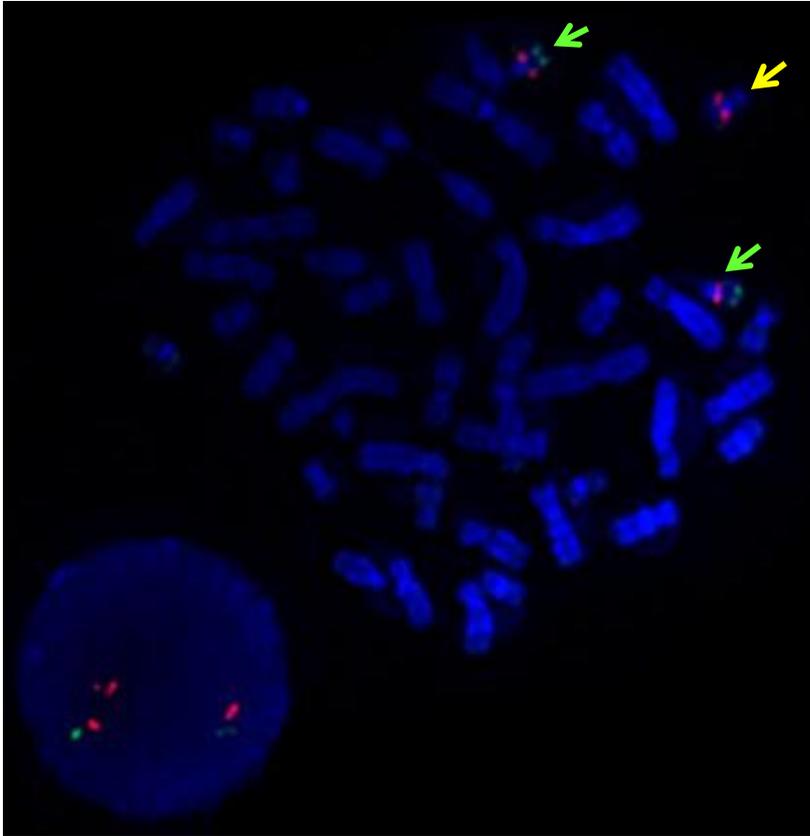


Figura 6.14. Análisis con FISH realizado al paciente utilizando la sonda TUPLE1 (Vysis®).

La señal naranja indica la región 22q11.2 y la señal verde a 22q13.

Se observan tres señales para 22q11.2 en tres cromosomas diferentes. Dos señales están en los cromosomas 22 que presentan además la región 22q13 (flechas en verde).

El cromosoma derivado presenta solamente la señal para 22q11.2 (flecha amarilla).

A la izquierda, se observa un núcleo en interfase con dos señales para 22q13 y tres señales para 22q11.2.

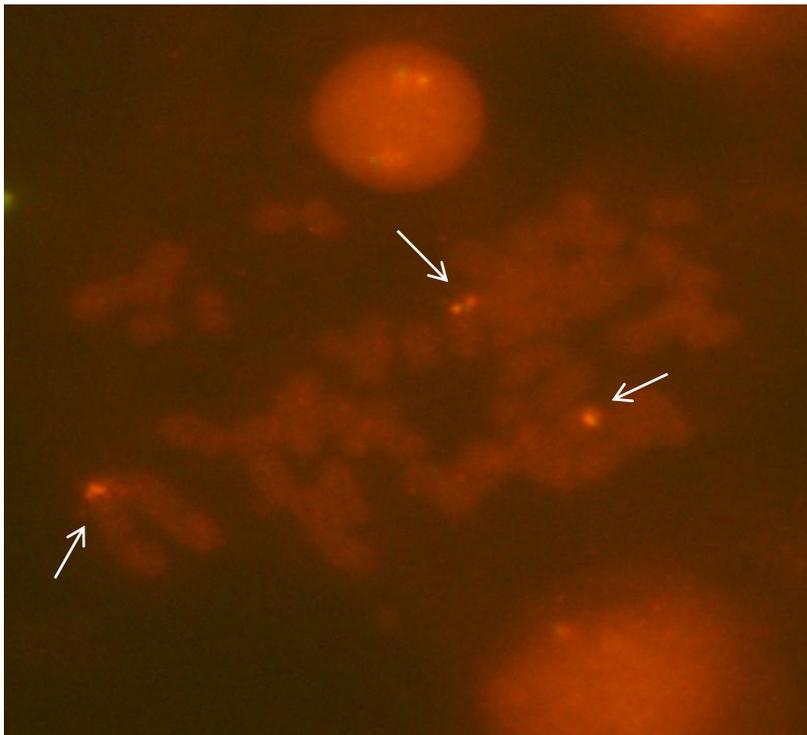


Figura 6.15. Análisis por FISH en el paciente con la sonda LSI MLL (Vysis®). Se observan tres señales de hibridación para la región 11q23 (flechas blancas), lo que indica que la región estudiada, que abarca 500kb de 11q23, se translocó íntegra al derivado del cromosoma 22.

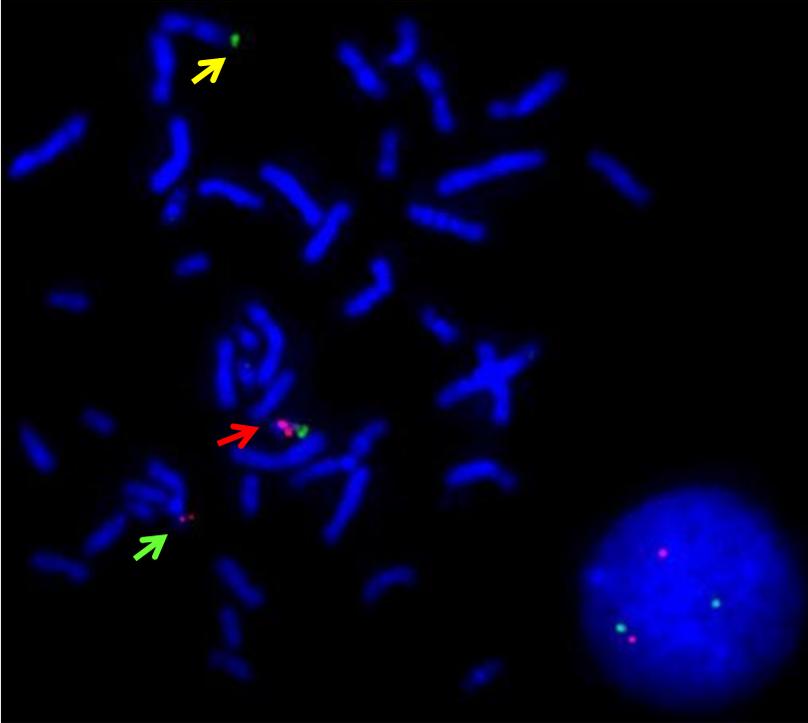


Figura 6.16. Análisis de FISH realizado en la madre del paciente con sonda TUPLE1 (Vysis®).

Se observa el cromosoma 22 normal (flecha roja). Existe una señal naranja y una verde en dos diferentes cromosomas (región 22q11.2 flecha verde en el cromosoma 22 y 22q13 flecha amarilla en el 11).

En el núcleo en interfase en la parte inferior derecha de la imagen se observan dos señales para 22q11.2 y dos señales para 22q13. Dos de ellas juntas y las otras dos muy separadas entre sí.

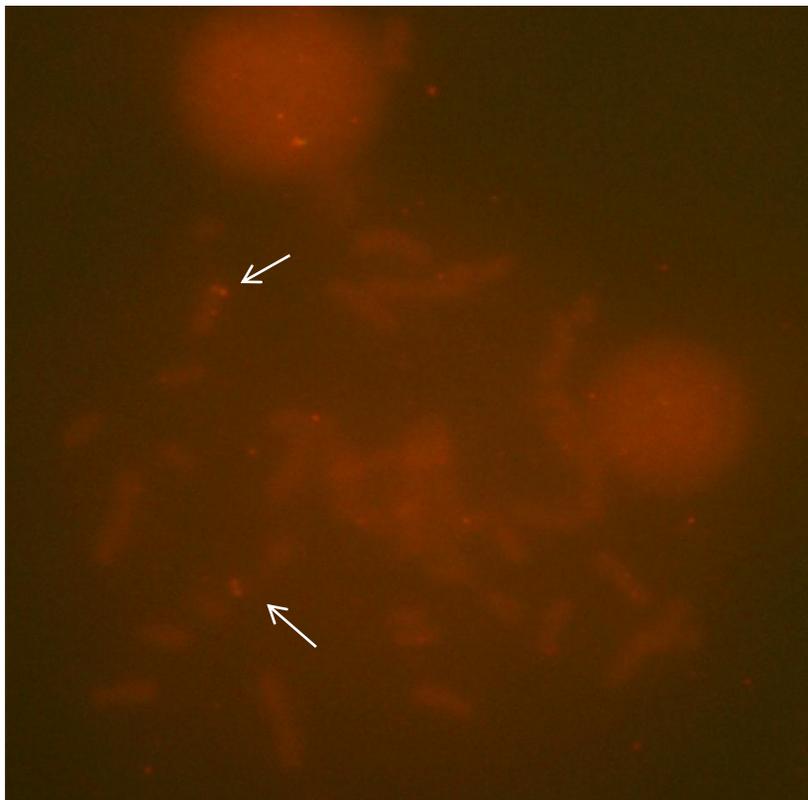


Figura 6.17. Análisis de FISH realizado en la madre del paciente con la sonda LSI MLL (Vysis®). Se observan dos señales de hibridación para la región 11q23 (flechas blancas).

Discusión del caso.

El caso presentado corresponde a un paciente referido por malformaciones múltiples, falla del crecimiento y retraso en el desarrollo. Se le había realizado un estudio cromosómico previo descrito solamente como trisomía 22 por lo que se decidió realizar nuevo estudio de cariotipo al paciente. El análisis por cariotipo con bandas GTG diagnosticó una alteración en el cromosoma 22, mismo que fue definido por el estudio de FISH como trisomía parcial del cromosoma 22 o síndrome de Emanuel, derivado de una translocación t(11;22) en la madre del paciente quien era portadora asintomática.

La discusión del caso la enfocaremos al análisis del cuadro clínico, los hallazgos de citogenética molecular y las implicaciones para el asesoramiento genético.

En primer término, el paciente fue referido como afectado por trisomía 22, aparentemente completa. Existen varias consideraciones a este respecto ya que el fenotipo del paciente no correspondía totalmente a este diagnóstico y por otra parte es sabido que este síndrome tiene una alta mortalidad al nacimiento. Si bien la incidencia de trisomía 22 completa ha sido reportada en 1 en 30 mil a 50 mil recién nacidos vivos⁸², sólo se han descrito en los últimos 20 años aproximadamente 30 pacientes, los cuales no eran mosaicos en sangre^{81,82}. En veintidós casos, la sobrevivencia fue en promedio de cuatro días y solo nueve pacientes vivieron más allá de las dos primeras semanas. La supervivencia de los pacientes se ha descrito desde casos que solo vivieron unos minutos posterior al nacimiento hasta aquéllos que alcanzaron los tres años de edad como máximo^{80,81}.

Esta alteración cromosómica es la segunda más frecuente descrita en abortos espontáneos (después de la trisomía 16)^{80,81,82}, con una frecuencia estimada de diagnóstico en 2.5 al 5% de los casos de aborto. Los estudios realizados en productos de abortos espontáneos señalan que la mayoría de los casos de trisomía completa del cromosoma 22 son resultado de un error en la meiosis I materna⁸¹. El hallazgo de trisomía 22 en estudios de amniocentesis es de 1 en 2,833 fetos, lo que indica que la viabilidad de los productos con trisomía 22 se reduce drásticamente después de la semana 12 de gestación⁸².

En cuanto a su diagnóstico, es posible realizarlo de manera prenatal ya que puede sospecharse *in útero* con los siguientes hallazgos ultrasonográficos: retraso del crecimiento intrauterino, oligohidramnios, microcefalia, cardiopatía congénita, riñones displásicos o ectópicos, pliegue nucal prominente, y arteria umbilical única^{81,82}, y es corroborado por un análisis de amniocentesis. Al nacimiento el fenotipo incluye microcefalia, fontanelas amplias, pabellones auriculares anormales de implantación baja y presencia de fosetas o apéndices preauriculares, proptosis, hipertelorismo, epicanto, coloboma, puente nasal deprimido, filtrum largo, paladar alto o fisurado, genitales hipoplásicos, criptorquidia, alteraciones renales, atresia o estenosis anal, displasia de cadera y displasia ungueal^{80,82}.

Ante la duda diagnóstica planteada por el reporte cromosómico inicial, el estudio citogenético molecular permitió establecer el diagnóstico de trisomía parcial del cromosoma 22 o síndrome de Emanuel (OMIM 609029), que también se conoce como síndrome por derivado supernumerario der(22)t(11;22).

El fenotipo clínico del síndrome de Emanuel se deriva de la duplicación de 22q10-q11 y la duplicación de 11q23-11qter. Esta translocación no balanceada usualmente se origina de una alteración en la segregación en meiosis I, de 3:1, generalmente materna, como ha sido descrito anteriormente en la literatura^{72,73,74,75}. En más del 99% de los casos, uno de los padres del probando es un portador balanceado de una t(11;22) y es fenotípicamente sano⁷⁸. La translocación constitucional balanceada t(11;22) es la translocación no robertsoniana más recurrente en los seres humanos^{71,72,73,74,75}.

El caso estudiado corresponde a un Síndrome de Emanuel y la madre es portadora asintomática.

Se han reportado más de 100 casos de pacientes con Síndrome de Emanuel aunque la prevalencia tanto de afectados como de portadores de la translocación t(11;22) sanos no está descrita^{75,76}. Se caracteriza por presentar múltiples malformaciones congénitas, dismorfias craneofaciales y retraso cognitivo. En el estudio realizado por Carter TM et al.⁷⁶ en relación a las características clínicas fenotípicas referidas en 63 pacientes, se encontró que las más frecuentes eran hoyuelos preauriculares, micrognatia, cardiopatía y paladar hendido. También se describieron alteraciones

de la audición, crisis convulsivas, falla del crecimiento e infecciones recurrentes, particularmente la otitis media.

En otros estudios se ha descrito que los pacientes con síndrome de Emanuel muestran alteraciones fenotípicas como dismorfias faciales consistentes en microbraquicefalia, frente prominente, pliegues epicánticos, fisuras palpebrales oblicuas hacia abajo, puente nasal ancho y aplanado, filtrum largo y pronunciado, microrretrognatia, así como alteraciones variables de pabellones auriculares, a menudo asociados a apéndices o pits preauriculares⁷⁴. El paladar hendido se presenta en 50% de los casos. Los defectos cardiacos se encuentran hasta en el 60% de los pacientes, y contribuyen a la morbimortalidad. Las alteraciones renales se encuentran en aproximadamente 30% de los pacientes y pueden asociarse en varones a criptorquidia, escroto hipoplásico y micropene. Se ha descrito hernia diafragmática, hipoplasia del diafragma, eventración, y alteraciones anales⁷⁸.

Son característicos la aracnodactilia o los dedos espatulados. Es común la poca ganancia ponderal, a menudo asociada a reflujo gastroesofágico o dificultades para la succión o la deglución. Los pacientes frecuentemente presentan hipotonía y escoliosis. El retraso global del desarrollo se presenta prácticamente en todos los casos⁷⁶. El cuidado de estos pacientes requiere un abordaje multidisciplinario, y el pronóstico a largo plazo se encuentra en relación directa con las malformaciones congénitas asociadas. La mayor mortalidad se encuentra en los primeros meses de vida^{76,78}.

En relación al fenotipo del paciente, la descripción de sus características permitió establecer que comparte varias alteraciones descritas en el síndrome de Emanuel como se muestra en la Tabla 6.5.

Tabla 6.5. Datos clínicos presentados por el paciente y su frecuencia en el Síndrome de Emanuel⁷⁶.

DATOS CLÍNICOS PRESENTADOS POR EL PACIENTE Y SU FRECUENCIA EN EL SÍNDROME DE EMANUEL	
DATO CLÍNICO	FRECUENCIA (%)
Fosetas preauriculares	76
Dismorfia de pabellones	30
Micrognatia	60
Hernia diafragmática	8
Neumonía frecuente	48
Hiperlaxitud	48
Falla del crecimiento	62
Reflujo gastroesofágico	54
Retraso del desarrollo psicomotor	100
Microcefalia	23

Cuando se considera las bases citogenéticas y moleculares que sustentan la etiología del síndrome de Emanuel, se debe realizar el análisis por estudios citogenéticos clásicos por bandas GTG y de citogenética molecular. Los puntos de ruptura de la translocación t(11;22) de los portadores se localizan dentro de los repetidos palindrómicos ricos en A-T (PATRRs) en 11q23 y 22q11. Este rearrreglo parece presentarse de forma exclusiva durante las divisiones meióticas en la gametogénesis^{72,73,75}.

En la actualidad se reconocen tres regiones en diferentes cromosomas, asociadas a rearrreglos cromosómicos, las cuales son: PATRR11, PATRR22 y PATRR17. Estas regiones comparten las siguientes características: 1) son palíndromes casi perfectos ricos en A-T, con varios cientos de pares de bases de longitud; 2) Poseen regiones pobres en A-T en ambos extremos; y 3) muestran una región cercana también rica en A-T en uno de los extremos de la PATRR^{49,73}.

La región central rica en A-T de la PATRR puede contribuir al inicio de la separación de las cadenas, mientras que las secuencias palindrómicas casi perfectas se relacionarían con la formación de la estructura cruciforme. El tamaño de estas regiones podría jugar un papel en el grado de estabilidad de esta estructura. Además, las regiones A-T flanqueantes pueden facilitar el desenrollamiento del ADN cromosómico. Las variantes en el tamaño de las regiones AT

flanqueantes en la PATRR22 podrían afectar el grado de susceptibilidad a rearrreglos⁴⁹. El tamaño total de la PATRR22 típica es de 595 pb, 150 pb mayor que la PATRR11 y muestra una similitud entre sus extremos del 98.7%, confiriéndole una estructura palindrómica casi perfecta. La similitud estructural entre la PATRR11 y la PATRR22 es del 58%; sin embargo, las secuencias cercanas al punto de ruptura en los cromosomas derivados de la t(11;22) son muy similares. El mecanismo sugerido para la formación de esta translocación sería la unión de extremos no homólogos o el alineamiento de cadena única, más que la recombinación homóloga^{49,73}.

En la madre se encontró una translocación balanceada 46,XX,t(11;22)(q23;q11.2) y es aparentemente portadora asintomática, si bien presenta el antecedente de un aborto espontáneo previo a la concepción del paciente y debemos recordar que en la literatura se describe que los portadores de la t(11;22) han sido identificados posterior a abortos de repetición, infertilidad y como en el caso que nos ocupa por tener un producto afectado por síndrome de Emanuel⁷⁶.

El punto de ruptura del cromosoma 11 no pudo identificarse con exactitud, sin embargo hay dos consideraciones en relación a esta situación. La primera es el análisis de FISH realizado en el paciente para la región 11q23 se realizó con la sonda para el gen *MLL*. La sonda de color dual LSI *MLL* (Vysis[®]) es utilizada para detectar el rearrreglo en 11q23 asociado con el gen *MLL*, que se encuentra entre las alteraciones citogenéticas más comúnmente reportadas en las neoplasias hematopoyéticas. Consiste en un segmento de 350kb centromérica al agrupamiento de puntos de ruptura para *MLL* o *bcr* (verde) y un segmento distal de 190kb (naranja). En células sin el rearrreglo se observa una señal de fusión de color o amarilla. En las células que presentan alguna translocación, el patrón observado es una señal verde y una naranja.

En nuestro paciente se observaron dos señales de fusión en los cromosomas 11 normales y una tercera en el cromosoma derivado de la translocación materna. Esta información nos indicaría que posiblemente la ruptura se presentó en una región por arriba o centromérica a la región 11q22.3 identificada por la sonda, que abarca sólo 500kb de longitud. Se esperaría entonces que nuestro caso correspondiera al punto de ruptura previamente reportado en los casos de Síndrome de Emanuel, mismo que se encuentra arriba del punto identificado con la sonda.

La segunda consideración es que el fenotipo del paciente es compatible con síndrome de Emanuel, en el cual se considera que tanto las regiones 22q11.2 y 11q23 están implicadas, por lo cual no puede descartarse que la región 11q23 se encuentre alterada en el punto de ruptura clásicamente

reportado en la literatura, pero no sea posible identificar su falta de integridad con el poder de resolución del estudio de FISH, ya que para ello se requerirían estudios de mayor resolución, por ejemplo CGH-microarreglos o uso de BACs (*Bacterial artificial chromosome*).

La translocación materna resultó en el paciente en la presencia de un cromosoma 11 y 22 normales, así como el cromosoma 22 derivado, lo que implicó una fórmula cromosómica 47,XY,+der(22)t(11;22)(q23;q11.2)mat.

Esta situación es fundamental en el asesoramiento genético ya que debe tomarse en cuenta las posibles segregaciones en meiosis para productos derivados de esta translocación: en este sentido existen tres posibilidades a considerar dependiendo de los productos obtenidos de la segregación. Si bien pueden ocurrir productos de la segregación alterna, adyacente 1 y adyacente 2, los productos resultantes de la primera serían portadores de la translocación o sanos. En relación a las adyacentes serían productos de aborto.

Es importante subrayar que la probabilidad para portadores de la translocación femeninos es de 5.7-6.1% y para portadores masculinos de 2.2-5%^{77,78} (Figura 6.18). Algunos autores han sugerido que el riesgo puede ser variable, dependiendo del género del portador de la translocación, estando incrementado para las mujeres portadoras, como se describe en la Tabla 6.6.

Tabla 6.6. Cálculo de los riesgos de recurrencia para portadores de la translocación balanceada t(11;22). Modificado de GeneReviews, 2007⁷⁷.

	PORTADOR FEMENINO	PORTADOR MASCULINO
RNV con trisomía parcial del cromosoma 22 y del 11	5.7-6.1%	2.2-5%
RNV portador de t(11;22) balanceada	55.4%	41.2%
Aborto espontáneo	23-37%	

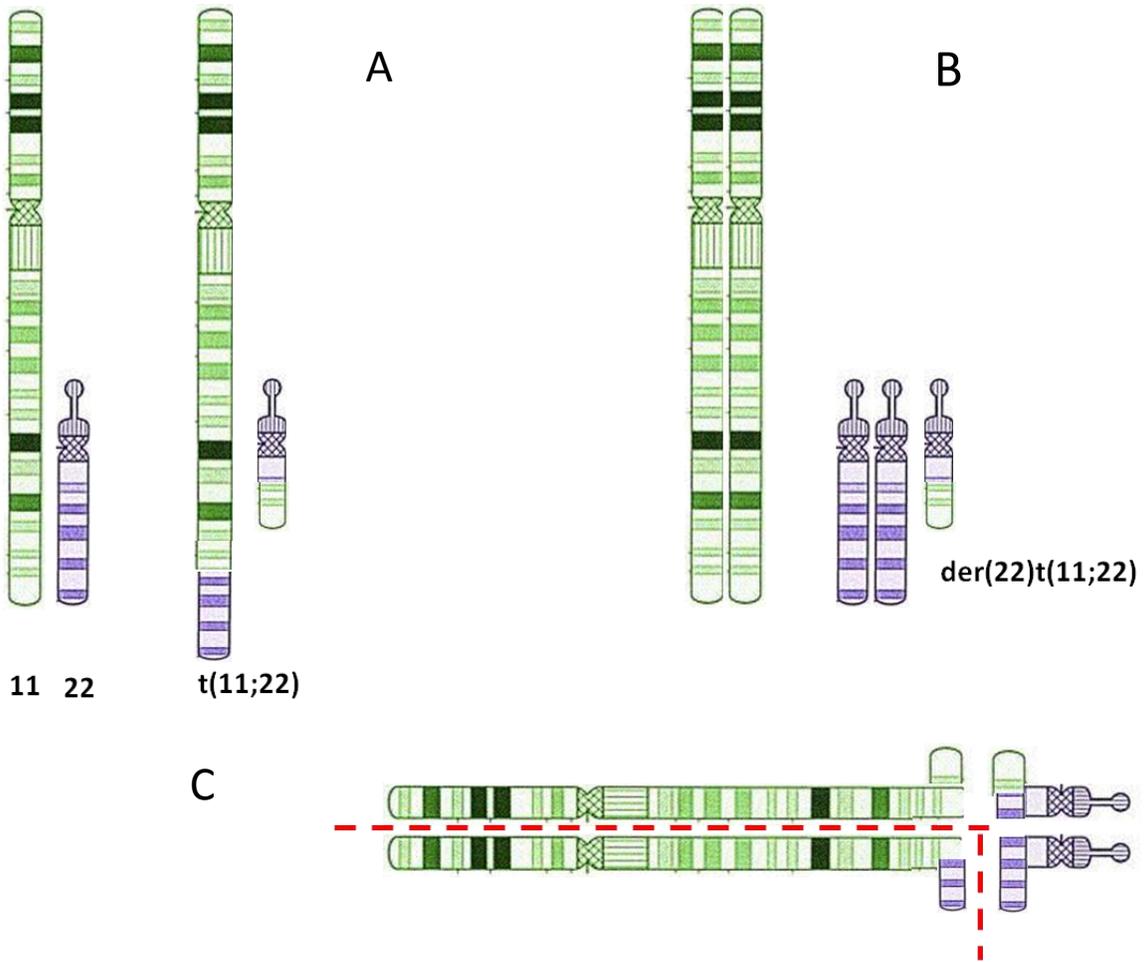


Figura 6.18.
A. Cromosomas observados en la madre,
B. Cromosomas en el paciente,
B. Segregación meiótica 3:1 responsable del rearreglo⁷⁷.
Ideogramas de los cromosomas modificados de Stratchan, 2004⁴.

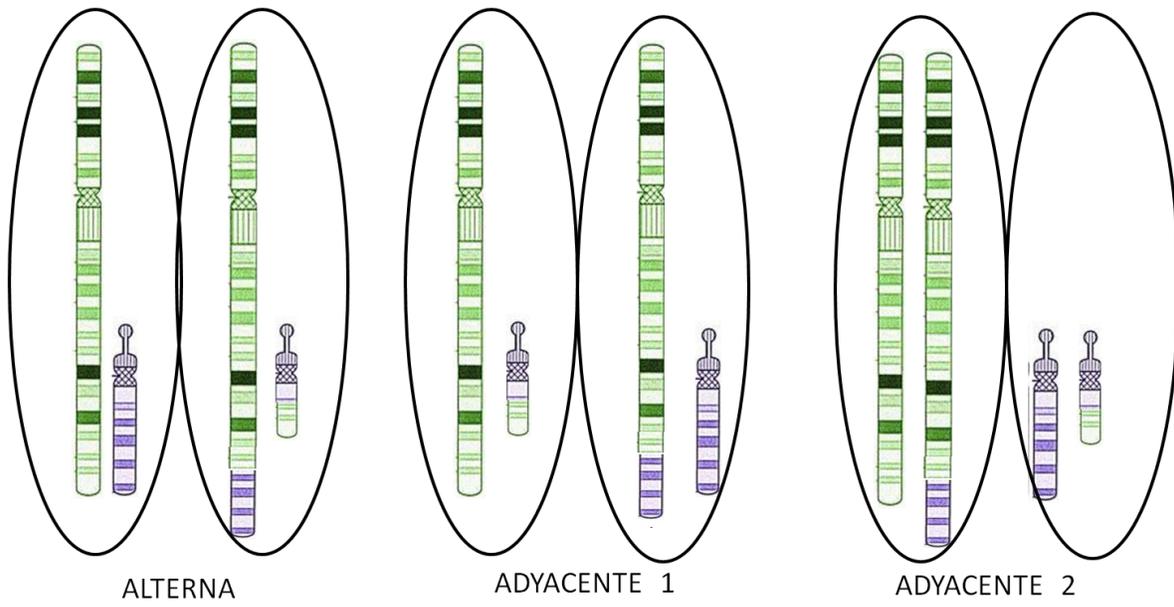


Figura 6.19. Análisis de la segregación meiótica del caso 10 (madre del paciente) con t(11;22). Ideogramas de los cromosomas modificados de Stratchan, 2004⁴.

Un aspecto final a considerar en el asesoramiento es que se ha sugerido que las portadoras de la translocación balanceada parecen mostrar un riesgo incrementado para cáncer de mama premenopáusico^{75,78} si bien esta asociación no está totalmente demostrada, podría recomendarse el seguimiento de este aspecto a la madre⁷⁸.

VII. CONCLUSIONES.

La presente tesis tuvo como objetivo principal identificar las alteraciones del cromosoma 22 reportadas en los estudios citogenéticos con técnica de bandas GTG, realizados a pacientes en el laboratorio de Citogenética del Departamento de Genética del HIMFG, durante los años de 1979 a 2009.

El análisis de las libretas con los reportes de resultados de cariotipo, fue posible establecer que durante este periodo de tiempo que comprende 21 años, hubo diez casos reportados con alteraciones del cromosoma 22. Es importante aclarar que en este análisis fueron excluidos los casos correspondientes a síndrome de delección 22q11.2, diagnosticados por FISH y cuyo resultado con bandas GTG fue normal para esta región así como también se excluyeron polimorfismos. De los diez casos identificados, siete correspondieron a pacientes que presentaban indicación clínica para descartar la sospecha diagnóstica de cromosopatía principalmente por la asociación que hubiese con la presencia de malformaciones congénitas y en dos casos se realizó el estudio por antecedente de aborto habitual y por diagnóstico citogenético previo de un hijo con cromosopatía, respectivamente.

La frecuencia de alteraciones cromosómicas estructurales en la población general es de 1:625²⁶. Hasta donde sabemos no existe en la literatura un reporte de la frecuencia de este tipo de alteraciones específico para el cromosoma 22, si bien sabemos que ciertas alteraciones como la del22q11.2 son síndromes bien conocidos, este en particular con una incidencia de 1:2500 – 1:4000^{56,62}.

En la presente revisión se determinó que de 13,294 cariotipos reportados por el laboratorio de citogenética de nuestra Institución, 3,643 estudios que corresponden al 27.4% del total, presentaban alguna alteración cromosómica, siendo en 3,092 (es decir el 84.8%) correspondían a casos de alteraciones numéricas y en 572 casos (15.7%) se identificó alguna alteración de tipo estructural. Debe señalarse que el número de estudios de cariotipo no es igual al número de pacientes atendidos, ya que por diversas circunstancias se puede tener más de un estudio para un paciente. Asimismo, el número de estudios de cariotipo realizados no es igual al número de

estudios reportados, ya que en ocasiones el estudio no ofrece resultados, debido a múltiples factores (muestra insuficiente, no crecimiento, etc.).

Analizando en su conjunto la información anterior, los diez casos reportados con alteraciones del cromosoma 22 representan entonces el 0.27% de todos los cariotipos realizados identificados con alguna alteración cromosómica y a su vez corresponden al 1.74% de todas las alteraciones de tipo estructural reportadas durante este periodo.

Considerando la frecuencia en población general de alteraciones tanto numéricas como estructurales, que dependiendo de la población que se trate y en particular considerando el rubro del grupo etario, se conoce que en la población son más frecuentes las alteraciones numéricas que las estructurales, y la frecuencia de las estructurales varía dependiendo del tipo de alteración que se trate, por ejemplo las translocaciones robertsonianas tienen una frecuencia de 1:500-1000²⁶. Lo anterior indicaría que los resultados observados en nuestra población concuerdan con lo reportado en la literatura clásica en particular para el tipo de población que acude a nuestra Institución que corresponde principalmente a la edad pediátrica.

El segundo objetivo de la tesis fue el identificar aquellos casos que susceptibles de complementar su estudio en base al avance de las técnicas citogenéticas moleculares y que pudiesen los pacientes y sus familias beneficiarse con estos estudios y fue posible realizar estos análisis en dos pacientes, los cuales fueron discutidos en las secciones correspondientes.

Dada la complejidad de los dos casos estudiados se comprobó que se requiere de la aplicación de técnicas citogenéticas moleculares además de las de bandas GTG para completar el análisis y ofrecer un manejo integral. En ambos casos podrían emplearse otras técnicas como CGH-microarreglos, uso de CNVs (*Copy number variants*) o BACs para determinar con precisión los puntos de ruptura para una mejor correlación clínico-molecular.

Se considera que la revisión de los casos descritos en esta tesis complementa adecuadamente el diagnóstico y el asesoramiento genético de los pacientes y sus familias. Se desprende asimismo la importancia de realizar estudios de citogenética molecular en pacientes con rearrreglos cromosómicos, en especial el estudio de FISH, o en su caso, estudios con mayor poder de

resolución. Esto evidencia que el avance de la ciencia y el desarrollo de nuevas tecnologías nos permiten una ventana para contestar incógnitas sobre casos para los que anteriormente no tendríamos una explicación completa, lo cual aporta conocimiento nuevo y una comprensión de su etiopatogenia citogenética y molecular y abre posibilidades de análisis en beneficio de nuestros pacientes.

Así, de la información analizada en este trabajo podemos considerar:

1. Se determinó la frecuencia de las alteraciones cromosómicas estructurales y numéricas del cromosoma 22 reportadas por técnica de bandas GTG en el laboratorio de citogenética del HIMFG durante el periodo 1979-2009.
2. Se identificaron 10 casos en el periodo mencionado, que representan el 0.27% de los cariotipos con alteración cromosómica, y el 1.74% de las alteraciones de tipo estructural reportadas.
3. Se aplicaron técnicas de citogenética molecular en dos casos, que permitieron complementar el diagnóstico y asesoramiento de los pacientes y sus familias.
4. Queda evidenciada la importancia de realizar estudio integral clínico, citogenético y moleculares en los casos de rearrreglos citogenéticos complejos para integrar esta información en el asesoramiento genético.

VII. BIBLIOGRAFIA.

1. Chromosome 22: Summary and Statistics. Abril, 2011. Disponible en: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/Chromosome?r=22
2. Lewin B. Chapter 1: Genes are DNA. En: Carlson G, Challice J, editors. Genes VIII. Pearson, 2004. p. 1-2.
3. Kass DH, Batzer MA. Genome Organization: Human. En: *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & sons, Ltd. 2004.
4. Stratchan T, Read A. Capítulo 2: Estructura y función de los cromosomas. En: *Genética Humana*. Mc-Graw-Hill Interamericana, 2006. p. 33-56. Nurse P. A Long Twentieth Century of the Cell Cycle and Beyond: Review. *Cell*. 2000; 100 Suppl 7: 71–78.
5. Gartler S M. The chromosome number in humans: a brief history. *Nat Rev Genet* 2006; 7: 655-660.
6. Trask B J. Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting. *Nat Rev Genet*. 2002; 3: 769-778.
7. Satzinger H. Theodor and Marcella Boveri: chromosomes and cytoplasm in heredity and development. *Nat Rev Genet*. 2008; 9: 231-238.
8. Grewal S, Jia S. Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet*. 2007; 8: 35-46.
9. Luger K, Hansen J C. Nucleosome and chromatin fiber dynamics. *Curr Opin Struct Biol*. 2005; 15: 188–196.
10. Rando O J, Chang H Y. Genome-Wide Views of Chromatin Structure. *Ann Rev Biochem*. 2009; 78: 245–271.
11. Robinson P, Rhodes D. Structure of the '30 nm' chromatin fibre: A key role for the linker histone. *Curr Opin Struct Biol*. 2006; 16: 336–343.
12. Woodcock C L. Chromatin architecture. *Curr Opin Struct Biol*. 2006; 16: 213–220.
13. Margueron R, Reinberg D. Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information. *Nat Rev Genet*. 2010; 11: 285-296.
14. Linnemann A K, Krawetz S A. Maintenance of a functional higher order chromatin structure: The role of the nuclear matrix in normal and disease states. *Gen Ther Mol Biol*. 2009; 13: 231-243.
15. Linnemann A K, Platts A E, Krawetz S A. Differential nuclear scaffold/matrix attachment marks expressed genes. *Hum Mol Gen*. 2009; 18, Suppl 4: 645–654.

16. Catalina P, Cobo F, Cortés J L, Nieto A, Cabrera C, Montes R, *et al.* Conventional and molecular cytogenetic diagnostic methods in stem cell research: A concise review. *Cell Biol Int.* 2007; 31: 861-869.
17. Belmont A S. Mitotic chromosome structure and condensation. *Curr Opin Cell Biol.* 2006; 18: 632–638.
18. Chan G K, Liu S, Yen T J. Kinetochore structure and function. *Trends in Cell Biology.* 2005; 15 Suppl 11: 589-598.
19. Masutomi K, *et al.* Telomerase Maintains Telomere Structure in Normal Human Cells. *Cell.* 2003; 114: 241–253.
20. Mattern K A, Swiggers S, Nigg A L, Löwenberg B, Houtsmuller A, Zijlmans M. Dynamics of Protein Binding to Telomeres in Living Cells: Implications for Telomere Structure and Function. *Mol Cell Biol.* 2004; 24 Suppl 12: 5587–5594.
21. Neale M J, Keeney S. Clarifying the mechanics of DNA strand exchange in meiotic recombination. *Nat Rev Genet.* 2006; 442 Suppl 13: 153-158.
22. Handel M A, Schimenti J C. Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. *Nat Rev Genet.* 2010; 11: 124-136.
23. Cromie G A, Smith G R. Branching out: meiotic recombination and its regulation. *Trends in Cell Biol.* 2007; 17 Suppl 9: 448-455.
24. Ivanovska I, Orr-Weaver T L. Histone Modifications and the Chromatin Scaffold for Meiotic Chromosome Architecture. *Cell Cycle.* 2006; 5 Suppl 18: 2064-2071.
25. Burgoyne P S, Mahadevaiah S K, Turner J M A. The consequences of asynapsis for mammalian meiosis. *Nat Rev Genet.* 2009; 10: 207-216.
26. Gerton J L, Hawley R S. Homologous chromosome interactions in meiosis: diversity amidst conservation. *Nat Rev Genet.* 2005; 6: 477-487.
27. Sharkey F H, Maher E, FitzPatrick D R. Chromosome analysis: what and when to request. *Arch Dis Child.* 2005; 90: 1264-1269.
28. Luthardt F W, Keitges E. Chromosomal Syndromes and Genetic Disease. En: *Encyclopedia of Life Sciences.* John Wiley & sons, Ltd. 2001.
29. Gu W, Zhang F, Lupski J R. Review: Mechanisms for human genomic rearrangements. *PathoGenetics.* 2008; 1 Suppl 4: 1-17.
30. Braude P, Pickering S, Flinter F, Ogilvie C M. Preimplantation Genetic Diagnosis. *Nat Rev Genet.* 2002; 3: 941-953.

31. Eichenlaub-Rittera U, Adler I, Carere A, Pacchierotti F. Gender differences in germ-cell mutagenesis and genetic risk. *Env Res.* 2007; 104: 22–36.
32. Yatsenko A N, Yatsenko S A, Weedon J W, Lawrence A E, Patel A, Peacock S, *et al.* Comprehensive 5-Year Study of Cytogenetic Aberrations in 668 Infertile Men. *The Journal of Urology.* 2010; 183: 1636-1642.
33. Ferguson K A, Chow V, Ma S. Silencing of unpaired meiotic chromosomes and altered recombination patterns in an azoospermic carrier of a t(8;13) reciprocal translocation. *Human Reproduction.* 2008; 23 Suppl 4: 988–995.
34. Oliver-Bonet M, Benet J, Sun F, Navarro J, Abad S, Liehr T, *et al.* Meiotic studies in two human reciprocal translocations and their association with spermatogenic failure. *Human Reproduction.* 2005; 20 Suppl 3: 683–688.
35. Spinner N B, Saitta S C, Emanuel B S. Deletions and other structural abnormalities of the autosomes. En: Rimoin D, Connor M D, Pieritz R E, Korf B R, editors. *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics.* Philadelphia: Elsevier; 2007. p. 1058-1082.
36. Hassold T. To err (meiotically) is human: The genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet.* 2001; 2: 280-291.
37. Braude P, Pickering S, Flinter F, Ogilvie C M. Preimplantation Genetic Diagnosis. *Nat Rev Genet.* 2002; 3: 941-953.
38. Speicher M R, Carter N P. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nat Rev Genet.* 2005; 6: 782-792.
39. Liehr T. Multicolor fluorescence in situ hybridization (FISH) applied to FISH-banding. *Cyto Gen Res.* 2006; 114: 240–244.
40. Vorsanova S G, Yurov Y B, Iourov I Y. Human interphase chromosomes: a review of available molecular cytogenetic technologies. *Mol Cyto.* 2010; 3 Suppl 1: 1-15.
41. Salman M, Jhanwar S C, Ostrer H. Mini Review: Will the new cytogenetics replace the old cytogenetics? *Clin Genet.* 2004; 66: 265–275.
42. Miller O J, Therman E. Chromosome bands. En: Miller O J, Therman E, editors. *Human Chromosomes.* New York: Springer; 2001. p. 79-94.
43. Gardner R J, Sutherland G R. Elements of medical cytogenetics. En: Motulsky A G, Bobrow M, Harper P S, Scriver C, Epstein C J, Hall J G, editors. *Chromosome abnormalities and genetic counseling.* Oxford University Press; 2004. p. 4-20.

44. Shaffer L. American College of Medical Genetics Guideline on the cytogenetic evaluation of the individual with developmental delay or mental retardation. *Am J Med Genet.* 2005; 7 Suppl 9: 650-654.
45. Dunham N, Shimizu B A, Roe S. The DNA sequence of human chromosome 22. *Nat.* 1999; 402, Suppl 2: 489-495.
46. Collins J E, Goward M E, Cole C G. Analysis of Chromosome 22: Reevaluating Human Gene Annotation: A Second-Generation. *Gen Res.* 2003; 13: 27-36.
47. Lee C, Scherer S W. The clinical context of copy number variation in the human genome. *Exp Rev Mol Med.* 2010; 12 Suppl 8: 1-29.
48. Kurahashi H, Inagaki H, Hosoba E. Molecular cloning of a translocation breakpoint hotspot in 22q11. *Gen Res.* 2007; 17: 461-469.
49. Lindsay E A. Chromosomal microdeletions: dissecting del22q11 syndrome. *Nat Rev Genet.* 2001; 2: 858-868.
50. Emanuel B S. Molecular Mechanisms and diagnosis of chromosome 22q11.2 rearrangements. *Dev Dis Res Rev.* 2008; 14: 11-18.
51. Bueno M, Pérez-González J M, Bueno O. *Cromosoma Humano 22.* Canarias Pediátrica. 2000; 24, Suppl 1: 17-22.
52. Puliti A, Rizzato C, Conti V, Bedini A, Gimelli G, Barale R, *et al.* Low-copy repeats on chromosome 22q11.2 show replication timing switches, DNA flexibility peaks and stress inducible asynchrony, sharing instability features with fragile sites. *Mutation Research/Fundamental and Molecular: Mech Mut.* 2010; 686: 74-83.
53. Karayiorgou M, Simon T J, Gogos J A. 22q11.2 microdeletions: linking DNA structural variation to brain dysfunction and schizophrenia. *Nat Neurol Rev.* 2010; 11: 402-416.
54. Moreno Izco F, Zuazo Zamalloa E, González Alvaredo S, Bereciartu Irastorza P. Síndrome de deleción 22q11: un fenotipo en expansión. *Neurología.* 2009; 24, Suppl 1: 69-71.
55. Robin N H, Shprintzen R J. Defining the clinical spectrum of deletion 22q11.2. *J Ped.* 2005; 147: 90-96.
56. Rope A F, Cragun D L, Saal H M, Hopkin R J. DiGeorge Anomaly in the Absence of Chromosome 22q11.2 Deletion. *J Ped.* 2009.
57. Shaikh T H, O'Connor R J, Pierpont M E, *et al.* Low copy repeats mediate distal chromosome 22q11.2 deletions: Sequence analysis predicts breakpoint mechanisms. *Gen Res.* 2007; 17: 482-491.

58. Torres-Juan L, Rosell J, Sánchez-de-la-Torre M, Fibla J, Heine-Suñer D. Analysis of meiotic recombination in 22q11.2, a region that frequently undergoes deletions and duplications. *BMC Med Genet.* 2007; 8 Suppl 14: 1-16.
59. McDermid H E, Morrow B E. Genomic Disorders on 22q11. *Am J Hum Genet.* 2002; 70: 1077–1088.
60. Yamagishi H. The 22q11.2 deletion syndrome. *Keio J Med.* 2002; 51 Suppl 2: 77-88.
61. Botto, L D, *et al.* A population-based study of the 22q11.2 deletion: phenotype, incidence, and contribution to major birth defects in the population. *Pediatrics.* 2003; 112: 101-107.
62. Emanuel B S, Shaikh T H. Segmental duplications: an 'expanding' role in genomic instability and disease. *Nat Rev Genet.* 2001; 2: 791-800.
63. Driscoll D A, Budarf M L, Emanuel B S. A genetic etiology for DiGeorge Syndrome: consistent deletions and microdeletions of 22q11. *Am J Hum Genet.* 1992; 50: 924-933.
64. Bassett A S, Chow E, Husted J, Weksberg R, Caluseriu O, Webb G D, *et al.* Clinical Features of 78 Adults With 22q11 Deletion Syndrome. *Am J Med Genet.* 2005; 138 A: 307–313.
65. Teshima *et al.* Letters to the editor: Microdeletion 22q11.2: clinical data and deletion size. *J Med Genet.* 1999; 36: 721-723.
66. Shaffer L G, Slovak M L, Campbell L J. ISCN 2009: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2009): Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. Karger Editorial.
67. Jerome L A, Papaioannou V E. DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, *Tbx1*. *Nat Genet.* 2001; 27: 286-291.
68. Shprintzen R J, Morrow B E, *et al.* A common molecular basis for rearrangement disorders on chromosome 22q11.2. *Hum Mol Genet.* 1999; 8 Suppl 7: 1157-1167.
69. Morrow B E, *et al.* Frequent translocations occur between low copy repeats on chromosome 22q11.2 (LCR22s) and telomeric bands of partner chromosomes. *Hum Mol Genet.* 2003; 12 Suppl 15: 1823–1837.
70. Beverly S. Emanuel, *et al.* Chromosome 22-specific low copy repeats and the 22q11.2 deletion syndrome: genomic organization and deletion endpoint analysis. *Hum Mol Genet* 2000; 9 Suppl 4: 459-501.
71. Kurahashi H, Emanuel B S. Unexpectedly high rate of de novo constitutional t(11;22) translocations in sperm from normal males. *Nat Genet.* 2001; 29: 139, 140.

72. Kurahashi H, *et al.* The constitutional t(11;22): implications for a novel mechanism responsible for gross chromosomal rearrangements. *Clin Genet.* 2010.
73. Shaikh T H, Budarf M L, Celle L, Zackai E H, Emanuel B S. Clustered 11q23 and 22q11 Breakpoints and 3:1 Meiotic Malsegregation in Multiple Unrelated t(11;22) Families. *Am J Hum Genet.* 1999; 65: 1595–1607.
74. Jobanputra V, Chung W K, Hacker A M, Emanuel B S, Warburton D. A unique case of der(11)t(11;22),-22 arising from 3 : 1 segregation of a maternal t(11;22) in a family with co-segregation of the translocation and breast cancer. *Prenat Diagn.* 2005; 25: 683 – 686.
75. Carter M T, St. Pierre S A, Zackai E H, Emanuel B S, Boycott K M. Phenotypic Delineation of Emanuel Syndrome (Supernumerary Derivative 22 syndrome): Clinical features of 63 individuals. *Am J Med Genet.* 2009; A149 Suppl 8: 1712–1721.
76. Medne L, Zackai E H, Emanuel B S. Emanuel Syndrome. *GeneReviews* (series en el Internet). 2007 Apr 20 (citado 2010 Nov): (aproximadamente 3 p.). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1263/>
77. Afroze B, Ngu L H, Roziana A, Aminah M, Noor Shahizan A. Supernumerary derivative (22) syndrome resulting from a maternal balanced translocation. *Sing Med J.* 2008; 49, Suppl 12: 372-374.
78. Warburton D. De Novo Balanced Chromosome Rearrangements and Extra Marker Chromosomes Identified at Prenatal Diagnosis: Clinical Significance and Distribution of Breakpoints. *Am J Hum Genet.* 1991; 49: 995-1013.
79. Bacino C A, Schreck R, Fischel-Ghodsian N, Pepkowitz S, Prezant T R, Graham J R. Clinical and Molecular Studies in Full Trisomy 22: Further Delineation of the Phenotype and Review of the Literature. *Am J Hum Genet.* 1995; 56: 359-365.
80. Schwendemann W D, Contag S A, Koty P P, Miller R C, Devers P, Watson W J. Ultrasound Findings in Trisomy 22. *Am J Perinat.* 2009; 26: 135–138.
81. Tinkle B T, Walker M E, Blough-Pfau R I, Saal H M, Hopkin R J. Unexpected Survival in a Case of Prenatally Diagnosed Non-mosaic Trisomy 22: Clinical Report and Review of the Natural History. *Am J Hum Genet.* 2003; 118 A: 90–95.
82. Zheng X, Oancea C, Henschler R, Moore M A, Ruthardt M. Reciprocal t(9;22) ABL/BCR Fusion Proteins: Leukemogenic Potential and Effects on B Cell Commitment. *PLoS ONE.* 2009; 4 Suppl 10.

83. Annunziato A. DNA packaging: Nucleosomes and chromatin. Nature Education (series en internet). 2008 (citado 2010 Dec); 1: (aproximadamente 4 p.). Disponible en: <http://www.nature.com/scitable/topicpage/dna-packaging-nucleosomes-and-chromatin-310>
84. Cheeseman I M, *et. al.* Vertebrate kinetochore ultrastructure. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008; 9: 33-46.
85. DeLange T. T-loops and the origin of telomeres. Nat Rev Mol Cell Biol. 2004; 5: 323-329.
86. Saltsman, K. Inside the Cell, Chapter 4. National Institute of General Medical Sciences (series en el internet). 2005 (citado 2010 Jan); 05-1051: (aproximadamente 5 p.). Disponible en: <http://publications.nigms.nih.gov/insidethecell/chapter4.html>
87. Sadava, D. *et al.* En: Sunderland M A, editor. Life: The Science of Biology. Sinauer Associates and W. H. Freeman & Company; 2008. p. 196-197.
88. O'Connor C. Human chromosome translocations and cancer. Nature Education (series en el Internet). 2008 (citado 2010 Nov); 1: (aproximadamente 3p.). Disponible en: <http://www.nature.com/scitable/topicpage/human-chromosome-translocations-and-cancer-23487>
89. Morrow B E. Chromosome 22q11.2 rearrangement disorders. En: Lupski J R, Stankiewicz P, editors. Genomic Disorders. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2006. p. 193-206.

X. ANEXOS.

Técnica de Cariotipo bandas GTG

Preparación de Soluciones:

- Solución de Carnoy o fijador

3 porciones de Metanol absoluto por 1 porción de Ácido acético glacial.

- Solución Hipotónica de KCl 0.075M

Cloruro de Potasio 5.6g 1L

Agua destilada 1L

- a. Se obtienen 1.5ml 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 de bovino, antibióticos estreptomina y penicilina, L- glutamina).
- d. Se incuba por 72 horas a 37-37.5°C.
- e. A las 72 hrs se agregan 20µl de colchicina a cada tubo, se agita y se incuban 30min más a 37-37.5°C.
- f. Se centrifuga por 10min a 2, 500 rpm.
- g. Se decanta el sobrenadante y se resuspende agitando en vortex y se agrega solución hipotónica para completar un volumen de 12ml.
- h. Se incuba 30min a 37-37.5°C.
- i. Centrifugar 10min a 2, 500 rpm.
- j. Con pipeta se retira el sobrenadante y en agitación se agrega fijador frío o solución de Carnoy, gota a gota para completar un volumen de 8ml.
- k. Se refrigera por 20 min.
- l. Se centrifuga y se retira el sobrenadante, se lleva a un volumen de 8ml para el primer lavado

- m. Se centrifuga nuevamente, se retira el sobrenadante y se lleva a volumen de 6ml para el segundo lavado.
- n. Se gotea el cultivo en laminillas de vidrio y se revisa el material determinando la calidad y cantidad de metafases presentes.
- o. Las laminillas obtenidas se incuban en estufa a 60°C por espacio de 24hr.
- p. Se realiza técnica de bandeo GTG
- q. Se monta tren de bandeo.
- r. Se utilizan 5 vasos Koplick, en el primero se colocan 98ml de amortiguador de fosfato pH7+2ml de tripsina, en el segundo 100ml de amortiguador de fosfato pH7, en el tercero 96ml de amortiguador de fosfato pH 6.8 + 4ml de tinción de Wright, en el cuarto 96ml de amortiguador de fosfato pH6.8 + 4ml de colorante Giemsa y en el último agua destilada.
- s. Se estandariza la técnica para tiempos en tripsina y colorantes.
- t. Se fijan las laminillas y se observan al microscopio.
- u. Se analizan 25 metafases.

Referencia

Barch MJ, Knutsen T, Spurbeck JL. En: The AGT Cytogenetics Laboratory Manual. Third Edition. Lippincott-Raven. Philadelphia. 1997.

TÉCNICA PARA FISH

(HIBRIDACIÓN *IN SITU* CON FLUORESCENCIA)

- De acuerdo a la metodología propuesta por Vysis (Vysis, 2001) modificada 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, asegurándose 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 se dejan a temperatura ambiente durante 10 a 15 minutos. Posteriormente bajar la sonda y el buffer por ultracentrifugación por 10 segundos. Protegerlas de la luz.

2.-MEZCLA DE HIBRIDACION

- Buffer 3.5µl
- Agua 1µl
- Sonda 0.5µl
- Volumen final 5µl homogenizar y centrifugar en microfuga 20 segundos.

3.- HIBRIDACIÓN

- Las laminillas se secan a temperatura ambiente (TA). Ya secas se pone una por una la sonda en el área previamente seleccionada, y se coloca el cubreobjetos de 18 x 18 mm.

Anticipadamente se limpió con agua destilada y 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 agita moderadamente para que el cubreobjetos se deslice lentamente y no dañe la muestra.
- Pasado el tiempo se lava 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 deja secar a TA en la oscuridad.
- A temperatura ambiente y sobre el área hibridada se ponen 5 μl de solución de DAPI II (contracolorante), en solución antidesvanecente (Vectashield Antifade) asegurando que no se formen burbujas en proporción de uno a uno.
- Se pone el cubreobjetos que se limpió y pulió anticipadamente.

5.- ANÁLISIS CROMOSÓMICO

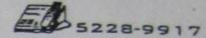
- Se observa bajo el microscopio de epifluorescencia, con filtros para DAPI, se observan 25 metafases, cambiando el filtro de triple banda, con el cual es posible ver 3 colores diferentes, rojo, azul y verde.
- Se seleccionan algunas metafases hibridadas y más representativas del caso, las cuales son 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.
- Se observa nuevamente en el microscopio.
- Se seleccionan las mejores metafases hibridadas y más representativas del caso.

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



**HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO
FEDERICO GOMEZ**

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
DR. MÁRQUEZ NO. 162 COL. DOCTORES,
DELEGACIÓN CUAUHTÉMOC, C.P. 06720 MÉXICO, D.F.
INSTITUCIÓN DE SERVICIO MÉDICO, ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN
AFILIADO A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO



México, D.F. a ____ de ____ de 2006.

A QUIEN CORRESPONDA:

Por medio de la presente deseo manifestar que estoy de acuerdo con la invitación que me ha/han hecho el Doctor/Doctores

del Departamento de Genética de Hospital Infantil de México Federico Gómez para que sean publicadas y/o presentadas en congresos científicos nacionales e internacionales las características clínicas de mi caso y/o el de mi hijo, en forma escrita o en fotografías.

Se me ha explicado que ello obedece al interés científico de compartir conocimiento con la comunidad médica y científica internacional que pudiese en un futuro redundar en un mejor conocimiento y entendimiento de la enfermedad de que se trate además del que actualmente se tiene. Se me ha explicado que de realizarse dicha publicación o presentación en congreso, esta será un medio científico, reconocido nacional e internacionalmente, que se tomarán todas las medidas necesarias para preservar la confidencialidad del caso y todo aquello que pudiese permitir la identificación de la persona de quien se trate, incluyendo la modificación de las fotografías clínicas para preservar el anonimato.

Por lo anterior establezco aquí que he tomado esta decisión libremente y que se me ha explicado que no es obligatorio el participar y que no percibiré por ello ningún beneficio en especie o económico de ninguna naturaleza y de la misma manera que de negarme a participar ello no influiría en el trato y prestaciones que recibo por parte del Hospital Infantil de México Federico Gómez, obedeciendo a los derechos que como paciente tengo y al respeto a mi toma de decisiones y de mi dignidad.

Por lo anterior firmo este documento de conformidad y recibo una copia del documento.

Nombre y firma

Paciente/tutor

Parentesco con el paciente

Testigo 1

Testigo 2