



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
ABERRACIONES CROMOSÓMICAS EN
INDIVIDUOS CON RETRASO MENTAL QUE
ACUDEN AL SERVICIO DE GENÉTICA DEL
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :
LUZ MARÍA GARDUÑO ZARAZÚA



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	Profesora: ALICIA BEATRIZ CERVANTES PEREDO
VOCAL:	Profesora: MARISOL LÓPEZ LÓPEZ
SECRETARIA:	Profesora: MARÍA BENITA LEONOR FERNÁNDEZ SALGADO
1er. SUPLENTE:	Profesor: FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA
2° SUPLENTE:	Profesor: LEÓN PATRICIO MARTÍNEZ CASTILLA

**EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLÓ EN EL LABORATORIO DE
CITOGENÉTICA DEL SERVICIO DE GENÉTICA DEL HOSPITAL GENERAL DE
MÉXICO O.D.**

ASESORA DEL TEMA:

M. en C. Alicia Beatriz Cervantes Peredo _____

SUPERVISOR TÉCNICO:

Biól. Karem Nieto MARTÍNEZ _____

SUSTENTANTE:

Luz María Garduño Zarazúa _____

DEDICATORIAS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitir que me desarrollara profesional y personalmente dentro de sus maravillosas aulas.

A todo el personal del laboratorio de Citogenética del Servicio de Genética del Hospital General de México con los que colaboré durante la realización de este trabajo, especialmente a M. en C. Alicia Cervantes, Dra. Susana Kofman, Biól. Karem Nieto, mi asesor técnico, a M. en C. Laura Gómez y QFB. Adriana del Castillo que me transmitieron sus conocimientos y contribuyeron a mi formación como citogenetista.

*A los Dres. Susana Kofman, Carlos Venegas y Fernando Fernández, por permitir complementar este trabajo con parte de sus resultados del proyecto No **DIC/11/310/04/42** de la DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO y PROYECTO CONACYT “ESTUDIO MULTICÉNTRICO Y MULTIDISCIPLINARIO PARA EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO - MOLECULAR Y MANEJO DE NIÑOS MEXICANOS CON RETRASO MENTAL” con CLAVE No. 2005-C01-13947*

Un agradecimiento especial a la M. en C. Alicia Cervantes Peredo por brindarme la oportunidad de realizar este y otros proyectos, por la confianza, la paciencia, por creer en mí, por toda su ayuda y por su amistad.

A las Dras. Verónica Morán, Rosenda Peñaloza y Marisol López por su apoyo y por su amistad.

A mis amigos, Martha, Oscar, Luis, Aurora, Eréndira, Raúl, Sebastián, Mario, Karol, Ricardo y Liz por escucharme, por ayudarme y por estar siempre ahí.

A toda mi familia, especialmente a mi mamá y a mi hermana por su apoyo incondicional porque son mi motivo para seguir superándome todos los días. Al bodoque mi eterno compañero de desvelos por quedarse ahí a mi lado haciendo más ligeras las jornadas.

A Rafael que es parte importante en mi vida, por todo su apoyo, por estar ahí de manera incondicional, por enseñarme que todo se puede, por cada café, cada cita, cada abrazo, por todos los días que estamos y estaremos juntos.



CONTENIDO

INDICE DE TABLAS	7
INDICE DE FIGURAS	8
1. RESUMEN	9
2. MARCO TEÓRICO.....	11
2.1 RETRASO MENTAL	11
2.1.1 DEFINICIÓN	11
2.1.2 ETIOLOGÍA	13
2.1.3 RETRASO MENTAL EN MÉXICO.....	15
2.1.4 ABORDAJE DEL PACIENTE CON RETRASO MENTAL	16
2.2 CITOGENÉTICA.....	18
2.2.1 ESTRUCTURA DE LOS CROMOSOMAS	18
2.2.2 CROMATINA: HETEROCROMATINA Y EUCROMATINA.....	18
2.2.3 EMPAQUETAMIENTO DE LA CROMATINA	19
2.3 ALTERACIONES CROMOSÓMICAS	22
2.3.1 ALTERACIONES NUMÉRICAS	23
2.3.2 ALTERACIONES ESTRUCTURALES	32
2.4 ALTERACIONES CROMOSÓMICAS RELACIONADAS CON RETRASO MENTAL.....	44
2.4.1 ALTERACIONES NUMÉRICAS	44
2.4.2 ALTERACIONES ESTRUCTURALES	49
2.5 TÉCNICAS DE CITOGENÉTICA CONVENCIONAL.....	55
2.5.1 Bandas Q.....	56
2.5.2 Bandas G.....	56
2.5.3 Bandas R	57
2.5.4 Bandas C	57
2.5.5 Bando de alta resolución	58
2.5.6 Otras técnicas especiales	58
2.6 TÉCNICAS DE CITOGENÉTICA MOLECULAR.....	59
2.6.1 Hibridación in situ con fluorescencia (FISH).....	59
2.6.2 M-FISH (Multi-FISH) y SKY (Cariotipo espectral).....	62
2.6.3 Hibridación Genómica Comparativa (CGH)	62
2.6.4 MICROARREGLOS	65
3. OBJETIVOS	68
3.1 General	68
3.2 Particulares.....	68
4. JUSTIFICACIÓN	68
5. METODOLOGÍA.....	69
5.1 SELECCIÓN DE MUESTRAS.....	69
5.2 SIEMBRA DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA	69
5.3 COSECHA.....	69
5.4 ELABORACIÓN DE LAMINILLAS.....	70
5.5 BANDAS GTG y ANÁLISIS CITOGENÉTICO	70
5.6 Bandas NOR	71



5.7 FISH (HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i> CON FLUORESCENCIA)	71
5.8 REVISIÓN EN EXPEDIENTES	72
6. RESULTADOS	73
6.1 MOTIVO DE TOMA DE MUESTRA PARA CARIOTIPO	73
6.2 ANÁLISIS CROMOSÓMICO	73
6.3 EDADES	75
6.4 CORRELACIÓN FENOTIPO CARIOTIPO	76
6.4.1 <i>Pacientes con síndrome de Down</i>	76
6.4.2 <i>Pacientes con diagnóstico de RM/RPM</i>	77
6.4.3 <i>Pacientes con síndromes relacionados a RM</i>	80
7. DISCUSIÓN	91
7.1 MOTIVO DE TOMA DE MUESTRA PARA CARIOTIPO	91
7.2 ANÁLISIS CROMOSÓMICO	92
7.4 CORRELACIÓN FENOTIPO CARIOTIPO	93
7.4.1 <i>Pacientes con síndrome de Down</i>	93
7.4.2 <i>Pacientes con diagnóstico de RM/RPM</i>	95
7.4.3 <i>Pacientes con Síndromes Relacionados a RM</i>	100
8. CONCLUSIONES	108
9. BIBLIOGRAFÍA	110
ANEXO I	119
ANEXO II	121



INDICE DE TABLAS

TABLA 1.	CLASIFICACIÓN DE LAS ETIOLOGÍAS DEL RETRASO MENTAL	13
TABLA 2.	PROTOCOLO DE EVALUACIÓN CLÍNICA DEL PACIENTE CON RM/RD	17
TABLA 3.	INCIDENCIA DE ANORMALIDADES CROMOSÓMICAS EN RECIÉN NACIDOS	23
TABLA 4.	ORIGEN DE LAS TRISOMÍAS HUMANAS	26
TABLA 5.	FRECUENCIA DE TRISOMÍAS Y MONOSOMÍAS EN ABORTOS ESPONTÁNEOS, MORTINATOS Y NACIDOS VIVOS (%)	29
TABLA 6.	RIESGO DE TRISOMÍAS POR EDAD MATERNA EN AMNIOCENTESIS	29
TABLA 7.	FRECUENCIA DE ANORMALIDADES ESTRUCTURALES	33
TABLA 8.	RIESGO EMPÍRICO DE NACIMIENTOS DESBALANCEADOS EN PORTADORES DE REARREGLOS BALANCEADOS	43
TABLA 9.	DELECCIONES QUE CURSAN CON RETRASO MENTAL	50
TABLA 10.	DUPLICACIONES QUE CURSAN CON RETRASO MENTAL	53
TABLA 11.	SÍNDROMES ASOCIADOS A DUP (DISOMÍA UNIPARENTAL) E IMPRONTA	54
TABLA 12.	TÉCNICAS CONVENCIONALES, DE CITOGÉNÉTICA MOLECULAR Y MICROARREGLOS	67
TABLA 13.	HALLAZGOS CITOGÉNÉTICOS DE ACUERDO A LA INDICACIÓN DIAGNÓSTICA	73
TABLA 14.	PROMEDIO DE EDADES DE LOS DE LOS PACIENTES CON RM/RPM Y DE SUS PADRES AL NACIMIENTO	75
TABLA 15.	HISTORIA FAMILIAR Y DATOS PRENATALES DE LOS PACIENTES	78
TABLA 16.	DATOS CLÍNICOS DEL PACIENTE CON WHS Y SU HERMANA	81
TABLA 17.	ALTERACIONES CROMOSÓMICAS RELACIONADOS A WHS DETECTADAS A PARTIR DE CASOS FAMILIARES Y DEL USO DE MICROARREGLOS	105



INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Porcentaje de causas de RM	14
Figura 2.	Modelos propuestos del plegamiento de la fibra de 10 nm	20
Figura 3.	Niveles de empaquetamiento del DNA	21
Figura 4.	Cariotipo tetraploide 92,XXYY de un paciente con mixoploidía del Hospital General de México	25
Figura 5.	Cariotipo de una célula trisómica (47,XX,+18)	26
Figura 6.	Origen de las aneuploidías debido a errores en la meiosis	27
Figura 7.	Origen de las trisomías debido a no disyunción en meiosis I y II	28
Figura 8.	Origen de una trisomía en mosaico por rescate trisómico y mosaicismo confinado a placenta	31
Figura 9.	Tipos de anomalías cromosómicas estructurales	34
Figura 10.	Cariotipo 46,XX,r(15)(p12;q26.3)	36
Figura 11.	Replicación y segregación de un cromosoma en anillo	37
Figura 12.	Apareamiento y entrecruzamiento de inversiones	39
Figura 13.	Segregación en una traslocación recíproca	40
Figura 14.	Segregación en un portador de una traslocación robertsoniana	43
Figura 15.	Apariencia física de un individuo con síndrome de Down	45
Figura 16.	Fenotipo de un niño con trisomía 18	48
Figura 17.	Fenotipo característico de la trisomía 13	49
Figura 18.	Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia (FISH)	59
Figura 19.	Metodología general de la técnica de SKY	63
Figura 20.	Esquematización de la técnica de CGH	64
Figura 21.	Total de pacientes con RM que fueron procesados	73
Figura 22.	Proporción de cariotipos anormales con respecto a la indicación diagnóstica	74
Figura 23.	Promedio de edad de los padres y pacientes RM/RPM	75
Figura 24.	Hallazgos clínicos de los pacientes con trisomía 21 regular	77
Figura 25.	Hallazgos clínicos en los pacientes con RM/RPM y cariotipo normal	78
Figura 26.	Historia familiar de la paciente con add17p13.3	80
Figura 27.	Pacientes con diagnóstico de WHS	81
Figura 28.	Cariotipo en bandas GTG del <i>propósitus</i>	81
Figura 29.	Metafase del padre del paciente con WHS	83
Figura 30.	Bandas NOR en una metafase del padre	83
Figura 31.	Metafase de alta resolución en bandas GTG del padre del <i>propósitus</i> y metafase en FISH	85
Figura 32.	Metafase de alta resolución en bandas GTG del <i>propósitus</i> y metafase en FISH	85
Figura 33.	Metafase de alta resolución en bandas GTG de la hermana del <i>propósitus</i> y metafase en FISH	86
Figura 34.	Resultados de los microarreglos del <i>propósitus</i> , se muestran los resultados del microarreglo de todos los cromosomas del paciente	87
Figura 35.	Resultados de los microarreglos del <i>propósitus</i> , se observa el microarreglo del cromosoma 4	88
Figura 36.	Resultados de los microarreglos de la hermana del paciente, se muestran los resultados del microarreglo de todos los cromosomas	89
Figura 37.	Resultados de los microarreglos de la hermana del paciente se observa el microarreglo del cromosoma 4	90
Figura 38.	Diagrama de las segregaciones de los portadores de la inserción	104



1. RESUMEN

La Asociación Americana de Discapacidades Intelectuales y del Desarrollo (AAIDD) establece que un individuo tiene discapacidad intelectual o Retraso Mental (RM) cuando su funcionamiento intelectual es inferior al promedio y presentan problemas motrices, de aprendizaje, de lenguaje y de adaptación y que se presenta antes de los 18 años. La Organización mundial de la Salud (OMS) además lo clasifica en leve, moderado y severo basándose en el análisis del coeficiente intelectual. A los individuos menores de 5 años que presentan limitantes adaptativas y motoras se les diagnóstica como retraso global del desarrollo o retraso psicomotor (RPM).

Entre el 1 y 3% de la población tiene RM, el RM leve es mucho más frecuente que el RM moderado o severo. En México, el 0.23% de la población tiene discapacidad mental reconocida desde el nacimiento (XIII Censo General de Población y Vivienda).

El abordaje de los pacientes con RM/RPM es multidisciplinario, se debe realizar una buena historia clínica con un árbol genealógico de por lo menos tres generaciones para determinar si es de origen genético o ambiental, debe llevarse a cabo una exploración física detallada, incluyendo exámenes neurológicos y evaluación del coeficiente intelectual.

La etiología del RM es muy compleja, se estima que las causas genéticas pueden contribuir hasta con un 50%, constituyendo las alteraciones cromosómicas alrededor de 24%. Éstas pueden ser numéricas o estructurales e involucran la pérdida y/o ganancia de varios genes, estos cambios pueden afectar la función e interacción con otros genes. Cualquier variación en el cariotipo normal puede implicar un efecto fenotípico, cuyo grado dependerá del cromosoma implicado, la cantidad de material ganado o perdido y de los genes que contenga.

Se estima que 1/165 recién nacidos vivos tiene alguna aberración cromosómica de autosomas o de cromosomas sexuales. La aberración cromosómica que con mayor frecuencia se asocia con RM es la trisomía 21 (Síndrome de Down), sin embargo, existen muchas otras alteraciones tanto numéricas como estructurales relacionadas al RM y al retraso psicomotor (RPM). Debido a que la mayoría de las alteraciones cromosómicas tienen como consecuencia RM, éste constituye una de las principales causas de consulta en los Servicios de Genética.

EL objetivo de este trabajo fue detectar y caracterizar aberraciones cromosómicas en individuos con RM/RPM. En este tipo de pacientes es importante determinar o descartar una alteración cromosómica como causa del padecimiento.



Se procesaron 59 muestras de pacientes con RM/RPM que acudieron a consulta al Servicio de Genética del Hospital General de México, 24 tenían indicación diagnóstica de Síndrome de Down (SD), 24 indicación de RM/RPM y 11 tenían diagnóstico de un síndrome específico relacionado a RM/RPM a los que se realizó cariotipo para confirmar y/o complementar el diagnóstico.

De los 24 pacientes con diagnóstico de SD en 20 se pudo confirmar la trisomía, y en el resto el cariotipo resultó normal, debido al número de células contadas en estos últimos, no es posible descartar la presencia de mosaicismo en baja proporción, por lo que deben realizarse pruebas adicionales, como FISH o el cultivo de otros tejidos. De los pacientes con RM/RPM, solo tres tuvieron cariotipo anormal, y a dos se les realizaron pruebas de citogenética molecular para caracterizar el rearrreglo. En estudios reportados en la literatura, la incidencia de anomalías cromosómicas detectadas por citogenética convencional en pacientes con RM es de alrededor de 10%, en nuestro caso fue de 12.5%. La mayoría de los pacientes con sospecha de un síndrome en particular tuvieron cariotipo normal, excepto tres, uno con sospecha de síndrome de Edwards en donde se confirmó la trisomía 18, y un caso familiar con dos pacientes con síndrome de Wolf Hirshhorn, productos de un rearrreglo cromosómico en el padre, en estos dos últimos se realizó caracterización por métodos moleculares y genómicos.

En suma, fue posible identificar 27 alteraciones cromosómicas (a cuatro se le realizaron pruebas de citogenética molecular), en 3 casos se logró descartar la alteración cromosómica como causa del RM, y en el resto de los casos, a excepción de los pacientes con diagnóstico de SD y que tuvieron cariotipo normal, el resultado fue de ayuda para el genetista clínico al descartar ganancias y pérdidas grandes de material genético, así como traslocaciones, inversiones y otros rearrreglos cromosómicos balanceados. Sin embargo, en los pacientes que no tienen un síndrome definido es necesario realizar otros estudios. Entre éstos, las técnicas moleculares como el FISH y el a-CGH nos permiten detectar ganancias y pérdidas submicroscópicas que no pueden observarse por citogenética convencional. No obstante, con ellas no es posible detectar rearrreglos balanceados ni desbalances que involucren los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos. Además, todas las alteraciones que se identifiquen por microarreglos deben confirmarse por otras técnicas moleculares como el FISH, por lo que la citogenética convencional aunada a una buena resolución y con un análisis adecuado de incluso dos o más observadores sigue siendo la primera indicación para el estudio de pacientes con RM.



2. MARCO TEÓRICO

2.1 RETRASO MENTAL

2.1.1 DEFINICIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define al RM como un coeficiente de inteligencia (IQ) menor de 70 puntos, caracterizado por un funcionamiento cognitivo significativamente limitado, acoplado con limitaciones en habilidades adaptativas, en dos o más de las siguientes áreas: habilidades sociales, vida cotidiana, salud, autodirección, trabajo y tiempo libre. El RM es generalmente dividido en: leve (IQ 50-70), moderado (IQ 35-50) y severo (IQ 20-35); en los casos donde el IQ es menor de 20 se define como RM profundo [Shaffer; 2005a /González, *et al*; 2008].

En el año 2002 la Asociación Americana de Retraso Mental (AAMR) cambia de nombre por Asociación Americana de Discapacidades Intelectuales y del Desarrollo (AAIDD), y propone cambiar el término de “Retraso Mental” por “Discapacidad Intelectual”; con este concepto plantean una perspectiva ambiental que se centra en la interacción de la persona con el medio ambiente y reconoce que la aplicación sistemática de apoyos individualizados puede mejorar el funcionamiento humano [Schalock, *et al*; 2007].

La definición de Discapacidad Intelectual propuesta por la AAIDD en 2002 además de incluir las características mencionadas anteriormente por la OMS menciona que ésta se presenta antes de los 18 años y lo resume en tres criterios principales: limitaciones significativas en funcionamiento intelectual, en conducta adaptativa (concurrente y relacionada) y que se manifiesta durante el periodo del desarrollo [Schalock, *et al*; 2007].

El término de RM ha generado discusión debido a que muchos individuos afirman que dicho termino no comunica dignidad y respeto; de hecho, frecuentemente resulta en la devaluación de tales personas, por otro lado, el término de Discapacidad Intelectual refleja el cambio de la construcción de discapacidad propuesto por la AAIDD y la OMS, rectifica mejor las prácticas profesionales actuales que se enfocan en comportamientos funcionales y factores contextuales, es menos ofensivo para las personas con la discapacidad y es consistente con la terminología internacional [Schalock, *et al*; 2007].

Para fines prácticos aquí nos referiremos a esta entidad clínica como RM, para ser consistentes, debido a que los pacientes son enviados con diagnóstico de RM al Servicio de Genética del Hospital General de México. Asimismo, la mayoría de las referencias consultadas también consideran el empleo de este término, por lo que junto con



Discapacidad Mental y Discapacidad Intelectual son considerados términos válidos, aunque el término actual sea Discapacidad Intelectual.

El rango de prevalencia de RM en la población general se estima en aproximadamente 1% a 3%, con ocurrencia de RM leve de 7 a 10 veces más frecuente que el RM severo o moderado [Shaffer; 2005a]. En países desarrollados el RM representa la causa más frecuente de discapacidad grave en niños y una de las razones principales de referencia a la consulta de Genética Clínica [Basel-Vanagaite; 2008].

Por otra parte, para aquellos individuos en los que no se puede definir con precisión un nivel de RM debido a su edad, como en los menores de 5 años, en los que no se puede realizar una evaluación acertada de coeficiente intelectual, se les clasifica como un retraso global del desarrollo (RD) [Moeschler, *et al*; 2006]. El RD describe un retraso significativo en dos o más de las siguientes áreas: cognitiva, discurso/lenguaje, habilidades motoras finas/gruesas, habilidades sociales/personales y vida diaria [Shaffer; 2005a], por lo que implica un déficit adaptativo y de aprendizaje que puede ser significativo y predecir una discapacidad posterior cognitiva o intelectual. La prevalencia de RD en la población general también se estima de 1 a 3% [González, *et al*; 2008].

La identificación del tipo de RD es un paso preliminar importante, dado que influye sobre la vía de investigación posterior. Su clasificación respecto a la afectación es clínicamente subjetiva. A edades tempranas, los retrasos del desarrollo catalogados como leves o moderados pueden ser transitorios y carecer de capacidad de predicción respecto al desarrollo posterior de un retraso mental u otras discapacidades cognitivas, en especial el retraso del desarrollo de un solo dominio (retrasos motores o retrasos del lenguaje). Cuando estos signos se presentan aislados de una forma grave, y en particular si se presentan asociados con otras discapacidades, dismorfias y/o malformaciones congénitas, puede ser importante llevar a cabo una reevaluación clínica para decidir el mejor abordaje para el diagnóstico [González, *et al*; 2008 / Moeschler, *et al*; 2006].

Los pacientes que llegan al Servicio de Genética del HGM con RD presentan discapacidad principalmente en las áreas motoras, cognitivas y del lenguaje por lo que los consideramos como pacientes con Retraso Psicomotor (RPM).



2.1.2 ETIOLOGÍA

En la práctica médica el hallazgo de la etiología de un diagnóstico específico puede traducirse en información clínica útil para el individuo y su familia, la cual puede proporcionar información acerca de su evolución, pronóstico y riesgo de recurrencia, así como la elección de una terapia o manejo apropiados [Moeschler, *et al*; 2006]. Por otra parte, con el reconocimiento de las causas se pueden organizar las pruebas de laboratorio que permitan una evaluación diagnóstica menos invasiva y evitar gastos innecesarios [Battaglia, *et al*; 2003].

La etiología del RM/RD es compleja, e incluye factores ambientales y genéticos, y al establecer una etiología definitiva estos factores pueden presentarse solos o en combinación. Las principales causas asociadas al RM se resumen en la tabla 1 [González, *et al*; 2008].

TABLA 1. CLASIFICACIÓN DE LAS ETIOLOGÍAS DEL RETRASO MENTAL
<p>Causas adquiridas y ambientales Causas pre-, peri- y postnatales Intoxicación materna (ejemplo: alcohol, drogas) Prematurez Infección fetal (ejemplo: CMV, toxoplasmosis) Trauma peri y postnatal, accidentes vasculares, asfixia Infecciones postnatales.</p>
<p>Causas Genéticas</p>
<p><i>Anormalidades cromosómicas</i> <i>(Detectables por técnicas de citogenética convencional 450-550 bandas)</i> Trisomía 21 Aneusomías del cromosoma X Trisomías parciales (ejemplo: 4p, 5p,9p) Monosomías parciales (ejemplo: 5p/cri du chat) Traslocaciones o rearrreglos cromosómicos desbalanceados</p>
<p><i>Anormalidades cromosómicas crípticas</i> <i>(No detectadas por métodos de citogenética convencional)</i> Rearreglos subteloméricos crípticos (ejemplo: deleciones, duplicaciones, traslocaciones) Rearreglos intersticiales crípticos (ejemplo: deleciones, duplicaciones, inserciones) Desórdenes genómicos (síndrome de Williams)</p>
<p><i>Desregulación de la expresión genes improntados</i> <i>(ejemplo: disomía uniparental, deleción, defectos de impronta)</i> Síndrome de Angelman Síndrome de Prader Willi</p>
<p><i>Desórdenes monogénicos</i> Síndrome de X frágil (<i>FMR1</i>), Síndrome de Rett (<i>MECP2</i>), Otros</p>

Modificado de Chelly, et al; 2006 y González, et al; 2008

Las causas ambientales y teratogénicas aportan de 5 a 13% [Basel-Vanagaite; 2008] y las causas relacionadas a prematurez el 2-10% de los casos. Se estima que las causas genéticas podrían llegar a estar implicadas en el 50% de los casos de RM o RD [González, *et*



al; 2008]. En el RM severo las causas genéticas pueden constituir 25-50% de los casos (figura 1) [Basel-Vanagaite; 2008].

Causas de Retraso Mental

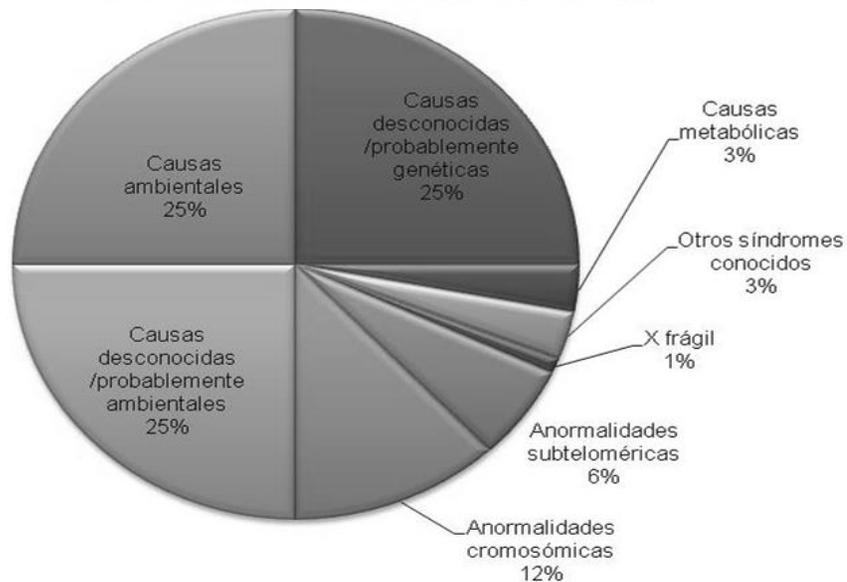


Figura 1. Porcentaje de causas de RM (Modificado de Winnepeninckx, *et al*; 2003)

Otros estudios argumentan que la causa del RM/RD puede ser identificada en 40 a 60% de los casos, sin embargo, el porcentaje de casos leves en donde la causa puede establecerse es de sólo 24%, lo cual es significativamente más bajo. Se estima que aproximadamente 5-6% del RM/RD puede atribuirse a anormalidades cromosómicas en las regiones subtroméricas [Shaffer; 2005a].

Con el advenimiento de nuevas técnicas genéticas, se han descubierto nuevas aberraciones cromosómicas crípticas, y un número importante de casos de RM considerados previamente como de origen idiopático ahora están clasificados como fenotipos clínicamente reconocibles. Las técnicas de microarreglos como los de Hibridación Genómica Comparativa (arreglos-CGH) revelan aberraciones submicroscópicas en 5 y 17% de pacientes con RM que cuentan con un cariotipo normal por métodos de citogenética convencional. Las plataformas de alta densidad como los microarreglos de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) permiten incrementar el diagnóstico 6% en relación a los casos evaluados con arreglos de baja densidad [Galasso, *et al*; 2010].

Además de la clasificación establecida por la OMS, el RM de causa genética puede subdividirse en sindrómico y no sindrómico. El RM sindrómico se caracteriza por RM acompañado de características dismórficas, malformaciones y/o anormalidades neurológicas, y el RM no sindrómico por impedimento cognitivo sin alguna característica adicional. Muchos



síndromes genéticos se caracterizan por presentar RM combinado con características dismórficas específicas y un comportamiento característico, por lo que pueden reconocerse clínicamente. Si un síndrome en particular es clínicamente reconocido, las pruebas para detectar la anormalidad cromosómica específica o mutaciones en un gen determinado deben llevarse al cabo para confirmar el diagnóstico [Basel-Vanagaite; 2008].

El exceso relativo de personas del sexo masculino en la población con RM severo (1.3-1.7:1) sugiere la contribución de genes ligados al cromosoma X en la etiología genética de la enfermedad. Estudios recientes aplican técnicas de citogenética molecular, para excluir anormalidades cromosómicas, y sugieren que cuando dos hermanos del sexo masculino tienen RM, en ausencia de anormalidades cromosómicas, la probabilidad de que esto se deba a anormalidades en genes ligados al X es tan alta como 80% [Raymond; 2004].

Si el RM ligado al cromosoma X (XLRM) monogénico tiene un exceso de 30% en hombres sobre mujeres, se puede esperar que 20-25% del RM en hombres, incluyendo casos esporádicos de RM, sean causados por genes XLRM. El XLRM monogénico en varones con RM esporádico puede aportar 8-10% de las causas genéticas de RM [Chelly, *et al*; 2006].

La incertidumbre sobre la etiología y la recurrencia del RM hacen que su prevención presente graves repercusiones de tipo terapéutico, social e incluso económico. El objetivo principal de los estudios genéticos es lograr un diagnóstico preciso, probando una hipótesis clínica mediante la realización de las pruebas genéticas adecuadas [González, *et al*; 2008].

2.1.3 RETRASO MENTAL EN MÉXICO

De acuerdo con el censo del año 2000, se definió a una persona con discapacidad como aquélla que presenta alguna limitación física o mental, de manera permanente o por más de seis meses, que le impide desarrollar sus actividades dentro del margen que se considera normal para un ser humano. Los resultados del XII Censo General de Población y Vivienda 2000 revelaron que, a nivel nacional, el 0.29% de la población tenía discapacidad intelectual (288 925 habitantes) [INEGI; 2004].

Ya en el 2010, el Censo capta la variable Limitación en la actividad con una pregunta incluida en el Cuestionario Básico que permite conocer el tipo de limitaciones que padece la persona al momento de realizar sus actividades cotidianas, y se indaga sobre la causa de la limitación en la actividad, por lo que fue posible conocer el origen de las limitaciones. Incluyéndose en ésta la “limitación mental”, donde 0.23% de la población tiene limitación mental reconocida desde el nacimiento (259 018 habitantes) [INEGI; 2010].



2.1.4 ABORDAJE DEL PACIENTE CON RETRASO MENTAL

En la evaluación de un individuo con RM la realización de una buena historia clínica y exploración física resulta de gran importancia. Un árbol genealógico bien detallado de tres generaciones puede revelar historia de pérdidas fetales, abortos o de problemas similares en otros miembros de la familia, lo cual puede orientar hacia alguna etiología. Detalles de la salud materna, historia del embarazo y nacimiento, poniendo atención a los valores de peso y perímetro cefálico, un perfil de los acontecimientos del desarrollo e historial educativo ayudarán a distinguir a los individuos con desarrollo lento de los que tienen regresión del desarrollo asociado con condiciones neurodegenerativas [Raymond; 2004]. El abordaje de los pacientes con RM/RD se explica a grandes rasgos en la tabla 2.

La asociación de RM y malformaciones congénitas está bien establecida, por lo que el examen físico exhaustivo para la búsqueda de dismorfias es un componente necesario en la evaluación del niño con retraso mental. En un estudio donde se evaluaron las anomalías menores en 50 niños con RM de causa desconocida, comparando con 100 niños sin retraso mental como controles, encontraron que 42% de los niños con RM/RD tenían tres o más anomalías menores contra ninguna en los controles. Con ello concluyeron que la etiología del RM fue el desarrollo anormal del Sistema Nervioso Central (SNC) evidenciado por la presencia de anomalías menores [Moeschler, *et al*; 2006].

Las pruebas genéticas deben indicarse cuando:

1. Se haya realizado una exploración básica.
2. Exista una historia familiar positiva de RM o RD, de abortos o de mortinatos sin causa explicada.
3. El retraso del desarrollo o mental se asocie con rasgos dismórficos, fenotipo conductual indicativo, regresión o consanguinidad.
4. Se hayan descartado por completo otras causas.

Incluso cuando estas pruebas puedan utilizarse como complementarias en el establecimiento de una hipótesis diagnóstica, deben cumplir para su prescripción con una serie de criterios, que no sólo están consensuados por guías internacionales, sino que su aplicación también puede suponer un importante ahorro, tanto en el esfuerzo diagnóstico como en medios materiales [González, *et al*; 2008].



TABLA 2. PROTOCOLO DE EVALUACIÓN CLÍNICA DEL PACIENTE CON RM/RD

Historia clínica

- Árbol genealógico de tres generaciones y detalles sobre el desarrollo de todos los individuos afectados posibles. La historia clínica debe estar acompañada por la anotación de la interpretación del tipo de herencia, si los antecedentes en la familia son suficientes o lo permiten.
- Historia clínica detallada de los progenitores: edades materna y paterna en el momento de la concepción, hábitos y riesgos preconceptionales.
- Historia prenatal: en ella pueden ser variables importantes si se trató de una concepción normal o asistida, las anomalías ecográficas o marcadores, como la presencia de pliegue nucal, infecciones prenatales y duración de la gestación.
- Historia neonatal, incluyendo Apgar, sufrimiento fetal en el parto, hipotonía al nacimiento, peso, talla y perímetro cefálico, así como anotación de posibles ingresos neonatales y causas de éstos.
- Resultados de Tamiz neonatal para fenilcetonuria e hipotiroidismo o ampliado.
- Evolución del crecimiento y desarrollo.
- Historia educacional y sociocultural.

Exploración Física

- Evaluación del cociente intelectual (IQ) si el paciente es mayor de 5 años, o indicación de las áreas de retraso del desarrollo evaluando en cada una de ellas si el retraso es leve, moderado, grave o muy grave cuando el paciente es menor de 5 años.
- Examen de características dismórficas: teniendo en cuenta o anotando aquellos caracteres fenotípicos que pueden ser compartidos por familiares parecidos.
- Examen de los signos neurológicos, incluyendo exploraciones sensoriales (capacidades visual y auditiva)
- Examen del fenotipo conductual del paciente.
- Tamiz metabólico si la exploración lo sugiere.
- Electroencefalograma (EEG) si existe historia positiva de crisis epilépticas.

Diagnóstico diferencial en el retraso mental o del desarrollo

- Los datos de la historia clínica, junto con la exploración física del paciente y la investigación de los datos extraídos utilizando la bibliografía existente, u otras herramientas, deben conducir a un diagnóstico diferencial, estableciendo una hipótesis diagnóstica.

Elaboración de una hipótesis diagnóstica

1. En el proceso de llegar a elaborar una hipótesis diagnóstica clínica deben evaluarse todos los detalles con una metodología rigurosa, de ahí que diferentes consensos publiquen tablas y criterios de evaluación clínica en pacientes con retraso mental o del desarrollo. Esta hipótesis deberá confirmarse diseñando un panel de pruebas diagnósticas complementarias que deben aplicarse.

Pruebas complementarias y de confirmación diagnóstica

- Las pruebas diagnósticas de las que se dispone actualmente son numerosas y variadas (electroencefalograma, exploraciones de neuroimagen, cariotipo, búsqueda de mutaciones, entre otras); por esta razón, dependiendo de la hipótesis diagnóstica establecida, se diseñará un plan secuencial para su aplicación. Existen en la bibliografía numerosos estudios que permiten estandarizar cómo, y con qué criterios, deben solicitarse pruebas complementarias para abordar un diagnóstico diferencial concreto.

Confirmación de la hipótesis diagnóstica

Cuando ésta se confirma, se obtiene un diagnóstico definitivo. Si esto no ocurre, es necesaria una reevaluación clínica y establecer una nueva hipótesis.

Modificado de González, *et al*; 2008

En la evaluación del RM/RD de origen idiopático las pruebas genéticas utilizadas sistemáticamente hasta el momento son las siguientes: la citogenética convencional (cariotipo), la detección de desórdenes genómicos (FISH de *locus* específico) y el diagnóstico de mutaciones del gen *FMR1*. Sin embargo, los avances en las técnicas de diagnóstico genético (FISH y/o MLPA subtelomérico y CGH-*microarreglos*) permiten acercarnos a más posibilidades de diagnóstico [González, *et al*; 2008].



2.2 CITOGENÉTICA

2.2.1 ESTRUCTURA DE LOS CROMOSOMAS

El término cromosoma fue acuñado por Waldeyer en 1888 y deriva de las palabras griegas *chroma* y *soma* que juntas significan “cuerpo pintado” [Spurbeck, *et al*; 2004].

El centrómero separa al cromosoma en un brazo corto (p) y un brazo largo (q). En el cariotipo humano se pueden distinguir varios tipos de cromosomas:

1. Metacéntricos, en donde el centrómero aparece a la mitad del cromosoma.
2. Submetacéntricos, el centrómero está más cerca de un brazo del cromosoma.
3. Acrocéntricos, el centrómero se encuentra muy cerca del final de un brazo del cromosoma; éstos, a menudo tienen satélites sobre el brazo p, los cuales tienen tallos que contienen genes que producen RNA ribosomal y constituyen las regiones organizadoras nucleolares (NOR) [Spurbeck, *et al*; 2004].

Los cromosomas corresponden al nivel más alto de compactación de la cromatina [Trojer, *et al*; 2007]. Dentro del núcleo, los cromosomas se encuentran decondensados, están estrechamente entrelazados y es difícil distinguir uno de otro. En la división celular (mitosis) los cromosomas se contraen y pueden ser vistos como estructuras individuales bajo el microscopio. En los organismos diploides como los mamíferos, los cromosomas están en pares. Cada par cromosómico lleva la misma información genética, además cada miembro del par puede tener una variante diferente de cada gen. Por otro lado, durante la formación del óvulo y el espermatozoide, (meiosis), se asegura que cada gameto solo tenga una copia de cada cromosoma. El número de cromosomas, tamaño y estructura difiere entre especies, el número diploide de los seres humanos es 46 [Warburton, 2005].

2.2.2 CROMATINA: HETEROCROMATINA Y EUCROMATINA

El DNA se encuentra empaquetado en varios niveles como cromatina dentro del núcleo de las células [Staynov, 2008]. La cromatina está constituida por el ensamblaje complejo del DNA, con proteínas histonas, no histonas y pequeñas cantidades de RNA [Trojer, *et al*; 2007].

La clase morfológica principal de cromatina distinguible dentro del núcleo de las células eucariotas es la heterocromatina, la cual está más compactada y generalmente es transcripcionalmente inactiva, mientras que la forma menos visible corresponde a la eucromatina, que está menos compactada y generalmente es transcripcionalmente activa [Basset, *et al*; 2009].



La eucromatina corresponde a las regiones genómicas que están decondensadas durante la interfase y contiene genes activos para transcripción y/o genes potencialmente activos. Las secuencias reguladoras en estas regiones son accesibles a las nucleasas, comúnmente tienen islas CpG desmetiladas, y las histonas del núcleo del nucleosoma H3 y H4 están hiperacetiladas en los residuos de lisina de su N-terminal [Rampakakis, *et al*; 2009].

La heterocromatina se clasifica en facultativa y constitutiva. La estructura y actividad de la heterocromatina facultativa está sujeta a control, puede ser alternativamente funcional o silenciada durante fases específicas del desarrollo [Dimitri, *et al*; 2008]. Molecularmente puede definirse como una cromatina condensada (a través de diferentes mecanismos), transcripcionalmente silenciada, con regiones que son decondensadas y permiten la transcripción dentro de los siguientes contextos: temporal (estados del desarrollo o etapas específicas del ciclo celular), espacial (cambios en la localización nuclear, del centro a la periferia o viceversa debidos a señales o factores exógenos) e improntada (materna/paterna/heredable, expresión génica monoalélica) [Trojer, *et al*; 2007].

En contraste, la heterocromatina constitutiva es comúnmente encontrada en grandes bloques como en los centrómeros y los telómeros de los cromosomas, consiste en una gran cantidad de secuencias de DNA altamente repetitivas en tándem y juega un papel importante en las funciones celulares, organización de los cromosomas y herencia, además de contener secuencias esenciales para la viabilidad y fertilidad [Dimitri, *et al*; 2008].

2.2.3 EMPAQUETAMIENTO DE LA CROMATINA

El empaquetamiento del DNA eucariótico debe cumplir con dos requerimientos: el polímero debe estar lo suficientemente compacto para estar dentro del núcleo y el DNA de los genes activos o transcripcionalmente competentes debe permanecer accesible a los factores de transcripción y a los complejos de las RNA polimerasas. Estos requerimientos pueden ser sostenidos por la variación en el nivel de empaquetamiento [Basset, *et al*; 2009].

La subunidad repetitiva fundamental de la cromatina es el nucleosoma, éste constituye el primer nivel de compactación y permite la transcripción después de la remodelación y/o sustitución/modificación de las histonas [Staynov, 2008]. Consiste de un núcleo central de ocho proteínas histona, las cuales son proteínas básicas pequeñas, muy conservadas, de 102 a 135 aminoácidos. Cada octámero comprende dos moléculas de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4, alrededor de las cuales se enrolla un tramo de 146pb de DNA de doble cadena en 1.75 vueltas. Otra histona (H1) se encuentra sobre la molécula de DNA fuera de la parte central del nucleosoma. Los nucleosomas adyacentes



están conectados por un tramo corto de DNA espaciador o de unión asociado a la H1 resultando en una fibra de cromatina de alrededor de 10nm de diámetro. Los nucleosomas compactan al DNA seis veces en su longitud [Strachan, 2006a].

El hilo de cuentas de unos 10nm, se enrolla a su vez en una fibra de cromatina de 30nm de diámetro, que corresponde a un empaquetamiento de 40 veces. La formación de esta fibra requiere de las colas de histona, las cuales están implicadas en el contacto internucleosómico, y es facilitada por la presencia de las histonas de unión o enlace (H1 y H5). Esta fibra es el constituyente básico de la cromatina en interfase y de los cromosomas mitóticos [Krebs, *et al*; 2010].

Los dos modelos principales de la fibra de 30nm son el “origen único” o “solenoide”, el cual corresponde a un arreglo helicoidal lineal simple y se enrolla sobre una cavidad central probablemente ocupada por DNA de unión (6 nucleosomas/11nm) y el “origen doble” o “zig-zag” que consiste de una doble fila de nucleosomas, análogas a la estructura del DNA (10-12 nucleosomas/11nm). Este último modelo está sustentado por la observación de un complejo de tetranucleosomas en cristales de cromatina (Figura 2) [Wu, *et al*; 2007].

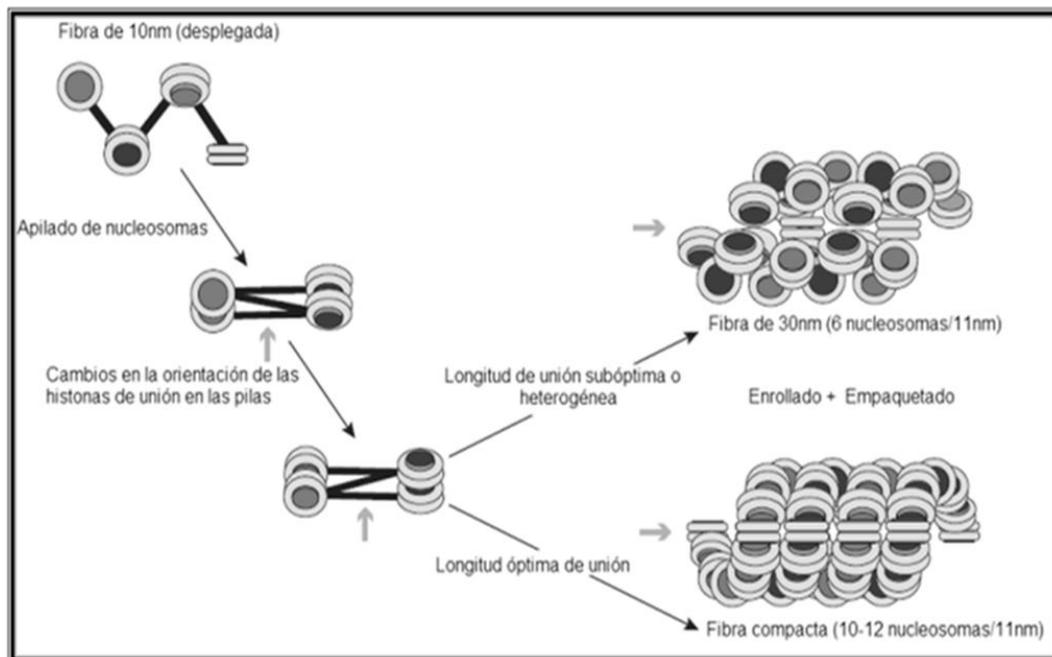


Figura 2. Modelos propuestos del plegamiento de la fibra de 10 nm. La fibra compacta muestra el plegamiento en “zig-zag” que corresponde a la estructura enrollada de tetranucleosomas cristalizada por Schalch en 2005, que en presencia de histonas de unión forma una estructura más enrollada vista por Robinson en 2006. La figura de la esquina superior derecha muestra la estructura clásica de la fibra de 30nm, una fibra menos compactada. Las flechas indican la dirección aproximada del eje longitudinal de las fibras (Modificada de Wu, *et al*; 2007)

Los niveles de plegamiento más allá de la fibra de 30nm están muy poco entendidos, pero es obvio que la compactación de 40 veces que se obtiene de la fibra de 30nm está



todavía muy lejos de los niveles de compactación requeridos en la interfase o el empaquetamiento de los cromosomas mitóticos. Las fibras de cromatina con diámetro de 60-300 nm han sido observadas por microscopia de luz y electrónica. Se presume que tales fibras consisten de fibras de 30nm plegadas que pueden representar el principal nivel de compactación, sin embargo, las subestructuras de estas fibras gruesas aún se desconocen [Krebs, *et al*; 2010].

Sabemos que durante la división celular los cromosomas están mucho más condensados. El DNA en un cromosoma en metafase está compactado alrededor de 1/10 000 en su longitud. Se encuentran asas de la fibra de cromatina de 30nm que contienen de 20 a 100 kilobases de DNA por asa, unidas a una estructura central integrada por proteínas no histonas (Figura 3) [Strachan; 2006a].

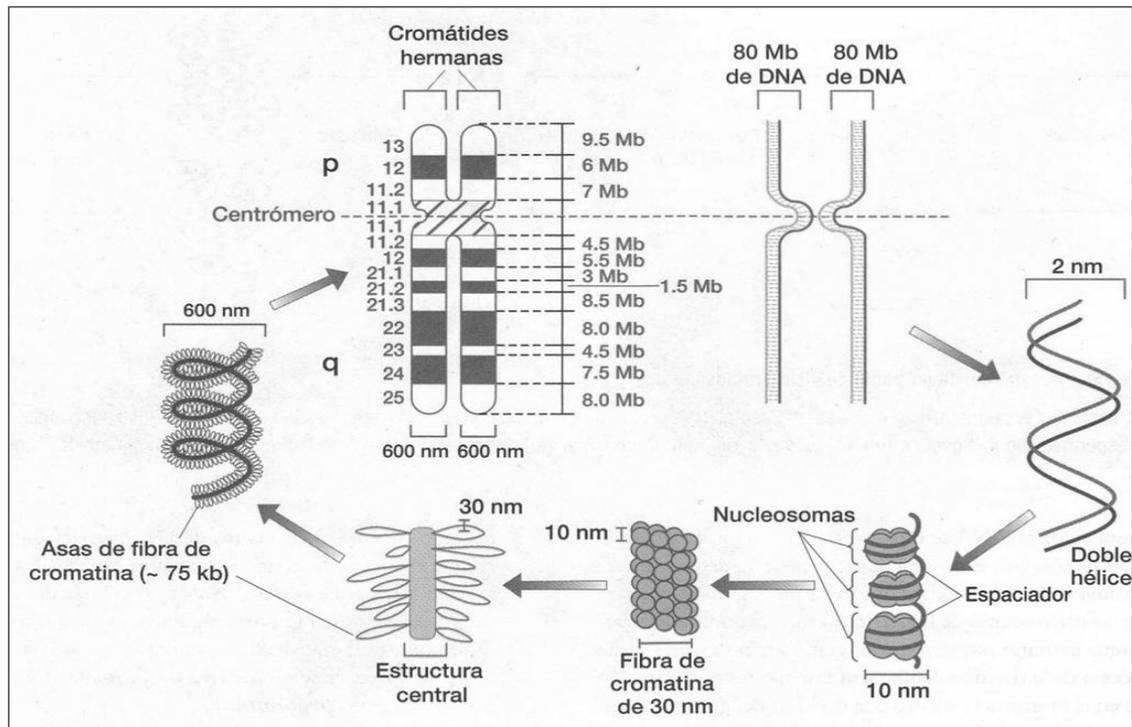


Figura 3. Niveles de empaquetamiento del DNA hasta llegar al nivel más alto de compactación, el cromosoma metafásico (Modificada de: Strachan; 2006a)

La construcción de cariotipos (ordenamiento de los cromosomas de acuerdo a tamaño, posición del centrómero y secuencia de bandas) de cromosomas metafásicos humanos permite la identificación de anomalías citogenéticas en una perspectiva del genoma completo. Cambios constitutivos y adquiridos de los cromosomas, pueden ser detectados en preparaciones citogenéticas de rutina y alta resolución, y una nomenclatura específica permite una comunicación e interpretación precisa de ellos [Shaffer; 2005b].



2.3 ALTERACIONES CROMOSÓMICAS

Las anomalías cromosómicas son cambios que dan por resultado una alteración visible de los cromosomas y pueden ser numéricas o estructurales. Dependiendo del momento en que éstas ocurran serán constitutivas o adquiridas, las primeras pueden encontrarse en forma pura, como mosaicos o químeras [Strachan; 2006a]

Errores en la segregación durante la mitosis o meiosis pueden producir aberraciones en el número de cromosomas. Las alteraciones en la estructura de éstos pueden resultar de su rompimiento y reparación o surgir de los errores en apareamiento y recombinación durante la meiosis [Warburton, 2005]. El resultado puede ser una alteración cromosómica balanceada, cuando el contenido total de material genético se conserva, o desbalanceada, cuando se gana o pierde material.

Las anomalías cromosómicas producen pérdida y/o ganancia de copias de muchos genes, estos cambios en la dosis génica afectan la función y la interacción con otros genes. Si se presentan desde la concepción, estos cambios son probablemente el resultado del desarrollo anormal de muchas estructuras diferentes y de múltiples cambios en la fisiología celular. Las estructuras complejas como el cerebro, el corazón y la anatomía facial están frecuentemente afectadas. Cuando los autosomas están implicados usualmente ocurren abortos o nacimiento de un infante con múltiples anomalías, incluyendo típicamente RM [Warburton, 2005]. Los mecanismos patogénicos que surgen de las anomalías cromosómicas pueden resumirse en cuatro puntos:

- a) Un efecto de dosis génica, por exceso o ausencia de material cromosómico, que puede ser por un cromosoma completo o sólo un fragmento de éste.
- b) Un daño directo, por interrupción o rearreglo de un gen en el punto o los puntos de ruptura de la alteración cromosómica.
- c) Un efecto en la expresión de genes improntados debido a alteraciones en un cromosoma o un segmento cromosómico que los contenga.
- d) Un efecto de posición, mediante el cual un gen en un nuevo ambiente cromosómico, funciona inapropiadamente [Gardner, *et al*; 2004a].

De hecho, cualquier variación en lo que se considera como cariotipo normal (46,XX o 46,XY) puede implicar un efecto fenotípico, cuyo grado dependerá del cromosoma implicado, la cantidad de material ganado o perdido y de los genes que contenga. Por lo general, cualquier ganancia o pérdida de material de un autosoma, principalmente si incluye regiones eucromáticas, ricas en genes, tiene como consecuencia muerte fetal o del embrión,



anormalidades congénitas, RD y RM, fallas reproductivas y/o cáncer. Generalmente los cambios en los cromosomas sexuales son mejor tolerados [Warburton, 2005]. Se estima que uno de cada 165 recién nacidos vivos tiene alguna aberración cromosómica de autosomas o de cromosomas sexuales, ya sea numérica o estructural (Tabla 3) [Luthardt, *et al*; 2001].

TABLA 3. INCIDENCIA DE ANORMALIDADES CROMOSÓMICAS EN RECIÉN NACIDOS	
Tipo de anomalía	Incidencia aproximada
Anormalidades de los cromosomas sexuales en hombres	
47,XXY	1/500 varones ¹
47,XYY	1/1000 varones ¹
Otros	1/1350
Total	1/385
Anormalidades de los cromosomas sexuales en mujeres	
45,X	1/9000 Mujeres ²
47,XXX	1/960 Mujeres ³
Otras	1/2740
Total	1/660
Anormalidades numéricas autosómicas en infantes	
Trisomía 21	1/800 nacidos vivos
Trisomía 18	1/8140
Trisomía 13	1/19000
Triploidía	1/57000
Total	1/695
Anormalidades estructurales en infantes (autosomas y cromosomas sexuales)	
Rearreglos balanceados:	
Robertsonianos	1/1120 Nacidos vivos
Traslocaciones recíprocas balanceadas	1/500 ⁴
Otros	1/965
Rearreglos no balanceados	1/1675
Todas las anomalías cromosómicas	1/160 Nacidos vivos

Modificado de Luthardt, *et al*;2001, 1. Ross, *et al*; 2009, 2. Rocco de Oliveira, *et al*; 2009, 3. Tartaglia, *et al*; 2010, 4. Gardner, *et al*;2004b.

2.3.1 ALTERACIONES NUMÉRICAS

Hay dos clases de anomalías numéricas: euploidías y aneuploidías, ambas pueden existir en forma pura o como mosaicos. El término euploidía significa la presencia de un número cromosómico que es múltiplo exacto del número haploide, la poliploidía es la presencia de 3 o más juegos completos de cromosomas (3n, 4n, 5n, etcétera). La aneuploidía es la presencia o ausencia de uno o más cromosomas individuales (2n+1, 2n-1) [Strachan; 2006a].

2.3.1.1 Poliploidía

En lugar de las dos copias usuales de cada cromosoma (diploidía), las células somáticas pueden contener tres copias (triploidía) o cuatro copias (tetraploidía) de todos los cromosomas. Estos números cromosómicos altamente anormales pueden ocurrir en tumores o en líneas celulares en cultivo; la tetraploidía ocurre normalmente en algunos tejidos del cuerpo, como megacariocitos y hepatocitos. Los productos poliploides rara vez llegan a



término usualmente llevan a muerte embrionaria o fetal temprana. Los gametos normalmente son haploides (sólo una copia de cada cromosoma), pero como anomalía pueden ser diploides. La haploidía, ocurre raramente en tumores, y no es compatible con el desarrollo de un producto más allá de las primeras divisiones celulares [Warburton, 2005].

Se estima que las triploidías están presentes en 1-3% de todos los embarazos clínicamente reconocidos, en 6% de abortos espontáneos de primer trimestre y 0.5% de mortinatos afectados [Robinson; *et al*; 2002]. Los estudios iniciales sugirieron que el 80% de las triploidías son de origen paterno, usualmente resultan de la fertilización de un óvulo por dos espermatozoides (dispermia); sin embargo, estudios más recientes muestran que 80-90% de las gestas con triploidía son de origen materno, con errores que ocurren en la primera (~22%) y segunda división meiótica (~67%) [Robinson, *et al*; 2002 /Gardner, *et al*; 2004a].

La mayoría de los fetos triploides que resultan en abortos espontáneos son diándricos, típicamente, tienen un crecimiento relativamente normal, el tamaño de la cabeza puede ser normal o pueden tener microcefalia, la placenta usualmente (pero no siempre) tiene la apariencia de una mola parcial. En las triploidías digénicas, no se observa la mola parcial y éstos fetos usualmente tienen retraso en el crecimiento, macrocefalia y la placenta es pequeña [Devriendt; 2005].

La tetraploidía se ve más a menudo en abortos espontáneos tempranos, constituyendo aproximadamente el 2.5% de éstos. Tienen un retraso en el desarrollo severo y muestran una amplia variedad de anomalías. Sin embargo, no parecen tener un fenotipo distinguible como tetraploide. Los que sobreviven están severamente comprometidos, usualmente mueren durante los primeros meses de vida. El análisis de la proporción de cromosomas sexuales en los pocos casos reportados sugiere que muchos de los nacidos vivos son el resultado de errores de división post-fertilización (ver figura 4) [Robinson; *et al*; 2002]



Figura 4. Cariotipo tetraploide 92,XXYY de un paciente con mixoploidía del Hospital General de México.

2.3.1.1.1 Mixoploidía

La mixoploidía triploide (diploide/triploide) ha sido reportada en muy pocos pacientes. Las células triploides se encuentran tanto en linfocitos como en fibroblastos, y en otros casos la línea triploide está limitada a fibroblastos. Los pacientes con este tipo de poliploidía están menos afectados, y tienen una sobrevivencia de alrededor de 10 años. Las características clínicas incluyen retraso intrauterino, retraso psicomotor, crecimiento asimétrico, puente nasal ancho, sindactilia, anomalías genitales, pigmentación irregular de la piel [Gardner, *et al*; 2004c]

El origen del juego extra de cromosomas puede ser de origen paterno o materno. La mixoploidía de origen paterno puede originarse por la incorporación de un segundo espermatozoido en el pronúcleo del blastómero y el origen materno por la fusión del segundo cuerpo polar con el blastómero temprano [Devriendt; 2005].

La mixoploidía tetraploide (diploide/tetraploide) es menos frecuente que la mixoploidía triploide. Las características clínicas son similares pero son menos severas que en los tetraploides no mosaicos [Gardner, *et al*; 2004c]

Las mixoploidías pueden ser viables dependiendo del porcentaje de células anormales y de su distribución en los tejidos [Devriendt; 2005].

2.3.1.2 Aneuploidía

Normalmente, una copia de cada cromosoma se hereda de cada padre. Cuando el cigoto recién formado posee tres copias de un cromosoma se denomina trisomía (Figura 5) y si posee sólo una copia corresponde a una monosomía [Moore, *et al*; 2007]. La trisomía y la monosomía son las anomalías cromosómicas más comúnmente encontradas tanto en



los productos de la concepción como en los tumores. Las trisomías y monosomías de todos los cromosomas pueden ocurrir en la concepción, sin embargo, la mayoría resultan en muerte temprana del embrión [Warburton, 2005].

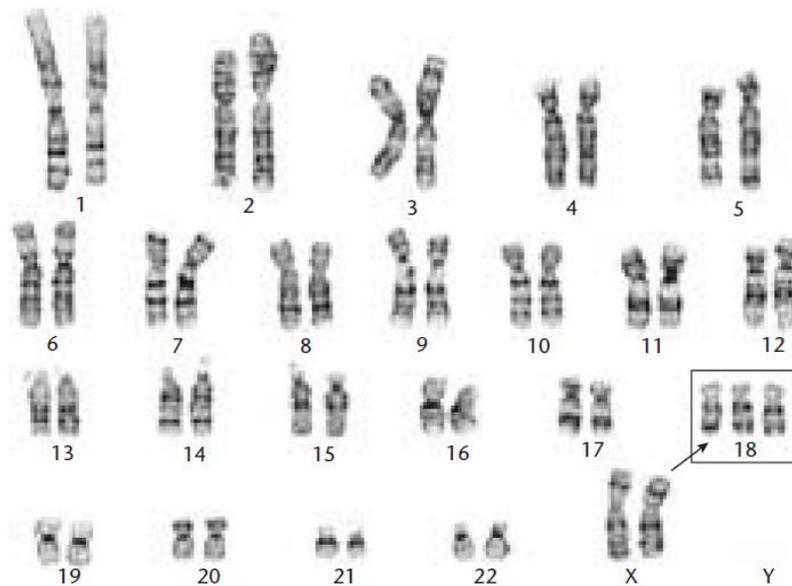


Figura 5. Cariotipo de una célula trisómica (47,XX,+18). (Modificada de Warburton; 2005)

Las trisomías y monosomías ocurren por un error durante la división meiótica de las células germinales que se convierten en óvulos y espermatozoides. Durante este proceso, los 46 cromosomas de las células iniciales deben segregarse y cada célula hija contiene 23 cromosomas. Los errores de segregación pueden resultar en ovocitos o espermatozoides con cromosomas extras (disómicos) o perdidos (nulisómicos). En la mayoría de las concepciones con aneuploidía el error ocurre en el ovocito (Ver Tabla 4) [Warburton, 2005].

TABLA 4. ORIGEN DE LAS TRISOMÍAS HUMANAS					
Trisomía	Meiosis Paterna		Meiosis Materna		Mitosis (%)
	MI (%)	MII (%)	MI (%)	MII (%)	
15		15	76	9	
16			100		
18			33	56	11
21	3	5	65	23	4
XXY	46		38	14	2
XXX		6	60	16	18

Modificado de Vekemans; 2005

En organismos experimentales, se ha demostrado que la no disyunción es el resultado de una variedad de causas, incluyendo un alineamiento inapropiado de los cromosomas sobre el eje de división, fallas en las proteínas que sirven para que los cromosomas migren a los polos opuestos, resolución prematura de quiasmas, o separación prematura de



cromátidas hermanas. Se conoce muy poco sobre las causas de la no disyunción en humanos pero algunos datos sugieren que la separación prematura de cromátidas hermanas debido a cromosomas aquiasmáticos a menudo puede estar involucrada (Ver Figura 6) [Robinson, *et al*; 2002].

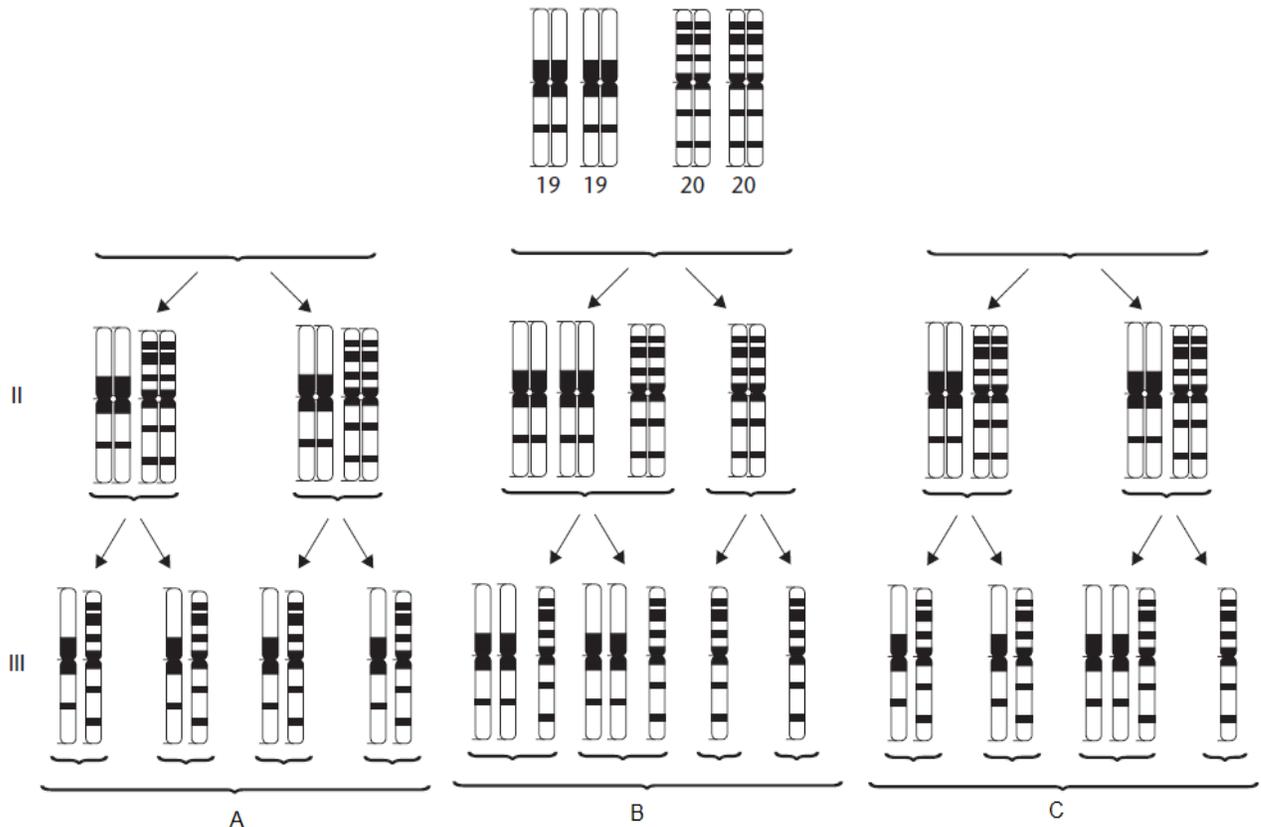


Figura 6. Origen de las aneuploidías debido a errores en la Meiosis, en la figura A se muestra una meiosis normal, en la figura B II hay una no disyunción en meiosis I, dando origen a dos gametos disómicos y dos nulisómicos observados en B III. En la figura C se muestra un error en la meiosis II donde las cromátidas hermanas no se segregan adecuadamente, y se observan dos cigotos normales, un cigoto disómico y un cigoto nulisómico. A la fertilización, los gametos disómicos originarán trisomías y los nulisómicos monosomías. (Modificado de Fryns, *et al*; 2005)

Las trisomías causadas por la no disyunción en la meiosis I pueden distinguirse de las que ocurren en meiosis II por análisis de los patrones de segregación de marcadores genéticos moleculares polimórficos próximos al centrómero en células obtenidas de los productos trisómicos. La no disyunción durante la primera división resulta en una copia de cada uno de los dos diferentes marcadores presentes en las dos copias del cromosoma en el gameto anormal, cuando no hay disyunción en meiosis II resulta en dos copias del mismo marcador. Para poder determinar el origen de la no disyunción, deben estudiarse marcadores cercanos al centrómero para eliminar la ambigüedad resultante de la recombinación meiótica (Figura 7) [Moore, *et al*; 2007].

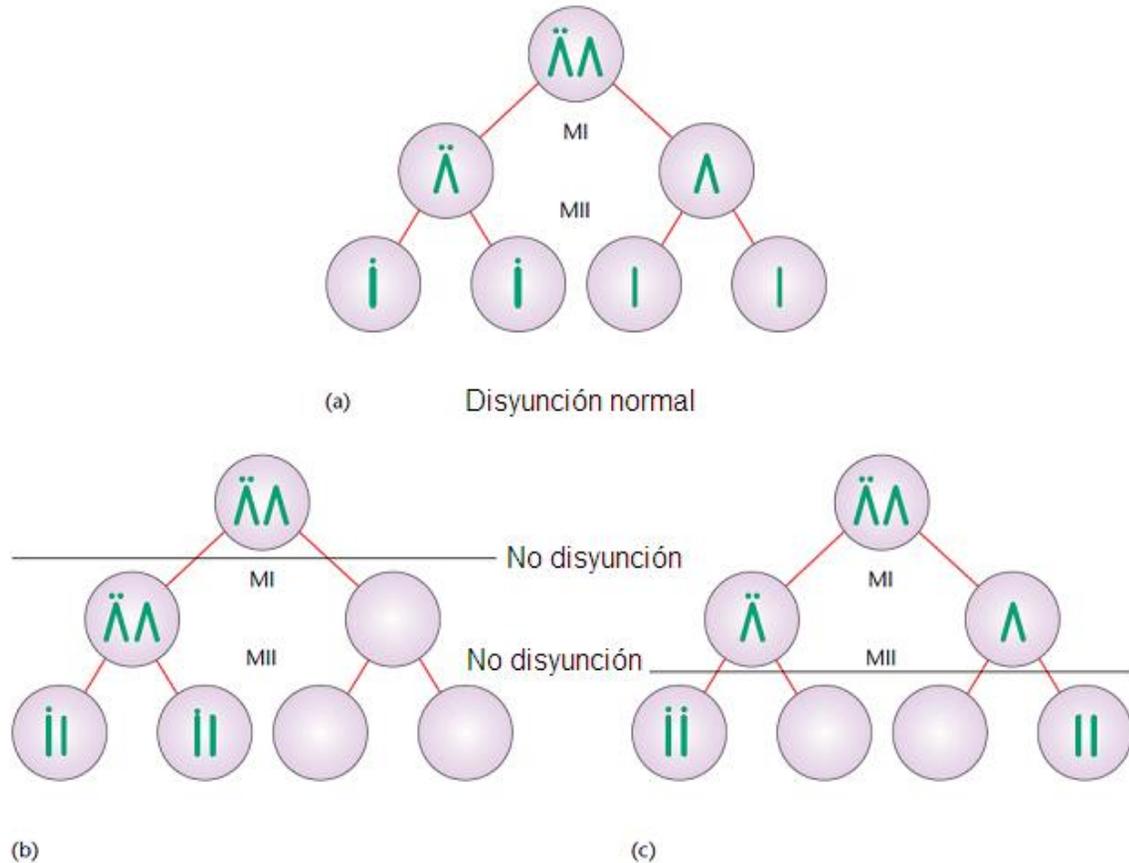


Figura 7. Origen de las trisomías debido a no disyunción en meiosis I y II, mostrando en (b) y (c) las diferencias que se observan en los polimorfismos cromosómicos (marcadores) cuando el error ocurre en Meiosis I (marcador en estado heterocigoto) o en Meiosis II (marcador en estado homocigoto) (Modificada de Moore, *et al*; 2007).

Las monosomías de cromosomas completos son extremadamente raras tanto en nacidos vivos como en abortos, muy probablemente debido a que son letales durante el desarrollo temprano y esto resulta en abortos espontáneos no reconocidos. La única monosomía de autosomas que ha sido reportada es la del cromosoma 21, sin embargo parecería que los casos que llegaron a término son mosaicos o rearrreglos cromosómicos en los que por métodos convencionales no puede identificarse el otro cromosoma 21. La monosomía X o síndrome de Turner es la única monosomía que se ha reportado en recién nacidos, aún cuando se aborta el 99% de estos productos y se ha postulado que estos productos son o fueron mosaicos con un segundo cromosoma sexual [Fryns, *et al*; 2005].

La no disyunción meiótica es la causa más común de las anomalías cromosómicas de significancia clínica. Estas anomalías cromosómicas son encontradas en aproximadamente 35% de abortos espontáneos de primer trimestre, en 4% de mortinatos y 0.3% de los nacidos vivos están afectados. La mayoría de las trisomías autosómicas



resultan en fallas para producir el embarazo o en abortos espontáneos. Las trisomías de los cromosomas 13, 18 y 21 pueden originar productos vivos e infantes con defectos al nacimiento y retraso mental. Aproximadamente 1 en 333 nacidos vivos es aneuploide, siendo la más común la trisomía 21 (SD). Las copias extras de los cromosomas X y Y son compatibles con los nacimientos vivos, y sólo una pequeña fracción de las nacidas vivas tienen monosomía X (Tabla 5) [Moore, *et al*; 2007]

Tiempo de detección	21	18	16	13	Cromosomas sexuales extra	Monosomía X	Todas las trisomías y monosomías del X
Abortos espontáneos	2.3	1.1	7.5	1.1	0.3	8.6	34.7
Mortinatos	1.1	1.2	-	0.3	0.7	0.25	4.25
Nacidos vivos	0.125	0.012	-	0.005	0.29	<0.01	0.3

Modificado de Moore, *et al*; 2007

La no disyunción ha sido asociada con una variedad de factores de riesgo, los más consistentes son la relación entre el incremento de la edad materna con el incremento en la frecuencia de eventos de no disyunción. El 30-40% de todos los ovocitos de las mujeres de más de 40 años tienen un número cromosómico anormal (Tabla 6). El efecto de edad materna se ve tanto en meiosis I como en meiosis II, pero la mayoría de estos eventos ocurren en meiosis I. La causa del efecto de la edad materna puede resultar del tiempo en el que las células se encuentran en dictioteno. El decremento en la recombinación durante la meiosis también se correlaciona con el incremento en la no disyunción. Hay una probabilidad menor de que un cromosoma extra o de menos pueda surgir de un esperma anormal, o de una división celular temprana anormal del embrión, sólo una pequeña proporción de aneuploidías es debida a errores en la meiosis masculina, y generalmente implica a los cromosomas sexuales. Además, existe una pequeña correlación con el incremento en la edad paterna [Moore, *et al*; 2007].

Edad Materna	Riesgo para +21	Riesgo para +18	Riesgo para +13	Riesgo para XXX	Riesgo para XXY	Riesgo para todas las trisomías
35	1/245	1/840	1/2600	1/2500	1/2000	1/120
37	1/150	1/510	1/2600	1/1450	1/1250	1/80
40	1/70	1/230	1/1700	1/700	1/555	1/40
44	1/20	1/70	1/220	1/275	1/185	1/17

Modificado de Moore, *et al*; 2007



La contribución paterna de no disyunción es pequeña para las trisomías (como se observó en la Tabla 4), aproximadamente en 2-3% de espermatozoides de hombres aparentemente sanos se encuentra aneuploidía [Moore, *et al*; 2007].

2.3.1.2.1 Mosaicismo y Quimerismo

El mosaicismo y quimerismo significan la presencia de dos o más linajes celulares diferentes en sentido genético en un mismo individuo. Las poblaciones celulares distintas desde el punto de vista genético pueden originarse del mismo cigoto (mosaicismo) o surgir de diferentes cigotos (quimerismo). El quimerismo puede surgir naturalmente de la fusión de gemelos implantados cercanamente, de la migración de células entre embriones de gestas múltiples o puede ser causado por el transplante de órganos o tejidos de donadores por tratamientos médicos [Moore, *et al*; 2007].

Las anomalías que serían mortales de forma constitutiva pueden ser viables en forma de mosaicos. Los mosaicos aneuploides son los más comunes, éstos dan por resultado una proporción de células normales (diploides) y otra de células aneuploides [Strachan; 2006a] y pueden ser el resultado de la no disyunción de una célula normal después de la concepción normal con ganancia o pérdida de un cromosoma durante la embriogénesis o también puede ser el resultado de una no disyunción después de la concepción trisómica con pérdida de uno de los tres homólogos, produciendo un “rescate trisómico” [Moore, *et al*; 2007].

En el caso del rescate trisómico, aproximadamente una tercera parte de las veces, resulta en la presencia de ambas copias de un cromosoma heredadas del mismo progenitor, condición referida como disomía uniparental (DUP), que puede ser por sí misma perjudicial para el feto cuando en el cromosoma implicado hay genes improntados. La frecuencia y momento de los eventos de no disyunción determinan la proporción entre células aneuploides y células normales y también los tipos de tejidos afectados. Para muchas anomalías cromosómicas la proporción de células anormales correlaciona con la severidad de la expresión clínica. El mosaicismo puede también afectar sólo a la placenta y no al feto, una condición conocida como “mosaicismo confinado a placenta” (MCP) y puede ayudar a explicar porqué algunas concepciones trisómicas sobreviven hasta término, mientras que muchas otras son abortos espontáneos. El MCP es identificado prenatalmente en el curso de las pruebas diagnósticas y puede sugerir la presencia de DUP en un feto con cariotipo normal (Figura 8) [Moore, *et al*; 2007].

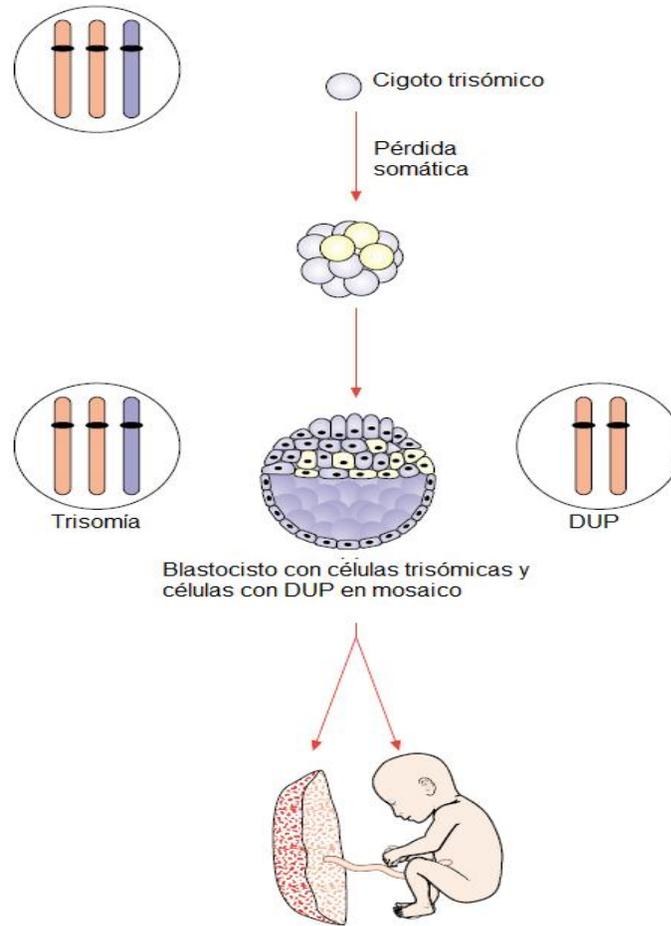


Figura 8. Origen de una trisomía en mosaico por rescate trisómico y mosaicismo confinado a placenta. La trisomía contiene dos copias maternas (rosa) y una paterna (azul), la pérdida de un cromosoma en el feto puede dar lugar a una disomía uniparental, donde ambos cromosomas provienen de la madre. El feto contiene células diploides y trisómicas. (Modificado de: Robinson, *et al*; 2002)

Los mosaicos son a menudo encontrados en anomalías de cromosomas sexuales y trisomías autosómicas. Más de la mitad de los casos de trisomía 21 en mosaico son resultado de la pérdida del cromosoma 21 extra en las divisiones mitóticas subsecuentes a una concepción trisómica; por el contrario, la trisomía 8 en mosaico, típicamente es adquirida durante las divisiones mitóticas después de una concepción normal. Aproximadamente 5% de los casos de trisomía 21 y otras trisomías autosómicas aparentemente en forma pura son el resultado de una no disyunción mitótica en la embriogénesis temprana [Moore, *et al*; 2007].

Los mosaicos se ven en aproximadamente 0.2% de los fetos, 1-4% de los pacientes con SD, 10% de los pacientes con síndrome de Klinefelter (47,XXY) y cerca de 50% en los pacientes con fenotipo de síndrome de Turner. La significancia clínica del mosaicismo depende de la proporción y de la distribución en los tejidos de las células aneuploides [Luthardt, *et al*; 2001/Devlin, *et al*; 2004].



2.3.2 ALTERACIONES ESTRUCTURALES

Las anomalías cromosómicas estructurales surgen como resultado de un rompimiento cromosómico y una reparación del DNA. Los rompimientos pueden ocurrir debido a la intervención durante los procesos normales de replicación, o a factores externos como la radiación y algunos agentes químicos que causan daño al DNA. Adicionalmente los rearrreglos pueden ocurrir durante el apareamiento y recombinación de los cromosomas durante la meiosis en las células germinales. Los genes comprenden solo una pequeña proporción de todo el DNA en los cromosomas, muchos rompimientos en los cromosomas no ocurren en genes y por lo tanto no causan anomalías clínicas, a menos que lleven a pérdida o ganancia significativa de material cromosómico [Warburton, 2005].

La mayoría de los errores ocurren durante la replicación. Los genes que controlan el ciclo celular usualmente reconocen los errores de replicación y el daño al DNA no reparado, y previenen que las células entren en mitosis hasta que las enzimas reparadoras de DNA corrijan el mal apareamiento o el daño en el genoma. Algunos de los agentes que se conoce que causan daño en los cromosomas son los virus, agentes químicos y radiación ionizante como los rayos X, los rayos gamma y la luz ultravioleta, estos agentes actúan causando rupturas en las cadenas de DNA, o alterando la estructura física de las bases del DNA. Cuando los puntos de control del ciclo celular fallan, las células con errores en el DNA entran a mitosis o meiosis, y las aberraciones cromosómicas estructurales, surgen debido a errores mecánicos durante la replicación. Estos cromosomas estructuralmente alterados pueden producir fallas a gran escala y cambios en el ambiente genético de las células, como cambios en las características de crecimiento de las células incluyendo retraso en el crecimiento, desregulación en el control del desarrollo celular, muerte celular y cáncer [Moore, *et al*; 2007].

Este tipo de aberraciones pueden resultar en enfermedades genéticas debido a trisomías y/o monosomías de segmentos cromosómicos, estas alteraciones pueden ser eventos *de novo* o pueden ser heredados de padres portadores de rearrreglos balanceados [Moore, *et al*; 2001a].

Si en el mismo cromosoma ocurren una o más rupturas, pueden ocasionar una deleción o duplicación del material cromosómico, o una inversión cuando el segmento cromosómico es invertido en orientación. Cuando los rompimientos ocurren en más de un cromosoma éstos pueden conducir a un intercambio de segmentos cromosómicos, es decir, una traslocación. En una traslocación balanceada hay intercambio de segmentos pero nunca



una ganancia o pérdida significativa. En una traslocación no balanceada hay una ganancia y/o pérdida neta de material. El examen de los cromosomas en células en división algunas veces revela la presencia de cromosomas rotos o rearrreglos complejos como anillos y cromosomas con múltiples centrómeros. Algunos de éstos pueden resultar en daño celular por deleción o traslocación, mientras que otros serán incompatibles con la división celular o la supervivencia de la célula [Warburton, 2005].

Los individuos con rearrreglos aparentemente balanceados usualmente tienen un desarrollo normal, sin embargo, hay un riesgo incrementado para las concepciones con complementos cromosómicos no balanceados debido a dificultades en la segregación de los rearrreglos en meiosis [Warburton, 2005]. Si se hereda un rearrreglo estructural balanceado, hay un riesgo bajo de impedimento físico o mental resultante del rearrreglo. Sin embargo, cuando la anormalidad ocurre como un evento *de novo*, es decir, cuando los padres tienen un cariotipo normal, el riesgo de enfermedad genética o efectos fenotípicos se incrementa, aún cuando el rearrreglo sea aparentemente balanceado. Esto puede resultar en deleciones o duplicaciones submicroscópicas en los puntos de ruptura o de cambios funcionales en los genes cercanos, los cuales son causados por rompimientos dentro del gen o por cambios en las regiones reguladoras de éste. Los únicos problemas de un portador balanceado pueden ser las dificultades en la reproducción evidenciadas por infertilidad, abortos espontáneos o hijos con anormalidades, estas dificultades surgen del apareamiento, recombinación y segregación de los cromosomas implicados durante la primera profase meiótica [Moore, et al; 2001a].

La frecuencia de anormalidades estructurales varía considerablemente en diferentes poblaciones. La frecuencia más alta se observa en abortos espontáneos y la más baja en recién nacidos. Esta reducción puede, en parte, ser explicada por pérdida fetal, particularmente en los casos con rearrreglos significativamente no balanceados (tabla 7) [Luthardt, et al; 2001].

TABLA 7. FRECUENCIA DE ANORMALIDADES ESTRUCTURALES			
Rearreglo estructural	Abortos espontáneos (%)	Diagnóstico prenatal (%)	Recién nacidos (%)
Balanceado	2-4	0.4	0.2
No balanceado		0.11	0.05

Fuente: Luthardt, et al; 2001

En las siguientes páginas se hará una descripción breve de cada anormalidad cromosómica y en la figura 9 se muestra un diagrama de éstas.

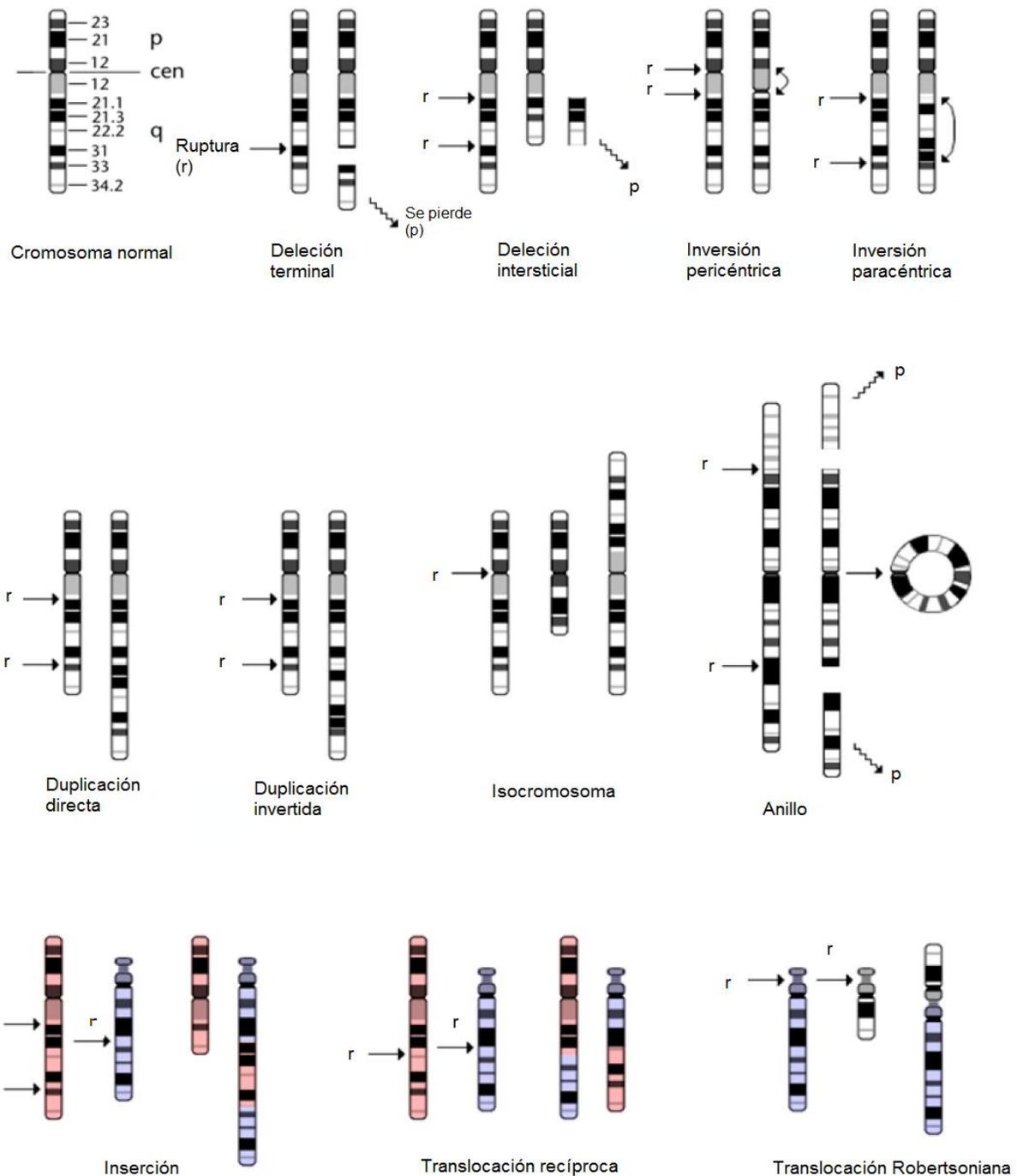


Figura 9. Tipos de anomalías cromosómicas estructurales (Modificado de Luthardt, *et al*, 2001)

2.3.2.1 Deleciones

Son anomalías en las que se pierde un fragmento de cromatina de un cromosoma. Las deleciones resultan en monosomía parcial y son rearrreglos no balanceados. Un solo rompimiento causa una deleción terminal con la subsecuente pérdida del final del cromosoma y regeneración del telómero. Cuando ocurren dos rompimientos en el mismo brazo del cromosoma se forma una deleción intersticial por pérdida de la cromatina entre las rupturas y reunión de los segmentos remanentes (figura 9). Las deleciones que son lo



suficientemente grandes para ser vistas usando microscopio de luz, representan la pérdida de muchos genes que están localizados físicamente en la misma banda o región del cromosoma y resultan en una monosomía para esta porción del genoma. Para muchos *loci*, esto representa una haploinsuficiencia en función y es a menudo suficientemente severa para causar la muerte del embrión. Las deleciones que sobreviven, al nacimiento están asociadas con alto riesgo de defectos e impedimento intelectual. Aquellas que involucran genes supresores de tumores confieren un alto riesgo de cáncer y/o leucemia [Moore, et al; 2001a].

Algunas deleciones intersticiales son difícilmente vistas por técnicas de citogenética convencional, este tipo de deleciones submicroscópicas son recurrentes con puntos de ruptura constantes, debido a las secuencias que las flanquean, secuencias repetidas de bajo número de copias y de número de copias variables (LCR y CNV), dichos rearrreglos tienen un nombre particular, se les conoce como desórdenes genómicos, debido a que ocurren por el reordenamiento del genoma y no por cambios en la secuencia del DNA, debido a que la arquitectura del genoma provoca inestabilidad cromosómica [Lupski, 2009].

Los desórdenes genómicos surgen a través de recombinaciones homólogas no alélicas inter o intracromosómicas (NAHR) causadas por errores en el alineamiento de las duplicaciones segmentarias o en los LCR. Los LCR tienen una homología del 95-97%, lo cual, los hace propensos a interactuar y facilitar la NAHR que lleva a ganancia, pérdida o inversión de la secuencia implicada. Las microdeleciones mediadas por LCR se han identificado en todo el genoma. Para muchas de las regiones de microdelección, se ha identificado la duplicación recíproca, pero con una frecuencia más baja que la deleción [Blennow, et al; 2008].

Los desórdenes genómicos llevan a diferentes manifestaciones clínicas que son importantes para reconocerlos e incluso pueden ser portados en estado heterocigoto por un padre no afectado o muy ligeramente afectado [Moore, et al; 2001a].

2.3.2.2 Duplicaciones

Son rearrreglos no balanceados que resultan en trisomía parcial. Comparado con las deleciones, las duplicaciones tienden a ser más leves en efectos, pero con características clínicas. Las duplicaciones segmentarias pueden estar orientadas de dos maneras: directa o invertida. La duplicación directa retiene el mismo orden de los *loci* y las bandas cromosómicas en relación al centrómero, cuando las duplicaciones son invertidas exhiben a los *loci* y a las bandas al revés (Figura 9) [Moore, et al; 2001a].



La duplicación de un segmento cromosómico usualmente ocurre por un entrecruzamiento desigual, entre cromosomas homólogos o cromátidas hermanas (especialmente en las regiones del genoma donde se encuentran secuencias de DNA repetido, como LCR o CNV). Las duplicaciones también pueden ser el resultado de una segregación meiótica anormal en una traslocación o un entrecruzamiento meiótico en un portador de una inversión [Luthardt, *et al*; 2001 / Moore, *et al*; 2001a].

2.3.2.3 Anillos

Se forman a partir de dos deleciones terminales cuando hay rompimiento en ambos brazos del cromosoma y unión de los extremos del segmento que contiene al centrómero con pérdida de los segmentos terminales (Figura 9). Los cromosomas en anillo representan una forma de deleción terminal con la característica adicional de ser mitóticamente inestables debido a problemas mecánicos durante la replicación y segregación (Figura 10).

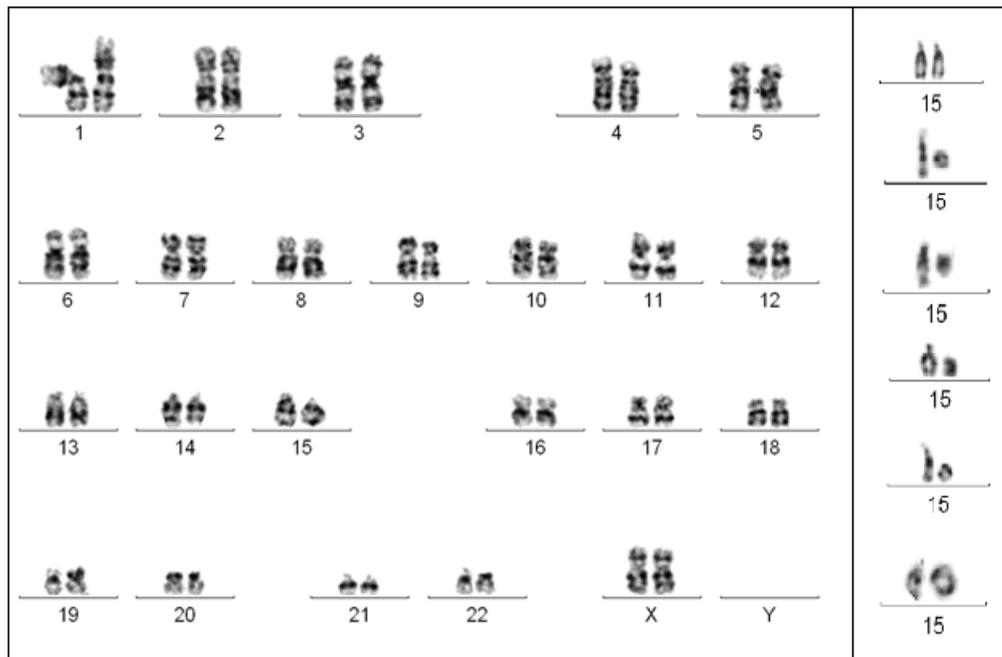


Figura 10. Cariotipo 46,XX,r(15)(p12;q26.3) de una paciente del Servicio de Genética. En el recuadro de la derecha se muestran anillos de diferente tamaño de varias metafases, resultado de su inestabilidad durante la división celular.

Los individuos con cromosomas en anillos tienen muchas de las características de los pacientes con deleciones terminales, sin embargo, hay características frecuentes en los pacientes con cromosomas en anillos independientemente del cromosoma implicado, a esta entidad se le denomina “Síndrome del anillo autosómico”, los afectados tienen retraso en el crecimiento, características dismórficas menores, RM moderado (suele ser variable, y depende de la cantidad de material genético perdido), algunos pacientes pueden presentar



áreas de hipopigmentación (líneas de Blaschko) como evidencia de mosaicismo [Rossi, et al; 2008].

Hay tres tipos de cromosomas en anillo relativamente comunes: los anillos grandes que pierden solamente las secuencias telómericas, anillos muy pequeños como cromosomas extra en el cariotipo (anillos supernumerarios), y anillos de los cromosomas X y Y, los cuales son generalmente encontrados en individuos con fenotipo de síndrome de Turner coexistiendo con una línea 45,X. La replicación de un cromosoma en anillo puede dar anillos dobles dicéntricos o cromosomas en anillo adicionales (Figura 11) [Moore, et al; 2001a /Shaffer; 2005b].

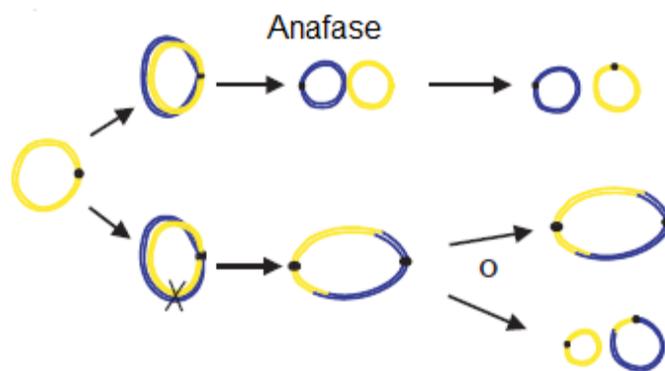


Figura 11. Replicación y segregación de un cromosoma en anillo que resulta en dos anillos (arriba) o un anillo dicéntrico y su posterior rearreglo (Modificado de: Shaffer; 2005b)

2.3.2.4 Isocromosomas

Los isocromosomas son cromosomas con brazos en “imagen de espejo”, es decir poseen dos copias de un brazo corto o de un brazo largo (Figura 9). Los isocromosomas pueden surgir de varios mecanismos, el modelo clásico de formación es la “fisión céntrica” que consiste en la división horizontal del centrómero produciendo dos isocromosomas el de brazos p y el de brazos q [Gardner, et al; 2004b]. Otros mecanismos son el intercambio entre los homólogos durante la meiosis o la ruptura y reunión de las cromátidas hermanas próximas al centrómero, en este último mecanismo se producen cromosomas isodicentricos. Estos rearreglos se distinguen de las traslocaciones sólo a nivel molecular, en las que los brazos de los isocromosomas son idénticos y derivados de un solo cromosoma y las traslocaciones son derivados de los dos cromosomas homólogos [Luthardt; et al; 2001].

Típicamente los isocromosomas se encuentran en cariotipos no balanceados, aunque se han reportado cariotipos balanceados con dos isocromosomas, (uno de brazos largos y otro de brazos cortos del mismo cromosoma) [Shaffer, 2005b]. En una persona con 46 cromosomas, un isocromosoma, resulta en una monosomía parcial y una trisomía parcial



[Luthardt; *et al*; 2001]. Los que se observan muy a menudo son los del brazo largo del cromosoma X y los de los brazos largos de los cromosomas acrocéntricos [Shaffer, 2005b].

2.3.2.5 Inversiones

Las inversiones se forman por dos rupturas en el mismo cromosoma, donde ocurre una rotación del fragmento y la posterior unión de los dos extremos, donde también existen secuencias LCR, son esencialmente formadas de la misma forma que las traslocaciones excepto que las rupturas ocurren en el mismo cromosoma [Moore, *et al*; 2001a]; hay dos tipos de inversiones (Figura 9):

- A) **Inversión pericéntrica.** Ocurre una ruptura en cada brazo del cromosoma, incluyendo al centrómero en el segmento invertido. Esto cambia los patrones de bandeo e incluso cambia la apariencia del cromosoma debido al movimiento del centrómero [Moore, *et al*; 2001a/Shaffer, 2005b].
- B) **Inversión paracéntrica.** Un cromosoma paracéntrico se forma cuando ambas rupturas ocurren en el mismo brazo y el centrómero no está incluido en el segmento invertido. Esto altera el patrón de bandeo pero no la apariencia general del cromosoma [Moore, *et al*; 2001b/ Shaffer, 2005b].

Ambas inversiones se presentan por lo general en estado heterocigoto. Los portadores de éstas, generalmente no tienen efectos fenotípicos. Aquí, como en otros rearrreglos estructurales en estado heterocigoto, es difícil el apareamiento y segregación, lo que origina errores que surgen en la primera profase meiótica durante paquiteno cuando los homólogos se aparean y recombinan. En este proceso, los segmentos invertidos forman un “asa” para maximizar el apareamiento de los homólogos. La estructura en asa de la inversión se forma después de que los cromosomas se replican por lo que el bivalente está compuesto por cuatro cromátidas, dos normales y dos invertidas. Los gametos anormales se forman sólo cuando ocurren eventos de recombinación desigual dentro de la estructura en asa. Como resultado del entrecruzamiento, las cromátidas recombinantes tienen un segmento duplicado y otro deletado (Figura 12) [Moore, *et al*; 2001a].

La principal diferencia entre las inversiones pericéntricas y paracéntricas es si implican o no la posición del centrómero en los productos de la recombinación. Las inversiones pericéntricas pueden producir recombinantes con duplicación y deficiencia de segmentos cromosómicos. La viabilidad de estos productos recombinantes es dependiente del tamaño de los segmentos desbalanceados. Los cromosomas recombinantes derivados de inversiones paracéntricas son típicamente acéntricos o dicéntricos y usualmente resultan en



productos no viables, debido a que estos cromosomas son inestables durante la división celular [Luthardt, *et al*; 2001/Moore, *et al*; 2001a].

Se han reportado inversiones en todos los cromosomas humanos, algunas inversiones se encuentran más frecuentemente que otras. La inversión más recurrente en humanos es la inversión pericéntrica asociada con la heterocromatina del cromosoma 9; alrededor de 2% de la población es portadora de la inv(9)(p11q12) y se considera un heteromorfismo cromosómico [Shaffer; 2005b].

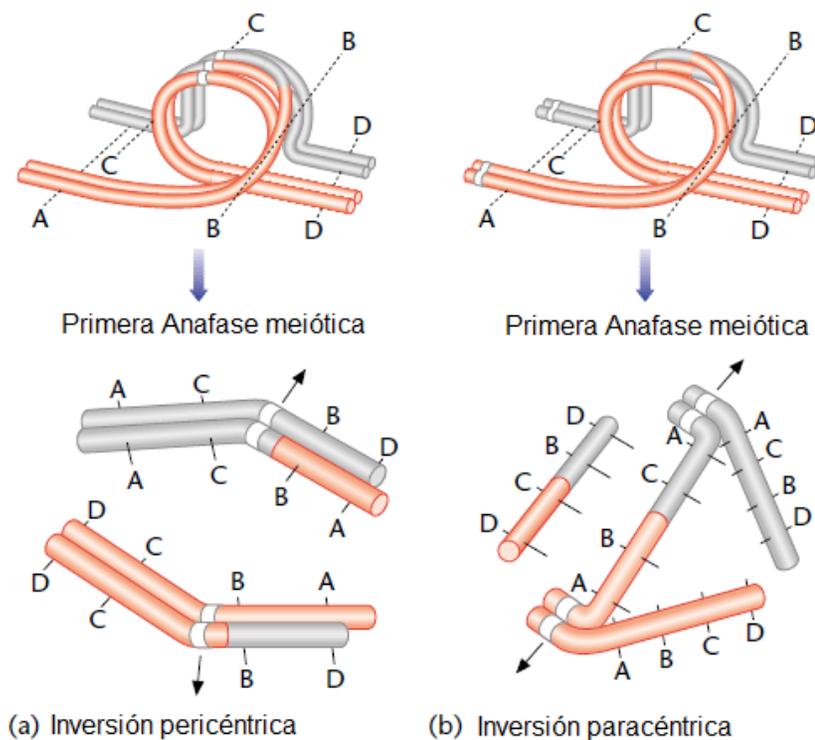


Figura 12. Apareamiento y entrecruzamiento dentro del asa formada por (a) una inversión pericéntrica y (b) una inversión paracéntrica, resultando en cromátidas anormales con duplicaciones y deleciones. Sólo dos de las cuatro cromátidas hermanas participan en el evento de entrecruzamiento (Modificado de: Moore, *et al*; 2001a)

2.3.2.6 Traslocaciones

Implican el rompimiento de dos cromosomas diferentes con intercambio de segmentos. En los humanos, hay dos tipos principales de traslocaciones: la traslocación recíproca y la traslocación Robertsoniana.

A) Traslocación recíproca

En las traslocaciones recíprocas ocurre un rompimiento en cada cromosoma, y los segmentos no centroméricos son intercambiados sin pérdida visible de cromatina. Sin embargo, los dos nuevos cromosomas derivados pueden tener una morfología muy diferente



dependiendo de los puntos de ruptura. El portador de una traslocación recíproca generalmente no tiene efectos fenotípicos debidos al rearrreglo excepto por posibles anomalías reproductivas incluyendo infertilidad, abortos espontáneos e hijos con anomalías (Figura 9) [Moore, *et al*; 2001a].

En los portadores de las traslocaciones se altera el apareamiento de los homólogos durante la meiosis, éste es tetravalente, los dos cromosomas derivados y sus dos homólogos normales se aparean y forman una “cruz” en paquíteno, con cada segmento del homólogo apareado con su contraparte. La segregación se realiza después de la replicación de DNA, por lo que cada cromosoma consiste de dos cromátidas, en cada punto de la cruz hay cuatro cromátidas [Moore, *et al*; 2001a]. Dependiendo de los puntos donde se realice la recombinación, puede haber tres patrones básicos de segregación, 2:2 de una traslocación recíproca blanceada, además de las segregaciones 3:1 y 4:0. (Figura 13):

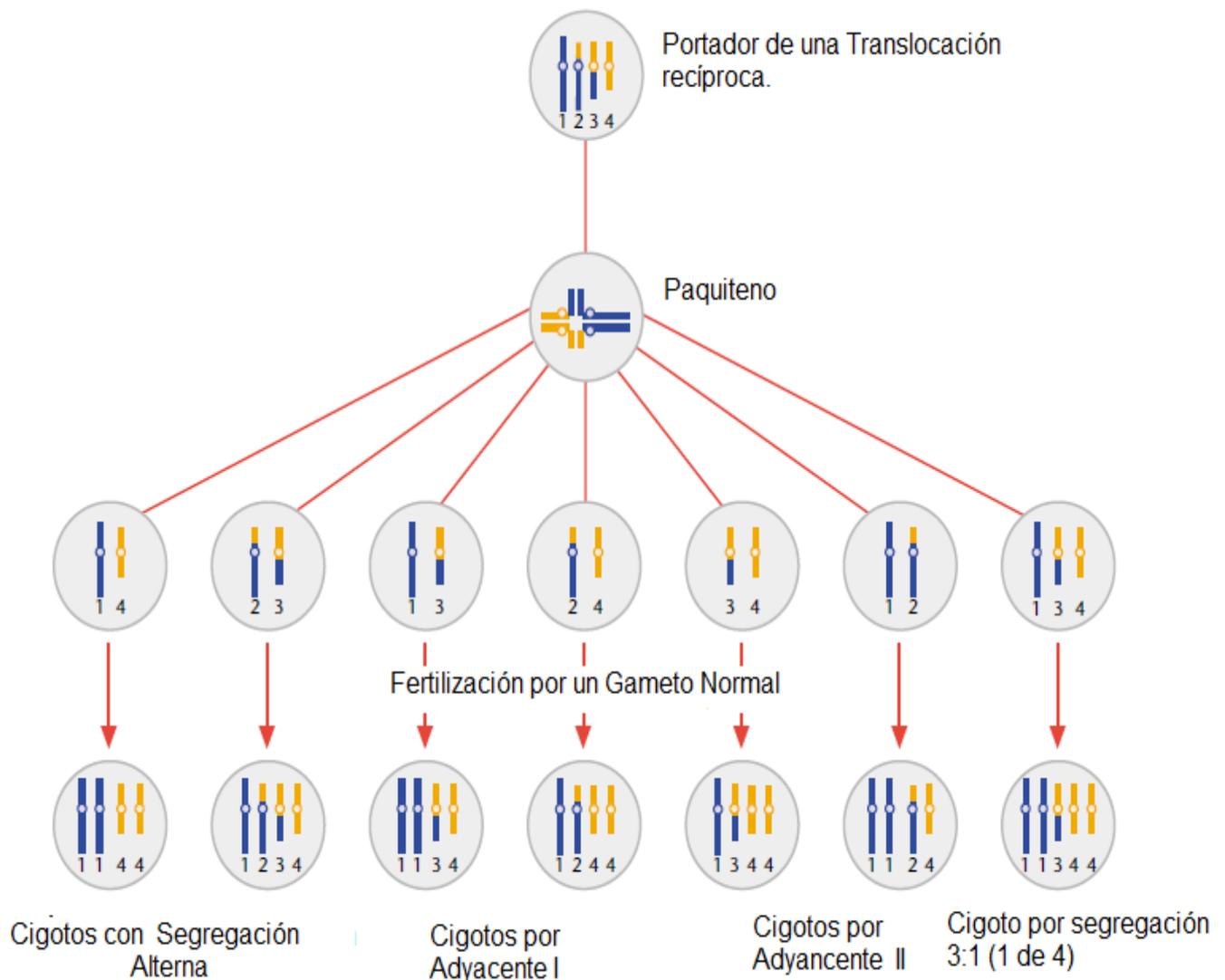


Figura 13. Segregación en una traslocación recíproca. (Modificada de Moore, *et al*; 2001a)



1. Segregación alterna: Los cromosomas normales se mueven a un polo y los cromosomas traslocados al lado opuesto, todos los gametos formados de la segregación alterna son balanceados.
2. Segregación adyacente I: Los centrómeros de los cromosomas no homólogos adyacentes se mueven hacia el mismo polo, esto resulta en un complemento cromosómico no balanceado que resultará en un cigoto con trisomía parcial de un cromosoma y monosomía parcial del otro cromosoma implicado cuando sea fertilizado por un gameto haploide normal. Este patrón de segregación es a menudo viable.
3. Segregación adyacente II: Los centrómeros de los cromosomas homólogos adyacentes se mueven al mismo polo, usualmente resulta en una gran cantidad de cromatina no balanceada, lo que es incompatible con la supervivencia del embrión.
4. Segregación 3:1: Tres de cuatro cromosomas se mueven a un polo y sólo uno se mueve al polo opuesto. Este tipo de segregación ocurre a menudo cuando uno de los cromosomas derivados es relativamente pequeño. Si es fertilizado por un gameto normal, el cigoto tendrá 47 cromosomas, a menos que el cromosoma derivado sea muy pequeño, el embrión no será viable. En la figura 13 se muestra sólo una de las cuatro posibles segregaciones 3:1 [Moore, *et al*; 2001a].
5. Segregación 4:0 En este tipo de segregación, los cromosomas homólogos también migran hacia un solo polo, pero en este caso, los dos pares involucrados migran hacia el mismo, generalmente ninguno de estos productos es viable [Gardner, *et al*; 2004b]

Las traslocaciones recíprocas ocurren en alrededor de 1 en 500 individuos en la población (tabla 3), la mayor parte de las traslocaciones recíprocas son consideradas como “únicas” debido a que éstas sólo se encuentran en miembros relacionados de una familia. Una excepción es la $t(11;22)(q23;q11.2)$, la cual es recurrente en la población [Shaffer, 2005b]. Esta traslocación es a menudo familiar, con fertilidad reducida en los hombres. Los probandos no balanceados nacen casi siempre de un portador femenino y son generalmente producto de una segregación 3:1 que incluye los cromosomas 11 y 22 normales y el derivado del 22. El riesgo de recurrencia para la traslocación no balanceada es de aproximadamente 2%. Debe enfatizarse que el riesgo de recurrencia es sustancialmente más alto si el rearrreglo de los padres fue originalmente identificado a través de un niño nacido vivo con el rearrreglo cromosómico no balanceado. En otros casos, se involucra un rearrreglo estructural *de novo* [Luthardt, *et al*; 2001].



B) Traslocación Robertsoniana

Las traslocaciones robertsonianas son intercambios entre los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos, es el único tipo de traslocación de brazo completo que resulta de una “fusión céntrica” de los brazos largos de dos cromosomas acrocéntricos con pérdida de los brazos cortos. Los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22 son acrocéntricos y todas las posibles combinaciones resultan en traslocaciones robertsonianas [Moore, *et al*; 2001a /Shaffer, 2005b].

La formación de una traslocación robertsoniana puede ser el resultado de rompimientos en los brazos cortos, en los brazos largos o entre los centrómeros de los dos cromosomas que forman el producto de fusión. Dependiendo de la posición del punto de ruptura e intercambio de los segmentos cromosómicos, el cromosoma derivado resultante puede ser monocéntrico o dicéntrico. Los cromosomas robertsonianos formados de dos brazos largos homólogos puede ser el resultado del intercambio en las cromátidas hermanas o de dos cromosomas homólogos, o pueden ser un isocromosoma (con brazos idénticos) formados por una no división del centrómero (Figura 9) [Moore, *et al*; 2001a].

El individuo portador de una traslocación robertsoniana generalmente no presenta efectos físicos hasta la reproducción. Al haber sólo tres cromosomas involucrados, se forma en paquiteno un trivalente, la segregación de éste, resulta en la producción de seis tipos de gametos (Figura 14). Dos de éstos son normales, y los otros cuatro producen trisomías o monosomías cuando son fertilizados por gametos normales. El cigoto puede ser viable dependiendo de qué cromosomas acrocéntricos estén involucrados. Las trisomías de los cromosomas 13 y 21 son viables, mientras que las trisomías de los otros acrocéntricos se perderán como abortos espontáneos. Todas las monosomías se pierden prenatalmente [Moore, *et al*; 2001a]. Este tipo de traslocaciones ocurren en 1 por cada 1000 individuos en la población general, y en alrededor de 5% de individuos con SD. Las traslocaciones entre los cromosomas 13 y 14 y entre el 14 y 21 son las más comunes y constituyen alrededor de 85% de todas las traslocaciones robertsonianas [Shaffer; 2005b]. En la tabla 8 se muestran los riesgos empíricos de productos no balanceados de los portadores de estos rearrreglos.

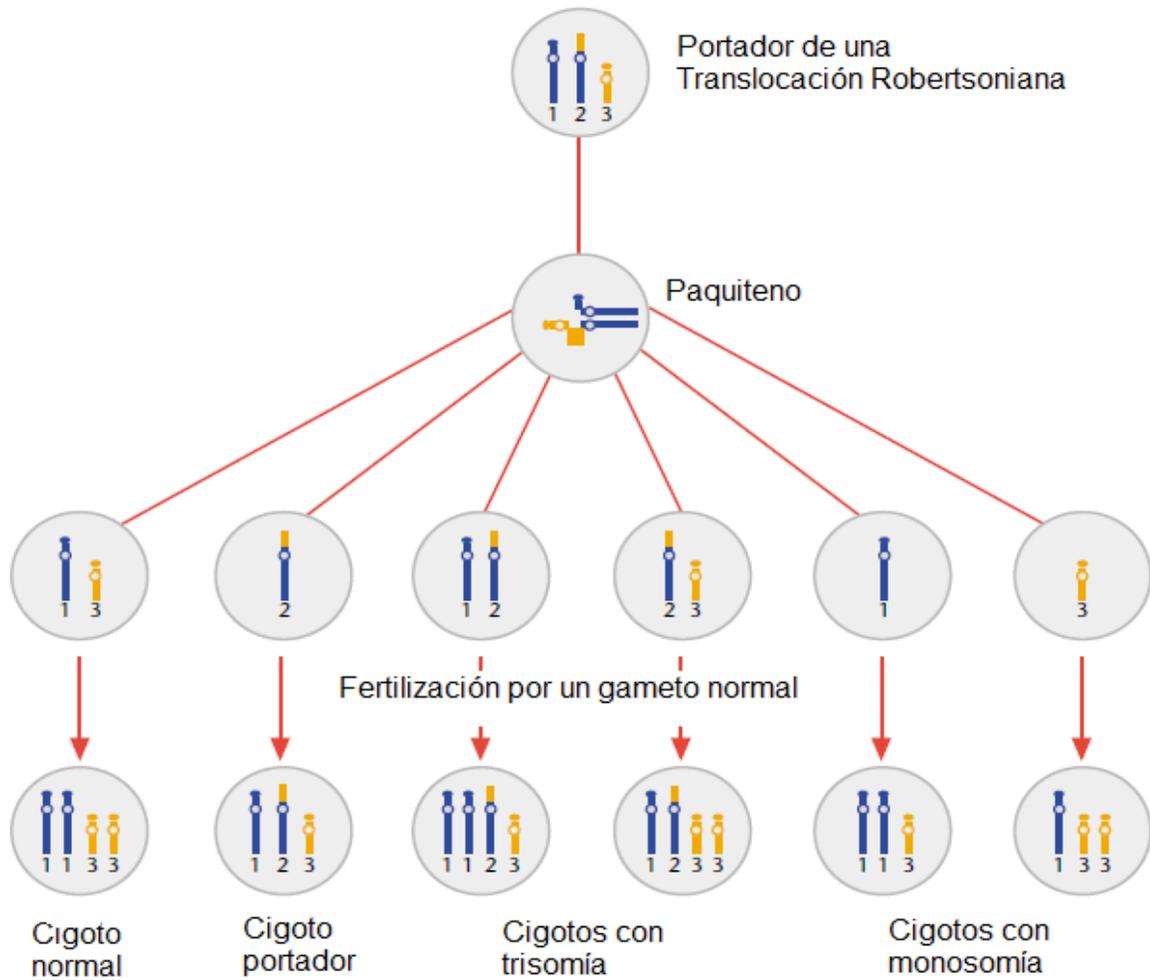


Figura 14. Segregación en un portador de una traslocación robertsoniana (Modificado de: Moore, *et al*; 2001a).

TABLA 8. RIESGO EMPÍRICO DE NACIMIENTOS DESBALANCEADOS EN PORTADORES DE REARREGLOS BALANCEADOS	
Tipo de rearreglo	Porcentaje de nacimientos desbalanceados (%)
Inversión paracéntrica	6
Traslocaciones Robertsonianas	
14/21 (femenino)	10-14
14/21 (masculino)	2-5
13/14 (ambos sexos)	1-2
21/22 (femenino)	10-15
21/22 (masculino)	1-2
21/21 (ambos sexos)	100
Traslocaciones recíprocas	
En conjunto (ambos sexos)	6-12
Investigado por un niño desbalanceado	20
Investigado por un niño desbalanceado con un segmento pequeño desbalanceado	50
Otras investigaciones	2-5
t(11;22)(q23;q11.2)	5-7
Riesgo de recurrencia t(11;22) desbalanceado	2

Modificado de: Luthardt, *et al*; 2001



2.3.2.7 Inserciones

Las inserciones ocurren cuando un segmento cromosómico es colocado dentro de otro cromosoma o en una región diferente del mismo cromosoma (Figura 9) [Shaffer; 2005b]. Una inserción es el resultado de tres rupturas, en donde ocurre un cambio no recíproco cuando el segmento de un cromosoma es insertado dentro de otro cromosoma. Las inserciones son relativamente raras ya que involucran tres rupturas. Los portadores de una inserción generalmente son clínicamente normales pero tienen un riesgo incrementado para productos con monosomía o trisomía parcial de los segmentos insertados [Luthardt, *et al*; 2001].

2.3.2.8 Cromosomas marcadores

Por definición tradicional, los cromosomas marcadores son pequeños cromosomas estructuralmente anormales de origen no identificable. Una vez que el origen del cromosoma marcador se ha identificado, el cromosoma anormal es entonces designado como derivado (der). Los cromosomas marcadores más comunes en la población son los derivados de los cromosomas 15, 22 y X [Shaffer; 2005b].

2.4 ALTERACIONES CROMOSÓMICAS RELACIONADAS CON RETRASO MENTAL

2.4.1 ALTERACIONES NUMÉRICAS

2.4.1.1 Trisomía 21, Síndrome de Down

La trisomía 21 es la anomalía cromosómica más común en nacidos vivos, con una incidencia de 1/600-800, en México la incidencia estimada de SD es de 1/650 [Atención integral de la persona con SD, SSA; 2007]. Se estima que 80% de todos los embarazos con trisomía 21 terminan en abortos espontáneos o como mortinatos, aproximadamente 2% de todos los abortos espontáneos y 1% de los mortinatos tienen trisomía 21. Mosaicos de trisomía 21 pueden ocurrir en uno de los dos padres en el menor porcentaje de los casos. Se debe esperar que tales parejas tengan un riesgo incrementado de hijos con trisomía 21, aunque las familias con trisomía 21 recurrente son raras. Hay efecto de edad materna (Tabla 6) [Robinson, *et al*; 2002]

Aproximadamente 94% de los pacientes con SD tienen trisomía 21 como resultado de una no disyunción meiótica; en alrededor de 95% de los casos el cromosoma 21 extra es de origen materno y de estos casos 80% se deben a errores durante la meiosis I. Aproximadamente 5% de los pacientes con SD tienen traslocaciones robertsonianas que involucran al cromosoma 21. El 60% de estas traslocaciones implican el brazo largo de los



cromosomas 13, 14 o 15, más frecuentemente el cromosoma 14. El riesgo de recurrencia, al igual que para las otras trisomías, es de 1%, aunque puede variar si es debido a una traslocación, como se observó en la tabla 8 y debe considerarse el efecto de la edad materna [Luthardt, *et al*; 2001].

Los individuos con trisomía 21 tienen hipotonía muscular y una apariencia facial dismórfica distinguible, con un perfil facial y occipital aplanados, fisuras palpebrales oblicuas inclinadas hacia arriba, epicanto bilateral, puente nasal deprimido, lengua de fuera, implantación baja de pabellones auriculares pequeños y redondeados, manos cortas y anchas con pliegue palmar único. Otros signos frecuentes son diástasis de rectos, clinodactilia del quinto dedo e hiperlaxitud articular. Las malformaciones viscerales están representadas principalmente por las cardíacas (conducto auriculoventricular, comunicación interventricular, comunicación intra-auricular, persistencia del conducto arterioso, etc.) que se presentan en 40% de los casos y las intestinales (estenosis duodenal, páncreas anular, atresia anal, megacolon). El retraso mental es constante. La pubertad es normal en ambos sexos. La esperanza de vida al nacimiento es de 16.2 años, y apenas 8% de los pacientes sobrevive después de los 40 años (Figura 15) [Figuera, *et al*; 2001/Robinson, *et al*; 2002]



Figura 15. Apariencia física de un individuo con Síndrome de Down, nótese la facies característica y el pliegue palmar único. (Tomado de: www.ayushveda.com/tipson/downs-syndrome)

Estos pacientes tienen un riesgo incrementado de desórdenes mieloproliferativos, incluyendo leucemia congénita. El riesgo de Alzheimer está también incrementado, se presenta más tempranamente que en la población cromosómicamente normal [Robinson, *et al*; 2002]. En la trisomía 21, durante el periodo fetal se observan algunas de las características fenotípicas que se ven en los niños, incluyendo las características faciales



(aunque usualmente menos evidentes), anomalías cardíacas (característicamente el defecto del canal atrioventricular) y la atresia duodenal. Adicionalmente, los fetos con trisomía 21 pueden presentar edema generalizado (hidrops), el mecanismo de éste no está muy claro. Muchas de estas anomalías pueden detectarse al realizarse el ultrasonido durante las semanas 17-18 de gestación [Robinson, *et al*; 2002].

El diagnóstico prenatal para SD involucra la aplicación de técnicas no invasivas, (ultrasonidos y pruebas sanguíneas) que se realizan durante los primeros meses de embarazo [Reynolds; 2006].

Los estudios de diagnóstico prenatal que se realizan en la actualidad para la detección de SD son tamiz bioquímico, ultrasonido y análisis cromosómico de células fetales. Estos estudios se realizan tanto en el primer como en el segundo trimestre del embarazo. Los estudios no invasivos se deben ofrecer a todas las mujeres embarazadas independientemente de su edad, con el fin de proporcionarles un riesgo individualizado de afectación fetal.

Es posible sospechar la presencia de una alteración cromosómica a través de marcadores bioquímicos en suero materno o marcadores ultrasonográficos sugestivos de cromosomopatía:

Primer trimestre. La cuantificación en sangre materna de la proteína plasmática asociada al embarazo (PAPP-A) y la subunidad beta de gonadotropina coriónica (β hCG) entre la semana 11 y 13 de la gestación aunada a la medición de la translucencia nucal, considerando la edad materna y las semanas de gestación, permiten estimar el riesgo de SD con una tasa de detección cercana a 85% [Atención integral de la persona con SD, SSA; 2007].

Segundo trimestre. Se utiliza para la búsqueda de alteraciones fetales y en especial para definir o modificar riesgo de aneuploidías. Es conveniente emplear el cuádruple marcador, ya que al incorporar una cuarta determinación bioquímica permite elevar la tasa de detección. Los marcadores que se emplean son: alfafetoproteína (AFP), gonadotropina coriónica humana (hCG), estriol no conjugado (uE3) e inhibina A dimérica [Atención integral de la persona con SD, SSA; 2007].

Cuando los marcadores bioquímicos en suero materno resultan alterados y existe un riesgo aumentado para aneuploidías, se debe realizar el estudio cromosómico confirmatorio durante primer o segundo trimestre mediante biopsia de vellosidades coriales o amniocentesis [Atención integral de la persona con SD, SSA; 2007].



2.4.1.2 Trisomía 18, Síndrome de Edwards

La trisomía 18 es más común en nacidos vivos que la trisomía 13, pero también es rara ya que ocurre en 1/8000 a 10000 nacidos vivos. Como con las otras trisomías autosómicas, la mayoría de las trisomías 18 termina en abortos espontáneos (95%) y, ocasionalmente, en mortinatos. Aproximadamente 1% de los abortos espontáneos y 1% de los mortinatos tienen trisomía 18 [Robinson, *et al*; 2002].

Los infantes con trisomía 18 tienen a menudo retraso en el desarrollo y deficiencia mental severa, tienen una cara pequeña con apariencia triangular, fisuras palpebrales pequeñas, orejas malformadas de implantación baja, ojos pequeños, boca y nariz con apariencia élfica, micrognatia y pueden tener retrognatia leve. Las manos se caracterizan por estar empuñadas, con el segundo y quinto dedo sobrelapados sobre el tercero y cuarto respectivamente. El pie puede presentarse en “mecedora” con talón prominente y planta redondeada. El onfalocele y los defectos en el diafragma son anormalidades comunes. Las alteraciones cardíacas (válvulas cardíacas displásicas con engrosamiento de los tejidos, comunicación interventricular, conducto arterial, comunicación intra-articular y otros) se observan en más de 95% de los casos. Las anormalidades del sistema genitourinario son frecuentes e incluyen transformación glomeruloquística. La malformación gastrointestinal más frecuente es el divertículo de Meckel, las anormalidades renales (riñón en herradura, megauréter, uréter doble) también son comunes. La criptorquidia es común en el varón mientras que en las niñas se observa hipertrofia del clítoris, útero bicorne e hipoplasia de labios mayores (Figura 16) [Figuera, *et al*; 2001/Luthardt, *et al*; 2001/Robinson, *et al*; 2002]. Alrededor de 80% son mujeres, se encuentran en proporción 4:1. La esperanza de vida es de 2 a 3 meses para el varón y de 10 meses para la niña [Figuera, *et al*; 2001/Luthardt, *et al*; 2001].

La trisomía 18 surge más frecuentemente debido a un error en la meiosis II materna (ver tabla 4), aunque pueden observarse también en la meiosis I y errores en las células somáticas. [Robinson, *et al*; 2002]. Muchas características clínicas de trisomía 18 se han reportado en pacientes con traslocaciones desbalanceadas que involucran todo o casi todo el brazo largo del cromosoma 18. Con base en datos limitados, el riesgo de recurrencia para la trisomía 18 es aproximadamente del 1% [Luthardt, *et al*; 2001].



Figura 16. Fenotipo de un niño con trisomía 18, nótese la micrognatia, los pies en mecedora y la posición de los dedos de las manos. (Modificado de Oyedeji, *et al*; 2007)

2.4.1.3 Trisomía 13, Síndrome de Patau

La trisomía 13 se presenta en aproximadamente 1/20000-25000 recién nacidos, es la menos común de las principales trisomías autosómicas y está asociada a edad materna avanzada. Representa solo 1-2% de todas las concepciones, aproximadamente 98% terminan en abortos espontáneos o mortinatos. Incluso cuando nacen vivos, la trisomía 13 es considerada una condición letal y la mayoría de los afectados muere en la infancia temprana. Cerca de 80% de las trisomías 13 se deben a una no disyunción, y la mayoría de estas (80%) resulta de un error en la meiosis materna. Alrededor de 20% de los casos resultan de traslocaciones siendo algunas de éstas heredadas. Los portadores de la traslocación robertsoniana 13/14 tienen menos de 2% de riesgo de tener hijos vivos desbalanceados con trisomía 13. La trisomía 13 en mosaico es rara y puede asociarse con menos anomalías clínicas [Robinson, *et al*; 2002 / Luthardt, *et al*; 2001].

La proporción de sexos presenta un ligero sesgo hacia las mujeres 1:1.2, las niñas y los de raza negra presentan una sobrevivencia más alta, lo que sugiere que la etnia y el género afectan la supervivencia de estos pacientes [Duarte, *et al*; 2004 / Hsu, *et al*; 2007/Vekemans; 2005].

El fenotipo de la trisomía 13 está caracterizado por una serie de anormalidades siendo las tres principales: microftalmía o anoftalmía, labio y paladar hendido y polidactilia postaxial. Pueden tener otras anormalidades cerebrales, incluyendo ausencia de cuerpo calloso y holoprosencefalia (arrinencefalia, cebocefalia y ciclocefalia). Hay anormalidades faciales como hipotelorismo y ciclopía. Las anomalías cardíacas son frecuentes, se manifiestan en 80% de los casos, y pueden incluir tronco arterioso y tetralogía de Fallot. Hay retraso en el desarrollo intrauterino en casi la mitad de todos los infantes con trisomía 13, presentan bajo



peso al nacer, deficiencia mental severa, defecto característico en cuero cabelludo, pies en bastón de alpinista, 50% de los casos presenta anomalías genitourinarias (riñones poliquísticos o duplicaciones y la anomalía digestiva más común es la malrotación del colón. En el niño se observa criptorquidia y anomalía escrotal, en las niñas puede haber útero bicorne y vagina doble (Figura 17) [Figuera, *et al*; 2001/ Hsu, *et al*; 2007/Luthardt, *et al*; 2001/Robinson, *et al*; 2002].

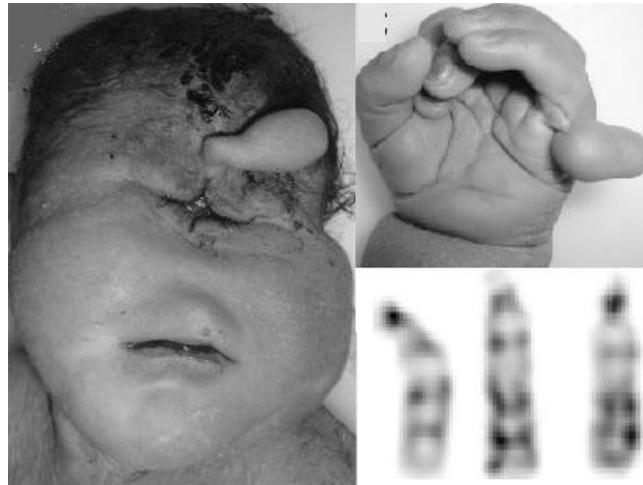


Figura 17. Fenotipo característico de la trisomía 13, obsérvese la anoftalmía y la polidactilia, también se muestra en bandas GTG los tres cromosomas 13. (Modificado de: Chan, *et al*; 2007)

2.4.2 ALTERACIONES ESTRUCTURALES

Las alteraciones estructurales (incluidos los desórdenes genómicos) más frecuentes que cursan con RM/RPM se enlistan en las siguientes tablas en orden de acuerdo al número cromosómico.

Aunque muchos de los hallazgos clínicos no son específicos, su integración en un patrón dado de alteraciones puede permitir la sospecha de un síndrome en particular. La gran mayoría de los casos representan deleciones *de novo*, siendo el cromosoma deletado frecuentemente de origen paterno. Sin embargo, se ha observado que los padres pueden ser portadores de rearrreglos crípticos como inversiones y traslocaciones [Fryns, *et al*; 2005]. Por lo que es importante realizar cariotipo a los padres para descartar que la alteración cromosómica encontrada sea de carácter hereditario.



TABLA 9. DELECCIONES QUE CURSAN CON RETRASO MENTAL

Síndrome de	Banda cromosómica	Características
del(1p36.3pter)	(1)(p36.3pter)	RM severo, hipotonía, fontanelas grandes, sordera, cardiomiopatías, hipotiroidismo ¹ . Tiene una incidencia de 1/5000 ¹ . El diagnóstico confirmatorio se realiza por FISH ² . La mayoría son <i>de novo</i> ² .
del(2q23.1)	(2)(q23.1q23.1)	Fue identificado por microarreglos de CGH en pacientes con RM severo y discapacidad en el lenguaje, el fenotipo incluye microcefalia, cara de aspecto tosco, baja estatura y epilepsia, también pueden presentar comportamiento estereotipado y patrón alterado del sueño, que puede confundirse con Síndrome de Angelman, de Rett o Smith Magenis, la haploinsuficiencia de los genes <i>MBD5</i> y <i>EPC2</i> pueden ser los responsables del fenotipo ³
del(2q37)	(2)(q37qter)	Dismorfias faciales, RD, hipotonía, obesidad, estatura baja, braquidactilia, autismo, en 25% de los casos pueden presentar epilepsia y malformaciones mayores en 30% ³ .
Wolf-Hirshhorn	del 4p Región crítica: 4p16.3 ⁴	Retraso severo en el crecimiento y mental, hipotonía, convulsiones, facies característica (en forma de yelmo griego), defectos faciales de línea media, nariz aguileña, filtrum corto, boca hacia abajo, hipertelorismo, estrabismo, puente nasal deprimido, frontal prominente, labio y paladar hendido, orejas displásicas de implantación baja, micrognatia, microcefalia, defectos cardiacos, criptorquidia, hipospadias, escoliosis, pie equinovaro, dedos hiperconvexos y defectos del tabique auricular ^{4,5} . Tiene una incidencia de 1/50000 ⁶ y en 45% de los casos se hereda de una traslocación balanceada, generalmente críptica ⁷ .
cri du chat	del 5p Región crítica: 5p15.2 ⁴	Hipotonía, llanto muy agudo parecido al de un gato, ojos separados, micrognatia, microcefalia, cara redonda, retraso mental y psicomotor severo, fisuras palpebrales de implantación baja, estrabismo, hipertelorismo, epicanto, puente nasal amplio, micrognatia, pabellones auriculares pobremente formados. El fenotipo tiende a variar con la edad ⁷ , en la edad adulta, cara larga, macrostomia, escoliosis y problemas de comportamiento ^{4,5} . Tiene una incidencia de 1/15000-1/50000 ⁶ , cerca de 90% de las deleciones son de novo ⁴ y en 80-90% de los casos el cromosoma implicado es el paterno ⁸ .
del(6)(q25qter)	(6)(q25qter)	Baja estatura, hipotonía, microcefalia, atrofia cerebral con hidrocefalia, convulsiones, estrabismo, anomalidades en retina, epicanto, nariz prominente y en punta, filtrum largo, labio paladar hendido, anomalidades en las orejas, micrognatia, cuello corto, criptorquidia, hipoplasia genital, defectos cardiacos congénitos ⁵ .
Williams	(7)(q11.2q11.2)	Tienen un defecto cardiaco particular (estenosis supra valvular aórtica), un patrón específico de anomalías faciales menores y comportamiento característico. Además de la estenosis supra valvular, también pueden ocurrir la estenosis valvular pulmonaria y el defecto septal atrial. La facies se caracteriza por una región periorbital llena, mejillas y labios, (con labio inferior invertido), iris azulado con un patrón estelar y una nariz corta y hacia arriba. Hay retraso en el crecimiento y retraso mental moderado. La voz es ronca y profunda. Los pacientes tienden a tener desórdenes de personalidad, se acercan fácilmente a los extraños, son elocuentes y tienen un coeficiente social marcadamente más alto que el coeficiente intelectual ^{4,9} . Tiene una incidencia de 1/20000 ⁹ . El 96% de los pacientes tienen el gen de la elastina (<i>ELN</i>) deletado, el cual produce una proteína necesaria para la elasticidad de los vasos sanguíneos, piel y otros órganos. La deleción de novo es de origen materno en 61% de los casos, y 39% de origen paterno ⁶ .
del(8)(p23.1pter)	(8)(p23.1pter)	Alteraciones en el comportamiento durante la infancia. Tienen cambios extremos de comportamiento sin agresividad, que mejora en la adolescencia, cursa con defectos cardiacos debido a la deleción del gen <i>GATA4</i> ³ .



TABLA 9. DELECCIONES QUE CURSAN CON RETRASO MENTAL

Síndrome de	Banda cromosómica	Características
Langer-Giedion	(8)(q24.11q24.13)	Microcefalia, cabello escaso, nariz bulbosa, baja estatura, múltiple crecimiento cartilaginoso sobre la superficie del hueso ^{6,9} . Esta última condición es debida a la delección del gen del síndrome trico-rino-falángico tipo 1, un gen de control de crecimiento del hueso (<i>EXT1</i>) ³ .
del(9)(p22pter)	(9)(p22pter)	Trigonocefalia, occipucio plano, cejas altas arqueadas, ojos prominentes, epicanto, fisuras palpebrales oblicuas, puente nasal deprimido, nariz corta, filtrum largo, boca pequeña, orejas pobremente formadas, hernias, hipogenitalismo. 2/3 de las delecciones son <i>de novo</i> ⁵ .
Di George II	(10)(p13p13)	Hipoparatiroidismo, problemas cardiacos, inmunodeficiencias de células T y dismorfias faciales ⁴ , adicionalmente los afectados tienen ptosis, pérdida de audición y alteraciones renales ⁵ . Se han encontrado mutaciones en <i>GATA3</i> que correlacionan con este síndrome ¹⁰ .
del(10)(q25qter)	(10)(q25qter)	Retraso en el crecimiento, microcefalia, cara triangular, estrabismo, hipertelorismo, puente nasal prominente, orejas displásicas de implantación baja, defectos cardiacos, criptorquidia, anomalías anogenitales, defectos en manos y pies, comportamiento anormal e hiperactividad ⁶ .
Potocki-Shaffer	(11)(p12p12)	Exóstosis, <i>foramina parietalia</i> ⁴ .
WAGR	(11)(p13p13)	Tumor de Wilms , Aniridia, defectos Genitales y Retraso Mental . La haploinsuficiencia de <i>PAX6</i> causa aniridia, y la de <i>WT1</i> tumor de Wilms ³
Jacobsen	(11)(q23qter)	Retraso en crecimiento, trigonocefalia, blefaroptosis, estrabismo, hipertelorismo, epicanto, puente nasal deprimido, boca en forma de carpa, micrognatia, displasia de pabellones auriculares, anomalías digitales, defectos cardiacos. El 90% son delecciones <i>de novo</i> debido a la presencia de un sitio frágil raro ⁵ .
del(13q14qter)	(13q14qter)	Retraso en el crecimiento, micro/trigonocefalia, ptosis, microftalmia, coloboma, retinoblastoma, hipertelorismo, epicanto, puente nasal prominente, micrognatia, pabellones auriculares prominentes de implantación baja, cuello corto, pulgares pequeños o ausentes, clinodactilia, primer orjejo de los pies grandes, hipospadias, criptorquidia, ano imperforado, defectos cardiacos, holoprosencefalia ⁵ .
15q13.3	(15)(q13.3q13.3)	Esta delección tiene una incidencia de 0.3% en pacientes con RM "idiopático", el RM es de medio a moderado, se ha asociado a autismo, esquizofrenia y otros desórdenes psiquiatricos, tienen epilepsia y los EEG son anormales. Los pacientes presentan hipertelorismo, fisuras palpebrales oblicuas ascendentes y filtrum prominente ³ .
α-talasemia y retraso mental	(16)(p13.3pter)	Además de los indicados en el nombre, los pacientes tienen esclerosis tuberosa y enfermedad de los riñones poliquísticos. Las delecciones pequeñas de 2.7 a 268Kb solo tienen alfa talasemia ³ .
Rubistein-Taybi	(16)(p13.3pter)	La delección de este síndrome es más proximal que la mencionada anteriormente, tienen facies y pulgares característicos, una décima parte de los casos corresponde a la delección del gen <i>CBP</i> , lo que lleva a una desregulación generalizada de la expresión de varios genes involucrados en la embriogénesis ² .
16p11.2	(16)(p11.2p11.2)	Esta delección también está asociada con autismo, el fenotipo es variable, tienen un severo impedimento cognitivo, anomalidades congénitas menores, la facies es plana, ojos hundidos, implantación baja de las orejas, los labios son delgados. Las infecciones en el oído son frecuentes al igual que los defectos cardiacos, los pacientes pueden presentar dislexia ³ .



TABLA 9. DELECCIONES QUE CURSAN CON RETRASO MENTAL

Síndrome de	Banda cromosómica	Características
Miller-Diecker y lisencefalia aislada	(17)(p13.3p13.3)	La delección del gen <i>LIS1</i> produce lisencefalia causando un retraso mental profundo con ataques intratables, y está asociado con anomalías menores variables causadas por la delección del gen <i>MDCR</i> (98%) y genes contiguos, las dismorfias faciales como hipertelorismo, nariz y mandíbula cortas, polidactilia, retraso en el crecimiento pre y postnatal, y a menudo la muerte postnatal temprana ^{8,10} . Una delección es observada en cerca del 50% de los pacientes con Síndrome de Miller-Diecker. El análisis por FISH identifica una microdelección en el 90% de todos los pacientes empleando como sonda LIS1, en pocos casos el rearrreglo no incluye este gen ² .
Smith Magenis	(17)(p11.2p11.2)	Dismorfias y su comportamiento es malhumorado, tienen alteraciones del sueño, disminución de la sensibilidad al dolor, tienden a la automutilación y pueden desarrollar onicotilomanía. Más de 90% de los pacientes tienen una delección de 3.7Mb ² . La cara se caracteriza por una hipoplasia unilateral, ojos profundos con fisuras palpebrales oblicuas hacia abajo con epicanto e hipertelorismo, filtrum corto, los dedos de las manos son cortos y anchos y la voz es ronca ⁹ . Tiene una incidencia de 1/25000 ^{4,12} .
17q21.31	(17)(q21.31q21.31)	RPM severo, asociado a hipotonía, una cara larga, fisuras palpebrales hacia arriba, frente ancha, orejas antevertidas y grandes, una nariz tubular, dedos largos, voz nasal, criptorquidea, epilepsia, pectus excavatum, defectos cardiacos y anomalías en el riñón. Tiene una prevalencia de 1 en 16000 ³ .
del(18)(p)	(18)(p)	Retraso en el crecimiento, hipotonía, microcefalia, cara redonda, ptosis, epicanto, estrabismo, puente nasal bajo, hipertelorismo, boca amplia y hacia abajo, caries dental, orejas sobresalientes, <i>pectus excavatum</i> , anomalías en genitales, manos y pies anormales, holoprosencefalia, son inquietos y 2/3 de las delecciones son <i>de novo</i> ⁵ .
del(18)(q21qter)	(18)(q21qter)	Retraso en el crecimiento y mental, hipotonía, convulsiones, microcefalia, hipoplasia media facial, ojos hundidos, boca en forma de carpa, paladar estrecho, sordera, manos largas, dedos afilados, implantación anormal de dedos de los pies, hipogonadismo, hoyuelos en la piel, defectos cardiacos, comportamiento autista ⁵ .
Velocardiofacial	(22)(q11.2q11.2)	Tiene una incidencia de 1/3000-5000 ^{2,6,9} y se estima que en 5-10% de los casos la delección es heredada, siendo el resto delecciones <i>de novo</i> . Este síndrome representa diferentes aspectos de un gran espectro variable que no puede ser claramente diferenciado uno de cada uno. Los principales hallazgos son defectos cardiacos, especialmente la interrupción aórtica y la atresia pulmonar con tetralogía o pentalogía de Fallot. Un hallazgo clínico importante es un velo palatino que conlleva a un habla hipernasal, con o sin paladar hendido abierto o submucoso. Los afectados tienen nariz bulbosa, orejas prominentes y dismórficas, y dedos de manos y pies largos. Alrededor de un tercio de los adolescentes y adultos desarrollan esquizofrenia. Se ha propuesto el acrónimo inglés CATCH 22 para tratar de describir los signos más frecuentes (defectos Cardiacos, Anomalías faciales, hipoplasia de Timo, paladar hendido e Hipocalcemia) Las delecciones se ven por citogenética convencional en 30% de los casos, y en 90% se encuentra deletado el gen <i>HIRA</i> , lo cual se corrobora por FISH ^{1,2, 3,4,6,9}
del(22)(q13)	del(22)(q13qter)	Inexpresivos, alta tolerancia al dolor, ligeras dismorfias ¹ .

Referencias:

1. Feenstra, *et al*;2006, 2. Gardner, *et al*;2004d, 3. Galasso, *et al*; 2010, 4. Moore; 2001a, 5. Fryns, *et al*; 2005, 6. Luthardt, *et al*; 2001, 7. Aviña, *et al*; 2008, 8. Cerruti; 2006, 9. Schinzel, *et al*; 2005, 10. Daw, *et al*; 1996, 11. Fukami, *et al*; 2011, 12. Elsea, *et al*; 2009, 13. Moreno, *et al*; 2009.



TABLA 10. DUPLICACIONES QUE CURSAN CON RETRASO MENTAL

Síndrome de	Banda cromosómica	Características
7q11.3	(7)(q11.3q11.3)	El RM es de medio a severo, retraso en el lenguaje, filtrum corto, labios delgados, cejas gruesas, defectos cardiacos, hernia diafragmática, criptorquidismo, y ligeras habilidades espacio-visuales, pueden llegar a tener un comportamiento autista ^{1,2}
invdup(8)(p23)	(8)(p23)	La duplicación es derivada de una inversion en el cromosoma 8 materno, esta inversión esta presente en 26% de la población europea ² .
Retraso y Autismo sin dismorfias	(15)(q11q13)	Impedimento intelectual moderado o severo, algunos desarrollan autismo ³
Sobrecrecimiento y discapacidad intelectual	(15)(q26qter)	Hay un sobrecrecimiento asociado al gen <i>IGFR1</i> , macrocefalia, y discapacidad intelectual ³ .
invdup(15)	(15)(q?)	Es el más común de los cromosomas marcadores supernumerarios, esta en 40% de todos los casos. Los individuos tienen retraso mental, convulsiones, comportamiento autista, dermatoglifos anormales y estrabismo, este tipo marcadores se han observado en pacientes con Síndrome de Prader Willi y Angelman ²
dup17p11	(17)(p11.2p11.2)	Facies normal y retraso mental moderado, hiperactividad, déficit de atención ³
Ojo de Gato	(22)(q11.2q11.2)	Defectos en los ojos, manchas en piel, frente y orejas, ausencia de orificio anal, características faciales, anormalidades renales, esqueléticas y genitales, retraso mental ⁴ . El síndrome de Ojo de Gato resulta de la duplicación de las porciones próximas del brazo largo del cromosoma 22. El más común de esta duplicación es un cromosoma 22 supernumerario dicéntrico y bisatelitado designado como una inv dup(22)(q11.2), Este proceso de duplicación invertida requiere un rompimiento en 22q11.2 en cada una de las dos cromátidas hermanas o no hermanas y produce un cromosoma que contienen dos copias de la región crítica para el síndrome del ojo de gato (CESCR) o un total de cuatro copias para el paciente. Estos pacientes típicamente tienen 47 cromosomas debido a la presencia del supernumerario ²
Microduplicación de 22q11	(22)(q11)	Defectos cardiacos, insuficiencia velofaríngea con o sin paladar hendido, habla hipernasal, anomalías urogenitales, desórdenes neurológicos incluyendo retraso en el lenguaje, retraso mental, impedimentos motores, ansiedad, y depresión ^{1,2} .

Referencias:

1. Galasso, et al; 2010, 2. Emanuel, et al; 2007, 3. Gardner, et al;2004d, 4. Luthardt , et al; 2001



TABLA 11. SÍNDROMES ASOCIADOS A DUP (DISOMÍA UNIPARENTAL) E IMPRONTA

Síndrome de	Banda cromosómica	Características
Silver Russell	7(p12p14) 11(p15)	Es una condición clínicamente heterogénea caracterizada por severo retraso en el crecimiento intrauterino, pobre crecimiento postnatal, características craneofaciales tales como cara triangular y frente amplia, asimetría de cuerpo y malformaciones menores ^{1,2} . Las alteraciones genéticas y epigenéticas se pueden detectar en aproximadamente el 50% de los pacientes con fenotipo típico de síndrome de Silver Russel ² . La frecuencia de estas alteraciones son: Mutaciones en la región improntada 11p15 40% ² DUP (7) materna 10% ² DUP 11p15 materna 1-2% ² Alteraciones cromosómicas que involucran al cromosoma 7 o al 11 1% ²
Beckwith Wiedemann	11(p15)	Es un desorden de sobrecrecimiento involucrando una predisposición a desarrollo de tumores. Los datos clínicos son altamente variables, se presenta frecuentemente onfalocele, macroglosia, hemihipertrofia, gigantismo y visceromegalia. El 30-50% de los casos presenta hipoglucemia ³ la cuál si no se trata a tiempo lleva a RM ³ . La etiología de este síndrome se debe a alteraciones genéticas y epigenéticas que desregulan los genes improntados del cromosoma 15p15.5 y se ha asociado el incremento en la frecuencia con las técnicas de reproducción asistida. La frecuencia de alteraciones genéticas y epigenéticas son las siguientes ³ : Hipermetilación en el centro de la impronta H19 2-7% DUP paterna 20% Alteraciones cromosómicas <2% Mutaciones en CDKN1C 10% Hipometilación en KvDMR 50% Desconocido 13-15% ³
Prader Willi	15(q11q13)	Pérdida de la actividad fetal, peso al nacimiento moderadamente reducido, hipotonía severa postnatal, causando inhabilidad para succionar y tragar durante el periodo postnatal temprano, genitales masculinos hipoplásicos, miembros distales pequeños y delicados y comienzo temprano de obesidad debido al hambre insaciable y permanente y una excesiva ingesta de alimentos. Se piensa que esto se debe a la disfunción del hipotálamo. A menudo se desarrolla diabetes e insuficiencia cardíaca durante la adolescencia y la edad adulta. Estos pacientes a menudo tienen mal humor, disturbios severos de comportamiento y hay pérdida de pigmentación ^{4,5} . 75% por Delección Paterna ¹ 25% DUP materna ¹ 1% Mutaciones en el Centro de Impronta ¹
Angelman	15(q11q13)	RM profundo con ataques de difícil control, microcefalia, y una actitud feliz con arranques de risa sin motivo. Su andar es atáxico. Los pacientes son pequeños, con microcefalia y muestran una boca grande con labio superior delgado, frente baja, ojos profundos e hipoplasia maxilar ^{4,5} . 60-70% por Delección Materna ¹ 5% por DUP Paterna ¹ 2-4% por Mutaciones en el Centro de Impronta ¹ 10-15% Mutaciones en UBE3A ¹

Referencias:1. Gardner, *et al*;2004e, 2. Eggermann, *et al*; 2010, 3. . Weksberg, *et al*; 2010, 4. Luthardt , *et al*; 2001, 5. Schinzel, *et al*; 2005



2.5 TÉCNICAS DE CITOGENÉTICA CONVENCIONAL

El cariotipo convencional ha sido durante años la única herramienta para abordar las causas genéticas del retraso mental o del desarrollo, además, permite realizar un rastreo del genoma completo, pero está limitado a la detección de anomalías superiores a 3-5 Mb. Dependiendo de la resolución obtenida, la frecuencia de anomalías cromosómicas detectadas puede variar entre 9 y 36% [González, *et al*; 2008].

La citogenética convencional usa el microscopio de luz para examinar cromosomas en metafase o prometáfase, los cuales están teñidos o tienen un patrón de bandeo característico para cada cromosoma. Para hacer este estudio se requieren células en división, las muestras más empleadas son leucocitos de sangre periférica, médula ósea, amniocitos y fibroblastos [Sharkey, *et al*; 2005]. La técnica de cultivo, cosecha y preparación de cromosomas es la base de todas las demás técnicas citogenéticas. Los cromosomas pueden cosecharse de células en tejidos directamente sin cultivo o después de crecerlas en un cultivo celular. La cosecha de cromosomas involucra generalmente un bloqueador de la división, seguido de un tratamiento con solución hipotónica y fijación. Después de la fijación, los cromosomas se expanden sobre una laminilla de vidrio y se secan al aire. La calidad de las preparaciones cromosómicas es crucial para el análisis posterior de la estructura cromosómica por bandeo o técnicas de hibridación. Estas preparaciones pueden ser tratadas por varios químicos para generar distintos patrones de bandeo. Cada banda se designa con un número específico que representa su ubicación sobre los cromosomas. El análisis del patrón de bandeo constituye el aspecto más importante para los citogenetistas y requiere de entrenamiento y experiencia [Hsieh; 2001].

Desarrolladas en los setenta, las bandas GTG y otras técnicas de bandeo de cromosomas permiten la identificación de bandas claras y oscuras en cada cromosoma para la detección de aneuploidía, y la identificación de aberraciones estructurales microscópicamente aparentes, incluyendo deleciones y traslocaciones. El nivel de resolución de las bandas GTG de rutina está en el intervalo de 400-550 bandas por juego haploide, sin embargo, para pacientes con RM o RD, deben realizarse con niveles de bandas superiores a 550 [Shaffer; 2005b].

Existen métodos para generar bandas a lo largo de los cromosomas que representan el arreglo de las secuencias individuales de cada par cromosómico (bandas Q (Quinacrina), G (Giemsa), R (Reversa)), y métodos para observar regiones específicas de los cromosomas (bandas C (Centrómero), bandas NOR). Las bandas que muestran una tinción fuerte se les denomina bandas positivas, y las que están pobremente teñidas son bandas negativas



[Bickmore; 2001]. A continuación, se describen brevemente las técnicas citogenéticas más empleadas y su aplicación.

2.5.1 Bandas Q

A finales de los sesenta Caspersson postuló que las diferencias en la composición de los nucleótidos del DNA podían producir diferentes patrones de intensidad a lo largo de todo el cromosoma cuando eran teñidos con un colorante fluorescente. Este bandeo fue demostrado en cromosomas de plantas en 1968 usando mostaza de quinacrina y en 1971 se reportó el patrón de bandeo con quinacrina (Q) en cromosomas humanos. Las regiones del genoma en donde los nucleótidos de adenina y timina son abundantes producen una intensa fluorescencia, mientras que las regiones ricas en guanina y citosina fluorescen ligeramente. De manera importante, pueden identificarse por primera vez, inequívocamente los 24 cromosomas, el brazo largo del cromosoma Y tiene una fluorescencia particular, y es usualmente visible en núcleos y espermias como un cuerpo Y fluorescente. El bandeo con quinacrina (bandas QFQ) es relativamente simple, aunque requiere de un microscopio de fluorescencia. Otros colorantes fluorescentes producen patrones similares a los de la quinacrina, incluyendo el Hoescht 33258 (bandas QFH), DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol) y di-imidazolino-fenil-indol (DIPI). Se pueden sobreteñir los cromosomas con un segundo colorante como distamicina A o actinomicina D, o la simple manipulación del pH para potenciar la presencia de las bandas Q más claras [Moore, *et al*; 2001b / Miller, *et al*; 2001a]

2.5.2 Bandas G

Este segundo método consiste en la utilización del colorante Giemsa después de varios tratamientos químicos y/o enzimáticos de las preparaciones cromosómicas. Este método ofrece la ventaja de producir laminillas permanentes que pueden estudiarse bajo un microscopio de luz, lo que lo hace más accesible. El patrón de tinción en las bandas G es similar al de las bandas Q. Las bandas G son producidas por el pretatamiento de los cromosomas con tripsina antes de teñir con Giemsa (bandas GTG). Otros colorantes como el Wright y el Leishman pueden usarse en presencia del Giemsa para producir un patrón idéntico al obtenido con Giemsa (bandas GTW y GTL respectivamente), pero con un ligero contraste entre las bandas. Las bandas que son oscuras generalmente corresponden a regiones del genoma de replicación tardía. Estas bandas tienden a contener pocos genes activos y son ricas en AT. Las bandas



claras corresponden generalmente a regiones de replicación temprana y son ricas en genes y tienen un alto contenido de GC [Moore, *et al*; 2001b/ Spurbeck, *et al*; 2004]

2.5.3 Bandas R

Es un patrón de bandas aproximadamente opuesto a las bandas G o Q y es referido como un bandeo reverso (R). Los patrones de bandas R fluorescentes son producidos por colorantes con afinidad por las bases GC como la cromomicina A3, olivomicina y mitramicina. Estos patrones a menudo pueden ser potenciados por sobretinción con un segundo colorante como la distamicina A, actinomicina D o netropsina. Las bandas R se producen al tratar las laminillas a altas temperaturas por varios minutos seguidas de la tinción con Giemsa (bandas RHG) o Naranja de Acridina (bandas RFA). Las bandas R tienen la ventaja de teñir las regiones de eucromatina ricas en genes, esto permite la visualización de pequeños rearrreglos estructurales que resultan frecuentemente en anomalías fenotípicas [Moore, *et al*; 2001b].

2.5.4 Bandas C

Los centrómeros de los cromosomas están compuestos de heterocromatina constitutiva, replican tardíamente en el ciclo celular y exhiben características especiales de estabilidad bajo condiciones extremas de calor y exposición química. Utilizando estas propiedades se puede producir un patrón de bandeo único (bandas C) en el que la heterocromatina constitutiva se tiñe intensamente y el resto de la cromatina permanece tenue. Las bandas C se producen por el tratamiento de la cromatina con soluciones ácidas y básicas seguidas por la tinción con Giemsa. Estas bandas se limitan a la identificación de pequeños cromosomas marcadores de origen desconocido y para el estudio de polimorfismos cromosómicos en la población como los brazos cortos y satélites de los cromosomas acrocéntricos, heterocromatina pericéntrica de los cromosomas 1,9, 16 y el brazo largo del cromosoma Y, así como para el reconocimiento de cromosomas dicéntricos y pseudodicéntricos [(Moore, *et al*; 2001b)].

Un método común involucra el tratamiento de las laminillas con ácido clorhídrico, hidróxido de bario y solución salina a altas temperaturas seguido de tinción de los cromosomas con Giemsa (bandas CBG). Otro método involucra la tinción de los cromosomas con colorantes fluorescentes como la distamicina A y el cloruro de 4',6-diamidino-2-fenilindol [Spurbeck, *et al*; 2004]



2.5.5 Bando de alta resolución

El bando de alta resolución fue diseñado para permitir un análisis más detallado de las bandas cromosómicas a través de todo el cariotipo. El número de bandas identificables está relacionado al grado de condensación de los cromosomas, del tipo de célula y el método de bando. El grado de dificultad del análisis del cariotipo está directamente relacionado al número de bandas que pueden identificarse, la alta resolución permite tener preparación de más de 1000 bandas por juego haploide de cromosomas [Moore, *et al*; 2001b/Shaffer; 2005b].

Este tipo de técnica puede realizarse por varios métodos, las células deben fijarse en profase o en metafase temprana donde la cromatina está mínimamente condensada y tiene una resolución máxima. La sincronización de cultivos celulares seguidos por una corta exposición a colcemida produce preparaciones celulares con un grado muy bajo de condensación cromosómica dando un alto nivel de resolución de bandas. Resultados similares se obtienen usando una variedad de aditivos al cultivo que se intercalan dentro de la molécula de DNA, inhibiendo la condensación cromosómica en el proceso, el bromuro de etidio, la naranja de acridina y la actinomicina D se usan frecuentemente de esta manera. Un tercer método se basa en la utilización de análogos de base, como BrdU, que actúan sobre las bandas de replicación temprana, este método llamado “bando de replicación” produce preparaciones cromosómicas de un nivel más alto como 1400 bandas por genoma haploide [Moore, *et al*; 2001b].

Estas técnicas son muy sensibles a la identificación de rearrreglos subteloméricos, pero se reservan generalmente para su uso en casos clínicos con una sospecha alta de anomalías subteloméricas. A menudo, un fenotipo clínico (como los desórdenes genómicos) sugiere áreas específicas del cariotipo que pueden estudiarse a detalle en el bando de alta resolución [Moore, *et al*; 2001b/ Shaffer; 2005b].

2.5.6 Otras técnicas especiales

Una variedad de técnicas especiales han sido descritas, como las que tiñen diferencialmente los telómeros (bandas T), la región pericentromérica del cromosoma 9 (bandas G-11), el brazo corto del cromosoma 15 (bando con distamicina A/DAPI), regiones organizadoras nucleolares activas (NOR o tinción con plata). Cada uno de estos métodos tiene una aplicación muy estrecha y puede identificarnos una variedad de anomalías citogenéticas y polimorfismos. Sin embargo, muchos de estos métodos han sido desplazados en la citogenética clínica por métodos de citogenética molecular, los cuales permiten una identificación concluyente de muchas regiones del genoma [Moore, *et al*; 2001b].



2.6 TÉCNICAS DE CITOGENÉTICA MOLECULAR

2.6.1 Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH)

El análisis cromosómico de rutina puede resultar aparentemente normal, los rearrreglos crípticos son tan pequeños que no pueden ser detectados por bandas GTG debido principalmente a que son regiones claras y sólo pueden ser identificadas usando sondas fluorescentes específicas de DNA genómico [Raymond; 2004/ Sharkey, et al; 2005]

La técnica de FISH es un proceso en donde segmentos de los cromosomas están marcados con moléculas fluorescentes que se alinean a regiones específicas (Figura 18). Esta técnica se ha usado ampliamente en el mapeo de genes, para la identificación de anomalías cromosómicas y la identificación del origen de marcadores. Se utilizan tres tipos de sondas: las de genes específicos, de secuencia repetitiva y las de tinción completa de cromosomas (WCP) [Salman, *et al*; 2004].

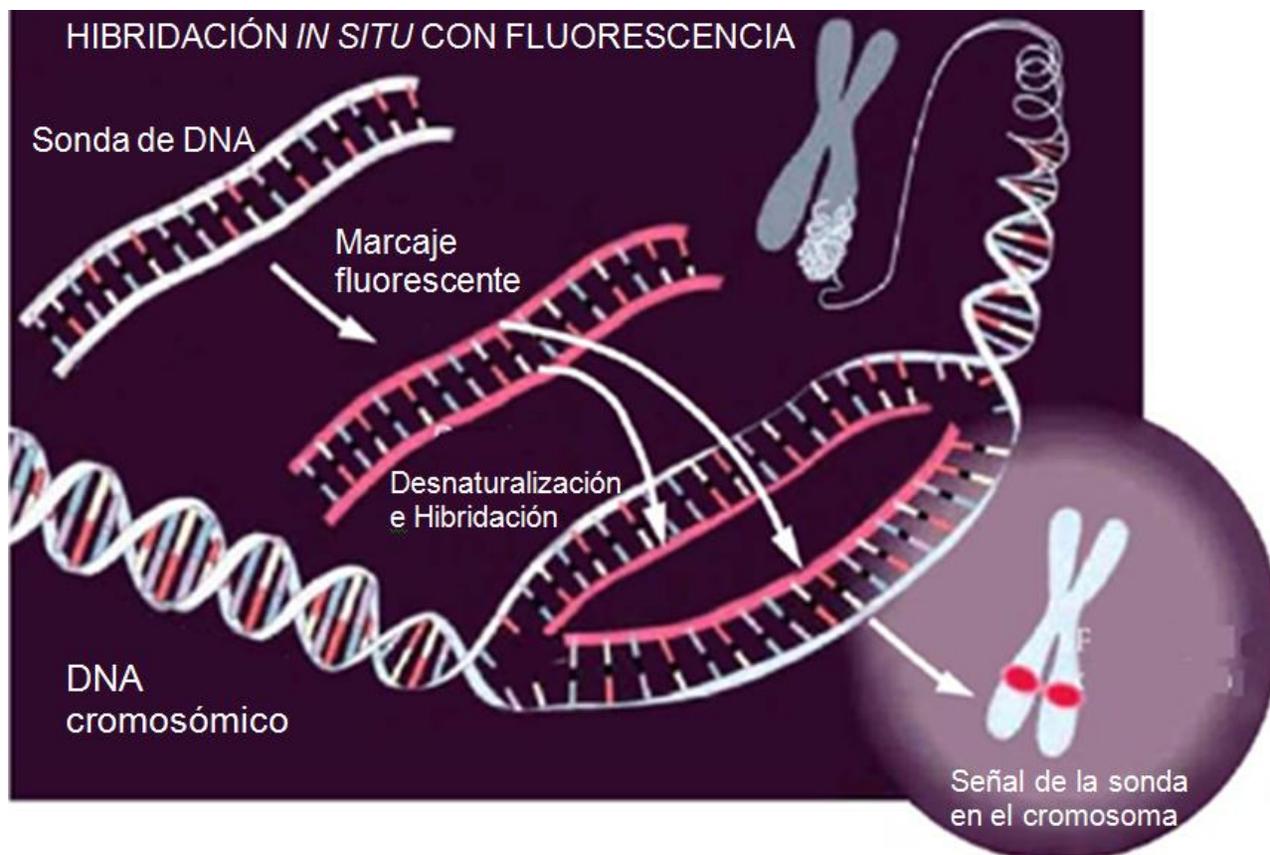


Figura 18. En la Hibridación *in situ* con fluorescencia el DNA cromosómico se encuentra en las metafases de las laminillas de vidrio y la sonda de DNA se adhiere por hibridación. Después de los pasos de lavado para remover la sonda que no hibridó, se coloca un colorante de contratinción (DAPI) y las laminillas se estudian bajo el microscopio de fluorescencia (Modificada de Smeets; 2004)



2.6.1.1 Sondas de secuencia repetitiva

Estas sondas se unen a regiones cromosómicas que están representadas por secuencias de pares de bases presentes en múltiples copias, como los centrómeros y telómeros. Las sondas centroméricas son usadas frecuentemente para el estudio de cromosomas marcadores y para detectar anomalías cromosómicas numéricas en núcleos en interfase. Las sondas teloméricas se usan frecuentemente para identificar traslocaciones cromosómicas que involucran estas regiones [Salman, et al; 2004].

2.6.1.1.1 Sondas para centrómeros de cromosomas específicos

Aunque muchas regiones centroméricas de cromosomas humanos consisten de DNA α -satélite altamente repetitivo, existen secuencias específicas únicas de DNA α -satélite para muchos cromosomas. Este tipo de sondas hibridan sobre centrómeros de cromosomas específicos. En muchos casos los centrómeros de los cromosomas 13 no pueden distinguirse de los centrómeros de los cromosomas 21, y los del par 14 de los centrómeros del 22, debido a la alta homología en sus secuencias. Estas sondas pueden usarse para detectar anomalías numéricas, verificando la presencia del centrómero en el cromosoma anormal y también sirven como control interno en otros ensayos de FISH [Spurbeck, *et al*; 2004].

2.6.1.2 Sondas de genes específicos

Estas sondas son de secuencias de DNA presentes en una sola copia por cromosoma. Se usan para identificar traslocaciones cromosómicas, inversiones, duplicaciones y deleciones, desórdenes genómicos, cromosomas marcadores y amplificaciones cromosómicas en núcleos en interfase y en cromosomas en metafase. Las secuencias pueden obtenerse de plásmidos (1-10 kb) o de vectores grandes como cromosomas artificiales de bacterias (BAC) o de levaduras (YAC) donde el tamaño va de 80kb a 1Mb dependiendo del tamaño de la secuencia blanco [Salman, et al; 2004].

2.6.1.3 Sondas de Regiones subteloméricas

En 1995 Flint *et al*, aplica la metodología de FISH para desarrollar una estrategia en la búsqueda de anomalías hereditarias y de polimorfismos de DNA de las regiones subteloméricas en individuos con RM. Ellos encontraron que 3/99 pacientes tenían anomalías en las regiones subteloméricas. Desde entonces, se ha aplicado esta tecnología para brindar servicio clínico a los pacientes candidatos. Actualmente, el rendimiento de diagnóstico es aproximadamente de 3.5 a 11%. [Raymond; 2004/ Shaffer; 2007]



Recientemente el estudio de las regiones subteloméricas de los cromosomas parece estar siendo de particular utilidad en el ámbito del análisis de las causas genéticas del RM/RD. Aunque existen diferencias debidas a los distintos criterios de inclusión en los estudios, se estima que aproximadamente 5-10% de los casos podrían llegar a ser diagnosticados mediante este tipo de estudios. Técnicamente se estudian mediante amplificación múltiple dependiente de ligamiento (MLPA) subtelomérico o FISH subtelomérico. Ambas técnicas tienen una resolución mucho mayor incluso que el estudio citogenético de alta resolución, pero no permiten el análisis de todo el genoma ya que están limitadas a regiones muy concretas y terminales de los cromosomas. Las técnicas FISH y MLPA son diez veces más sensibles que las técnicas de citogenética convencional. El grado de RM/RD es el principal factor predictor en este tipo de estudios. Los RD o RM moderados o graves asociados con dismorfia facial, anomalías físicas menores en manos y pies, talla baja y/o microcefalia tienen mayor probabilidad de estar asociados a anomalías subcromosómicas. La presencia de una historia familiar positiva de RM/RD o fenotipo peculiar incrementa la probabilidad de ser portadores de este tipo de rearrreglos [González, *et al*; 2008].

Dentro del RM/RD idiopático, una proporción significativa de casos, aproximadamente 40% presenta RM/RD severo y 45-65% moderado; además, muchos de estos casos no presentan un fenotipo característico de un síndrome de microdelección, el abordaje de confirmación genética no siempre es posible utilizando FISH con una sonda específica de locus o región cromosómica [González, *et al*; 2008].

2.6.1.4 Sondas WCP

Las sondas de tinción completa son mezclas de sondas de DNA que tienen una alta afinidad por todo el cromosoma en cuestión, a excepción del centrómero y las regiones teloméricas. Estas sondas se utilizan ampliamente para identificar desbalances genómicos en células en metafase, especialmente rearrreglos complejos observados en muchos tipos de cáncer. Las limitaciones de las sondas WCP es que son costosas, se requiere saber la anomalía genética para poder seleccionar adecuadamente la sonda, y la resolución es limitada para detectar deleciones/amplificaciones muy pequeñas y traslocaciones debido a que tienen una resolución de 2-3 Mb [Salman, *et al*; 2004].



2.6.2 M-FISH (Multi-FISH) y SKY (Cariotipo espectral)

Estos dos métodos difieren en el análisis, uno es secuencial (M-FISH) y otro concurrente (SKY). Específicamente, estas dos técnicas difieren en los dispositivos de imagen aplicados al análisis de la combinación de los fluorocromos. El análisis del M-FISH involucra la captura de los fluorocromos de manera individual usando filtros específicos. Por otra parte, el SKY usa la exposición sincronizada de la imagen a través de la combinación de una cámara acoplada a un dispositivo que aplica modelos matemáticos de espectrometría para analizar la combinación de los fluorocromos (Figura 19) [Salman, *et al*; 2004].

Las sondas de tinción completa del genoma han sido desarrolladas para poder diferenciar los brazos de todos los cromosomas, excepto los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos, por lo que puede ofrecer la detección simultánea de cada brazo en una sola hibridación. Esto se realiza etiquetando la región con diferentes fluorocromos variando en la combinación de colores resultando en un patrón único. Esta señal de color único para cada brazo cromosómico revela aberraciones cromosómicas complejas incluyendo rearrreglos intracromosómicos, mapeo de puntos de ruptura cromosómicos, detección de rearrreglos subteloméricos e identificación de cromosomas marcadores, regiones homogéneamente teñidas y minutos dobles. Esta técnica es usualmente usada en conjunto con técnicas de bandeado cromosómico para una identificación precisa de la aberración cromosómica [Salman, *et al*; 2004]. Con esta técnica, en alrededor de 7% de los pacientes con RM idiopático se han encontrado anormalidades cromosómicas que eran indetectables con otras técnicas citogenéticas [Trask; 2002]

2.6.3 Hibridación Genómica Comparativa (CGH)

Es una técnica de citogenética molecular que surge de la citogenética estándar y del FISH para observar amplificaciones y deleciones de DNA en todo el genoma, así como posibles desórdenes cromosómicos. Esta técnica tiene la ventaja de no requerir células en división. Puede realizarse extrayendo DNA de tejidos fijados en formalina o embebidos en parafina y de especímenes frescos. Los cambios en el número de copias de las secuencias de DNA pueden detectarse sin tener que realizar un FISH para una secuencia cromosómica específica. Sin embargo, el CGH no puede usarse para detectar traslocaciones, inversiones o identificación de algún otro rearrreglo cromosómico balanceado. De manera general, el CGH involucra la hibridación de dos especímenes, el DNA problema y un DNA de referencia, a una metafase normal. Para prevenir la hibridación no específica, las muestras se etiquetan diferencialmente,



se mezclan junto con DNA Cot-1 (que contiene las secuencias más repetidas del genoma), se hibridan y se capturan las metafases con los filtros correspondientes a cada fluorocromo (Figura 20). Los cambios en el número de copias son evaluados en base a las diferencias entre la intensidad de fluorescencia a lo largo del cromosoma. Esta técnica tiene la limitante de tener una resolución de 3-10Mb, las reacciones de hibridación se realizan manualmente y tienen un alto costo. [Salman, et al; 2004].

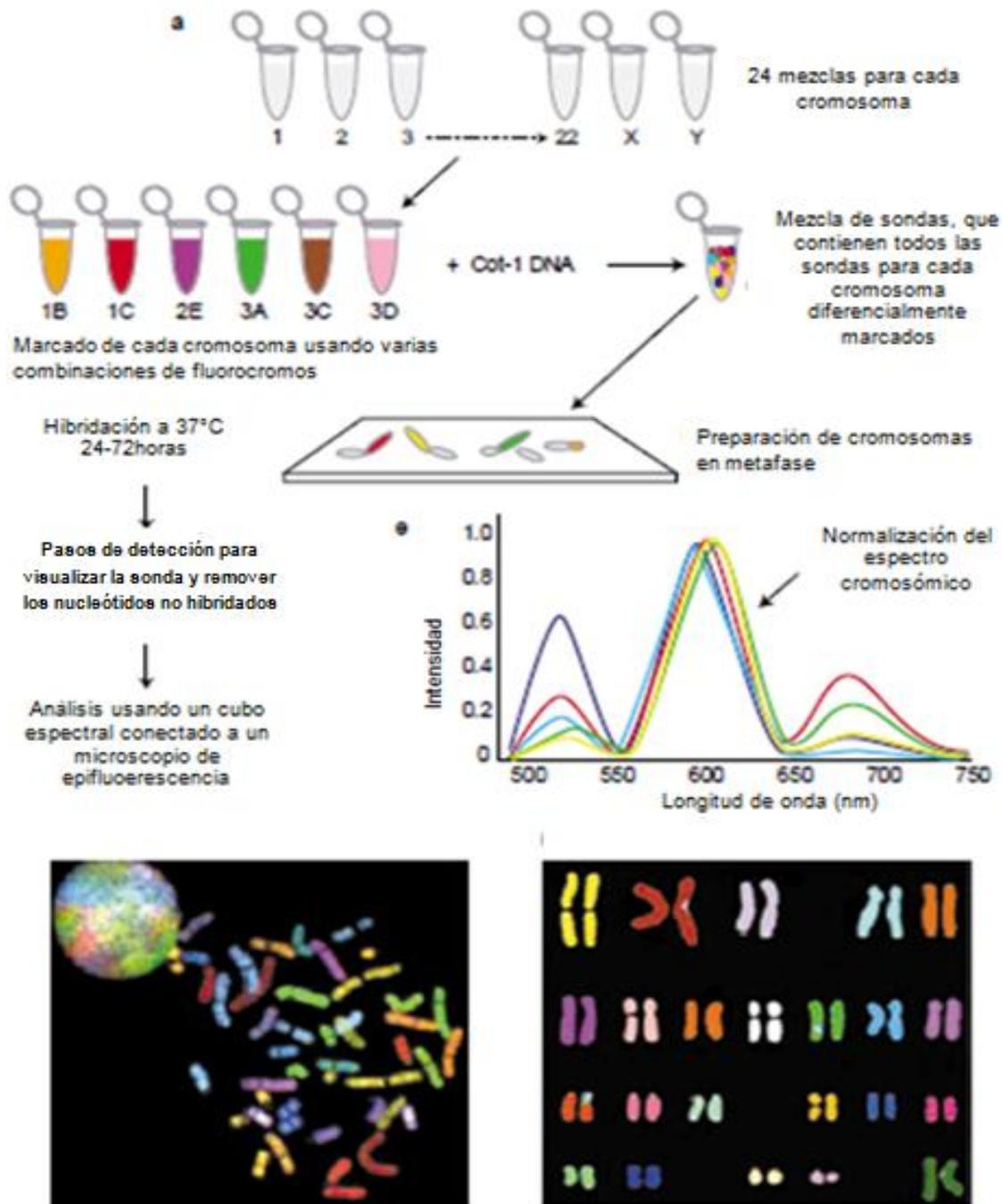


Figura 19. Metodología general de la Técnica de SKY (Modificado de McNeil, et al; 2000)

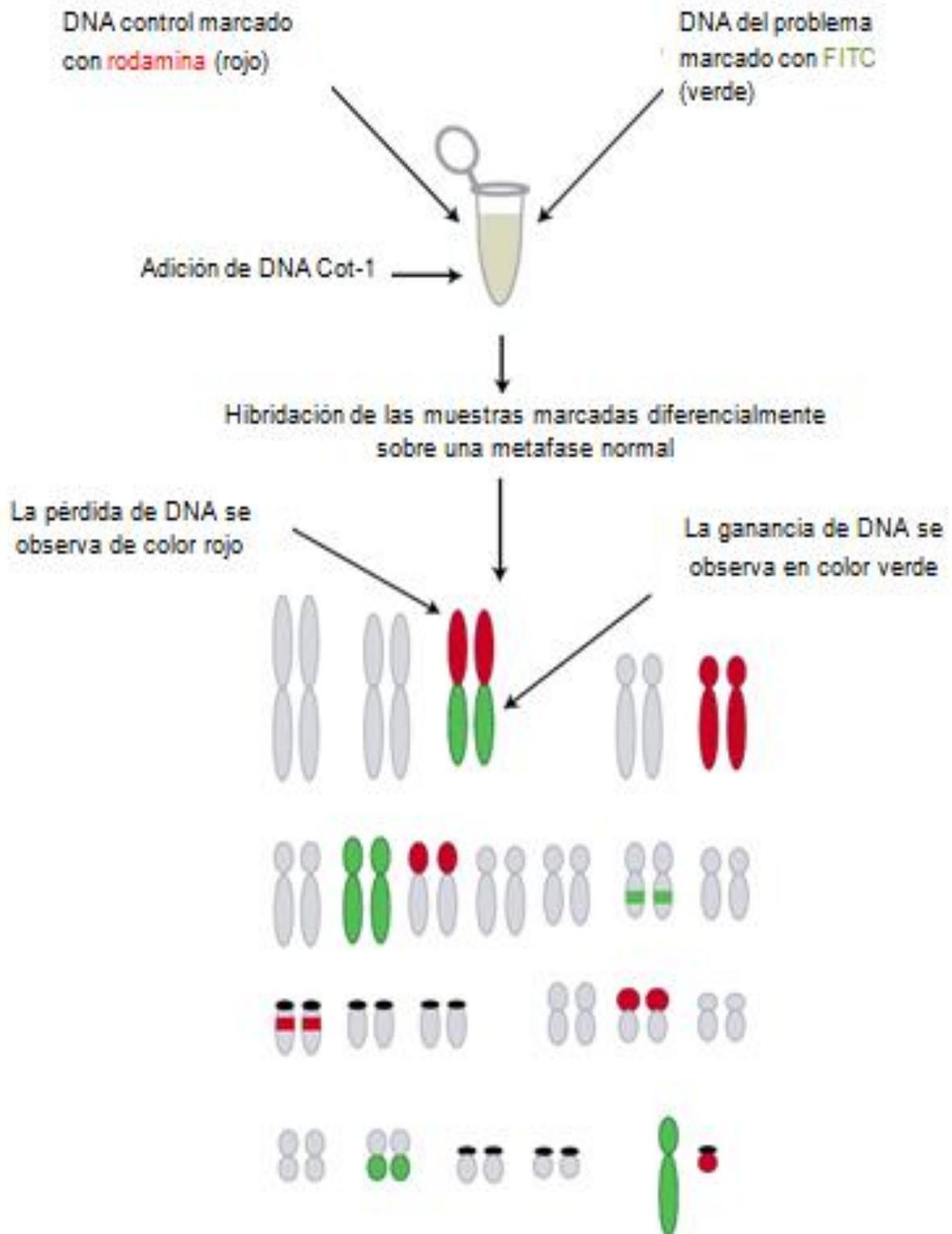


Figura 20. Esquematización de la técnica de CGH (Modificada de: McNeil, *et al*; 2000)



2.6.4 MICROARREGLOS

2.6.4.1 Arreglos de BAC

La hibridación sobre arreglos de BAC permite la detección de ganancias y pérdidas de secuencias de copia única. La aplicación de los BAC a la tecnología de microarreglos incluye la identificación, el diagnóstico y pronóstico de aberraciones cromosómicas en defectos al nacimiento, RM y cáncer. Un estuche comercial contiene alrededor de 2632 BAC distribuidos uniformemente a un espacio aproximado de 1Mb en todo el genoma. Cada clona contiene por lo menos una secuencia blanco que está mapeada en la secuencia del genoma humano. El estuche está compuesto de BAC colocados por duplicado, lo que brinda una mayor precisión de los resultados. La resolución está limitada por la distancia entre cada clona [Salman, et al; 2004].

2.6.4.2 Arreglos de oligonucleótidos

Los arreglos basados en oligonucleótidos han ganado cierta popularidad en la comunidad científica, estos monitorean la expresión cuantitativa de genes para mRNA en poblaciones de células y tejidos, y más recientemente han sido aplicados a la detección de secuencias de DNA, polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) y CNV. Estos arreglos contienen oligonucleótidos silvestres y oligonucleótidos con SNP. El DNA a prueba es amplificado por PCR, marcado y después hibridado sobre el microarreglo. La hibridación es leído como una serie de señales fuertes que pueden incluir ambos alelos en un sitio polimórfico. La intensidad de la señal en el sitio es proporcional al número de copias de la secuencia complementaria en el genoma [Salman, et al; 2004 / Trask; 2002]. La resolución está limitada por la densidad de los arreglos de oligonucleótidos. La limitación de los microarreglos consiste en la incapacidad para detectar traslocaciones balanceadas, inversiones, o identificar rearrreglos de cromosomas específicos a menos que se diseñen o contengan sondas específicas que indiquen el punto de ruptura [Trask; 2002].

La interpretación de los microarreglos en los pacientes con RM es complicada debido a la presencia de CNV, las cuales están asociadas a fenotipos con patologías cuando uno o más genes sensibles a dosis se encuentran en estas regiones. Si embargo, las CNV no se consideran patológicas en todos los casos. En un individuo normal, es posible detectar más de 1000 CNV, por lo que es necesario comparar con controles no afectados y contra los padres del sujeto a investigar. La detección de CNV *de novo* en pacientes afectados es un fuerte indicador



de significancia patológica, y están presentes en 10% de los pacientes con RM con cariotipo normal. Una CNV puede considerarse como causa de RM si:

1) Está sobrelapada con regiones conocidas donde se ha identificado un síndrome relacionado a RM.

2) Está incluida en la región crítica de un síndrome o de los genes relacionados.

3) El fenotipo del paciente es consistente con las características del síndrome.

[Galasso, et al; 2010]

Otros estudios confirman que con esta aplicación podrían diagnosticarse 10% más de casos de retraso mental o del desarrollo [González, *et al*; 2008]. En individuos con RM no diagnosticado, el análisis de CNV basados en el uso de microarreglos ha facilitado la detección de desbalances cromosómicos críticos en 10% de los pacientes, con un intervalo de 4.2% a 17% en diferentes estudios [Basel-Vanagaite, *et al*; 2008].

Los a-CGH son incapaces de detectar rearrreglos balanceados (traslocaciones recíprocas, inversiones), las cuales están presentes en aproximadamente el 0.75% de todos los pacientes con RM [Galasso, et al; 2010]

El advenimiento de nuevas técnicas, junto con la optimización y mejoramiento de las técnicas de rutina, nos permiten la detección y caracterización de alteraciones cromosómicas que en otros tiempos nos hubiera sido imposible identificar, sin embargo, debemos mencionar que la citogenética convencional aunada a una buena resolución y con un análisis adecuado de incluso dos o más observadores, es de suma importancia para dirigir los estudios posteriores del individuo afectado, con el fin de brindar un asesoramiento genético adecuado. En la tabla 12 se presenta una breve comparación de las técnicas mencionadas anteriormente.



TABLA 12. TÉCNICAS CONVENCIONALES DE CITOGÉNÉTICA MOLECULAR Y MICROARREGLOS

Técnica	Resolución	Detección de	Requerimientos Adicionales	Tiempo	Costo Relativo
Bandeo cromosómico	5-8Mb	Aneuploidía + Inserciones/delecciones +/- Traslocaciones balanceadas + Traslocaciones desbalanceadas + Cromosomas marcadores ID Limitada Progresión enfermedad/monitoreo +/- Detección de mosaicismo (%) 1	Personal capacitado para una correcta interpretación	1-10 días	Bajo
FISH	0.5-100kb	Aneuploidía + Inserciones/delecciones +/- Traslocaciones balanceadas + Traslocaciones desbalanceadas + Cromosomas marcadores ID + Progresión enfermedad/monitoreo +/- Detección de mosaicismo (%) >20	Requiere de una indicación clínica de un posible <i>locus</i> . Se requiere de un microscopio de fluorescencia	1-7 días	Medio
M-FISH/ SKY	2-3Mb	Aneuploidía + Inserciones/delecciones +/- Traslocaciones balanceadas + Traslocaciones desbalanceadas + Cromosomas marcadores ID + Progresión enfermedad/monitoreo +/- Detección de mosaicismo (%) 10	Requiere una indicación clínica previa o sospecha de alguna anomalía y un equipo adecuado	1-7 días	Alto
CGH Convencional	3-10Mb	Aneuploidía + Inserciones/delecciones +/- Traslocaciones balanceadas - Traslocaciones desbalanceadas + Cromosomas marcadores ID + Progresión enfermedad/monitoreo Limitada Detección de mosaicismo (%) >50	Personal capacitado y equipo sofisticado, debe confirmarse por FISH	5-7 días	Alto
CGH microarreglos BAC	1kb-1Mb	Aneuploidía + Inserciones/delecciones +/- Traslocaciones balanceadas - Traslocaciones desbalanceadas + Cromosomas marcadores ID + Progresión enfermedad/monitoreo Limitada Detección de mosaicismo (%) >30 BAC	Requiere un equipo sofisticado, personal capacitado y un soporte estadístico.	1-4 días	Muy alto
CGH oligonucleotidos	100kb-1Mb	Aneuploidía + Inserciones/delecciones +/- Traslocaciones balanceadas - Traslocaciones desbalanceadas + Cromosomas marcadores ID + Progresión enfermedad/monitoreo Limitada Detección de mosaicismo (%) depende	Requiere un equipo sofisticado, personal capacitado y un soporte estadístico.	1-4 días	Muy Alto
Microarreglos de SNP	10-250kb	Aneuploidía + Inserciones/delecciones +/- Traslocaciones balanceadas - Traslocaciones desbalanceadas + Cromosomas marcadores ID + Progresión enfermedad/monitoreo Limitada Detección de mosaicismo (%) depende	Requiere un equipo sofisticado, personal capacitado y un soporte estadístico.	1-4 días	Muy Alto

Abreviaturas: ID, Identificación

Referencias: Salman, *et al*; 2004 y Feenstra, 2006



3. OBJETIVOS

3.1 General

- ✎ Detectar y caracterizar aberraciones numéricas y/o estructurales en individuos con RM/RPM.

3.2 Particulares

- ✎ Caracterizar las aberraciones encontradas con ayuda de Citogenética Molecular.
- ✎ Correlacionar las alteraciones cromosómicas encontradas con las características clínicas que presenta el paciente.

4. JUSTIFICACIÓN

La mayoría de las alteraciones cromosómicas tienen como consecuencia RM, cuyo grado dependerá del cromosoma implicado, de la cantidad de material ganado o perdido y de los genes involucrados. Por estas razones, es necesario realizar cariotipo a los pacientes con RM, con el objetivo de determinar o descartar una aberración cromosómica como causa del fenotipo.

El detectar una alteración cromosómica en este tipo de pacientes nos obliga a realizar otro tipo de estudios citogenéticos y moleculares que complementen la información proporcionada por el cariotipo convencional, con el fin de brindar un diagnóstico adecuado, así como poder proporcionar un asesoramiento genético a la familia.



5. METODOLOGÍA^a

5.1 SELECCIÓN DE MUESTRAS

Se procesaron 59 muestras de sangre periférica de pacientes que acudieron a la consulta del Servicio de Genética del Hospital General de México O.D. con indicación diagnóstica de RM/RPM o con sospecha de RM/RPM relacionado a cromosopatía. Se tomaron de 3 a 5 mL de sangre periférica bajo condiciones de asepsia en jeringa con heparina de sodio como anticoagulante o con tubo vacutainer de tapa verde.

5.2 SIEMBRA DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA

Todas las muestras se sembraron por duplicado. En condiciones de asepsia estrictas y en campana de flujo laminar, se adicionaron 5mL de medio RPMI 1640 suplementado (ver anexo I) a un tubo cónico^b de 15mL. Se adicionaron 100µL de fitohemaglutinina^c cuidando que la punta no tocara las paredes del tubo. La muestra se resuspendió gentilmente, se desprendió de manera cuidadosa la aguja o el tapón y se procedió a colocar en el tubo de 10 a 12 gotas de la muestra. Se tapó cada tubo cuidadosamente y se agitó lentamente para homogenizar. Se incubaron en posición inclinada (45° aproximadamente) a 37°C por 72 horas.

5.3 COSECHA

Alrededor de las 70 horas de cultivo se adicionaron 8µL de bromuro de etidio sólo al tubo B, se homogenizó y se incubó 1 hora a 37°C. Transcurrido el tiempo se adicionó a cada cultivo 10 gotas de colchicina^d al 0.02%, con jeringa de insulina con aguja, se homogenizó y se dejó incubar media hora a 37°C. Pasado el tiempo se centrifugaron a 3000rpm por 4 minutos, se desechó el sobrenadante, se disgregó el botón en vortex y se agregaron 10mL de solución hipotónica^e (KCl 0.075M) a 37°C, se homogenizó asegurando que el botón se desintegrará por completo y se incubó nuevamente a 37°C por 30 minutos. Se agregaron a cada cultivo 10 gotas de fijador (metanol-ácido acético glacial 3:1) recién preparado y frío, a este proceso se le conoce como prefijación, es un paso clave en el proceso pues permite el acondicionamiento gradual de las células de nuestro interés a un cambio de temperatura y pH, comenzando la deshidratación de las células y desnaturalización de proteínas celulares.

^a Todos los procedimientos excepto el FISH fueron adaptados de Verma, Babu; 1995a

^b Los tubos fueron marcados legiblemente con el número de caso, fecha de siembra y cultivo A o B respectivamente.

^c Funciona como antígeno inespecífico estimulando a los linfocitos T para que entren a división celular (Verma, Babu; 1995a)

^d Para interrumpir la polimerización del uso mitótico y obtener células en metafase (Verma, Babu; 1995a).

^e La solución hipotónica provoca un transporte pasivo de agua al interior de la célula provocando que éstas se hinchen aumentando el volumen intracelular y por lo tanto la separación de los cromosomas condensados (Verma, Babu; 1995a).



El cultivo se agitó lentamente para homogenizar. Se centrifugó a 3000rpm por 5 minutos, se eliminó cuidadosamente el sobrenadante, se disgregó el botón y se adicionaron durante la agitación en vortex 6 mL de fijador gota a gota. Se centrifugó a 3000rpm por 5 min, se eliminó el sobrenadante, se disgregó el botón y se agregaron nuevamente 6 mL de fijador. Se repitió el paso anterior varias veces hasta que se obtuvo un sobrenadante transparente y un botón blanco.

5.4 ELABORACIÓN DE LAMINILLAS

Se usaron laminillas limpias y desengrasadas, contenidas en un frasco con agua destilada. El botón se resuspendió en una cantidad adecuada de fijador (entre 0.5mL y 1mL, dependiendo de tamaño del botón).

En un baño con agua destilada a 73-75°C se colocó cuidadosamente una laminilla y se colocaron 3 gotas de fijador distribuidas a lo largo de ésta, se tomó una cantidad adecuada de muestra con una micropipeta (35µL aproximadamente) y se dejó caer en gotas sobre la laminilla a una distancia considerable, se soplo sobre la laminilla, se dejó unos 30 segundos más sobre el vapor y se dejó secar. La laminilla se marcó con el número de caso y cultivo A o B.

Una vez seca la laminilla se verificó crecimiento en el microscopio en contraste de fases, se observó la presencia de metafases, número de metafases por campo, efecto de hipotonía, tamaño de los cromosomas y presencia de citoplasma.

Se gotearon de 4 a 8 laminillas según la cantidad de metafases presentes por cada caso. Las laminillas se dejaron madurar a 37°C por dos días.

5.5 BANDAS GTG y ANÁLISIS CITOGENÉTICO

Las laminillas se sumergieron en el siguiente tren de vasos coplin en el tiempo indicado^f:

- A. 50 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2 con 0.03g de tripsina^g, de 5 a 10 segundos.
- B. 50 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2, 1 minuto.
- C. 46mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8 más 4 mL de colorante Wright^h filtrado, 2 minutos

^f Modificado de Verma, Babu;1995b

^g La tripsina es una proteasa pancreática que actúa sobre residuos de arginina y lisina de las histonas (Verma, Babu; 1995b).

^h Los colorantes Wright y Giemsa son de composición básica, por lo que tienen afinidad por compuestos ácidos como el DNA (Verma, Babu; 1995b).



- D. 46mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8 más 4 mL de colorante Giemsa filtrado, 3 minutos.
- E. 50mL de agua destilada, las laminillas se enjuagaron con agitación constante.

Una vez secas las laminillas se colocaron dos gotas de resina al 70% y se colocó sobre éstas un cubreobjetos limpio y desengrasado evitando la formación de burbujas. Se procedió al análisis citogenético revisándose alrededor de 30 metafases por cada caso.

5.6 Bandas NOR

En un tubo de ensayo se agregaron 2 mL de AgNO_3 al 50% (ver anexo I) y 1 mL de solución de albúmina. Se deja reposar unos 5 minutos y se tomó con cuidado la segunda fase que contiene al AgNO_3 y se colocaron 3 gotas sobre el portaobjetos. Con cuidado se colocó un cubreobjetos y se dejó la laminilla sobre una plancha a 70°C hasta que se observó una coloración café, se enjuagó con abundante agua y se montó la laminilla con resina al 70%.

5.7 FISH (HIBRIDACIÓN *IN SITU* CON FLUORESCENCIA)ⁱ

A. Pretratamiento de la muestra

Se observaron las laminilla en contraste de fases, y se seleccionó un campo de 22 por 22 mm donde se encontraran metafases y núcleos libres de citoplasma. La laminilla se colocó en un coplin que contenía 50mL de la solución de maduración 2X SSC por 45 min a 37°C .

Transcurrido el tiempo se pasó a otro coplin que contenía 50mL de ácido clorhídrico (HCl) 0.01N y 15 μL de pepsina, se incubó 7 minutos a 37°C .

La laminilla se deshidrató gradualmente en etanol (EtOH) al 70%, 85% y 100% (absoluto) por 2 minutos en cada uno y se dejó secar al aire.

B. Preparación de la Sonda

Los viales que contenían la solución amortiguadora de hibridación, la sonda y el agua inyectable, fueron sacados de congelación y se dejaron a temperatura ambiente durante 10 minutos, posterior a esto se agitaron en vortex por 15 segundos y se ultracentrifugaron por 10 segundos.

En un microtubo de 1mL se colocaron las siguientes cantidades:

3.5 μL de solución amortiguadora

0.5 μL de agua inyectable

ⁱ Adaptada de la metodología de Vysis & Col.



1µL de sonda

La mezcla se homogenizó en vórtex y se ultracentrifugó 10 segundos.

C. Hibridación

Se colocó la mezcla de hibridación cuidadosamente sobre el área previamente seleccionada y se puso el cubreobjetos^j de 22x22 mm evitando la formación de burbujas. El área se selló con cemento IRIS[®] asegurándose que todo estuviera perfectamente sellado^k.

Se codesnaturalizaron la preparación cromosómica y la sonda en la laminilla por 2 minutos a 71°C y se dejó hibridando toda la noche a 37°C en una cámara húmeda.

D) Lavados Posthibridación

Con mucho cuidado se quitó el pegamento de la laminilla y se sumergió en un tren de vasos coplin con las soluciones y tiempos siguientes:

- A. 50 ml de solución de 2XSSC a temperatura ambiente por 3 minutos.
- B. 40ml de solución de 0.4XSSC-0.3% NP40, 2 minutos a 73°C.
- C. 40 ml de solución de 2XSSC 0.1%, NP40, 1 minuto a temperatura ambiente.
- D. 50 ml de agua destilada a TA por 3 segundos.

La laminilla se dejó secar en la oscuridad.

Se agregaron 5µL de mezcla 1:1 de DAPI II/*Antifade* II, se colocó un cubreobjetos limpio y desengrasado y se realizó el análisis al microscopio de fluorescencia.

5.8 REVISIÓN EN EXPEDIENTES

Adicionalmente al procesamiento y lectura de las muestras se realizó una revisión del expediente para obtener las edades de los casos índice y las de sus padres, además de datos clínicos e historia familiar.

^j El cubreobjetos se limpió anticipadamente con alcohol al 70% y se secó cuidadosamente con una gasa.

^k Para evitar la evaporación de la sonda durante la codesnaturalización.



6. RESULTADOS

6.1 MOTIVO DE TOMA DE MUESTRA PARA CARIOTIPO

Se procesaron 59 muestras de las cuales 24 tenían indicación de RM/RPM, 24 de SD y 11 tenían indicación de síndromes relacionados con RM (ver figura 21).

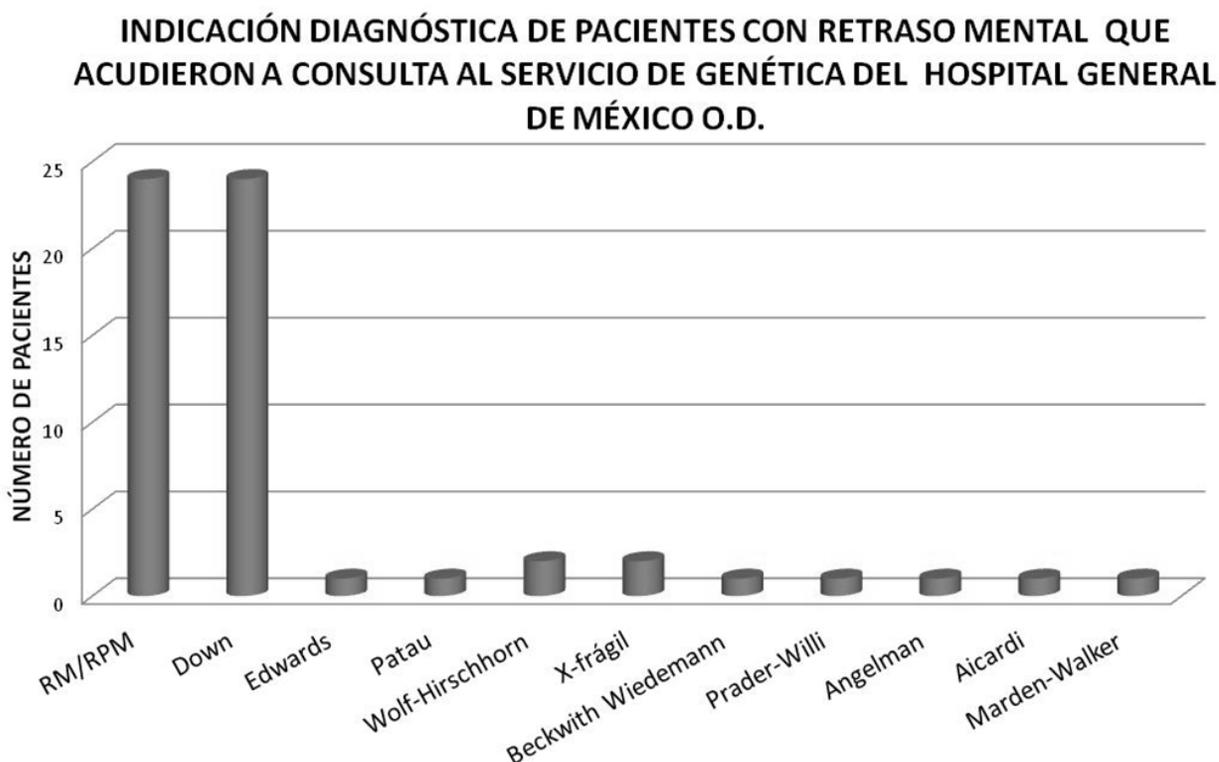


Figura 21 Total de pacientes con RM que fueron procesados. En el eje de las abcisas se observa el diagnóstico, todos se refieren a síndromes excepto la primera barra que corresponde a RM/RPM, y en el eje de las coordenadas al número de pacientes con la indicación diagnóstica

6.2 ANÁLISIS CROMOSÓMICO

El análisis cromosómico de las muestras procesadas se realizó en un microscopio de campo claro, analizándose en promedio 30 metafases por caso a una resolución de 450-650 bandas. Es importante mencionar que por estándares de calidad los cariotipos fueron revisados por al menos dos citogenetistas. Los hallazgos citogenéticos encontrados se enlistan en la siguiente tabla de acuerdo a la indicación diagnóstica.

TABLA 13. HALLAZGOS CITOGENÉTICOS DE ACUERDO A LA INDICACIÓN DIAGNÓSTICA			
INDICACIÓN DIAGNÓSTICA	CARIOTIPO	NÚMERO	TOTAL
Síndrome de Down	47,XX,+21	10	24
	47,XY,+21	9	
	46,XX,+21,t(21;21)(q10;q10)	1	
	46,XX	3	



TABLA 13. HALLAZGOS CITOGENÉTICOS DE ACUERDO A LA INDICACIÓN DIAGNÓSTICA			
INDICACIÓN DIAGNÓSTICA	CARIOTIPO	NÚMERO	TOTAL
	46,XY	1	
RM/RPM	46,XX	10	24
	46,XY	9	
	46,XY,Yqh+	1	
	46,XY,Yqh-	1	
	47,XYY	1	
	47,XX,+mar	1	
	46,XX,add(17)(p13.3)	1	
Síndrome de Edwards	47,XX,+18	1	11
Síndrome de Patau	46,XX	1	
Síndrome de Wolf-Hirschhorn	46,XX,der(4)ins(15;4)(p12;p16.1p16.3)pat	1	
	46,XY,der(4)ins(15;4)(p12;p16.1p16.3)pat	1	
Síndrome de X-frágil	46,XY	2	
Síndrome de Beckwith Wiedemann	46,XY	1	
Síndrome de Prader-Willi	46,XY,9qh+	1	
Síndrome de Angelman	46,XX	1	
Síndrome de Aicardi	46,XX	1	
Síndrome de Marden-Walker	46,XX	1	
TOTAL		59	

La proporción de cariotipos anormales y cariotipos normales de acuerdo al diagnóstico se ilustra en la siguiente figura.

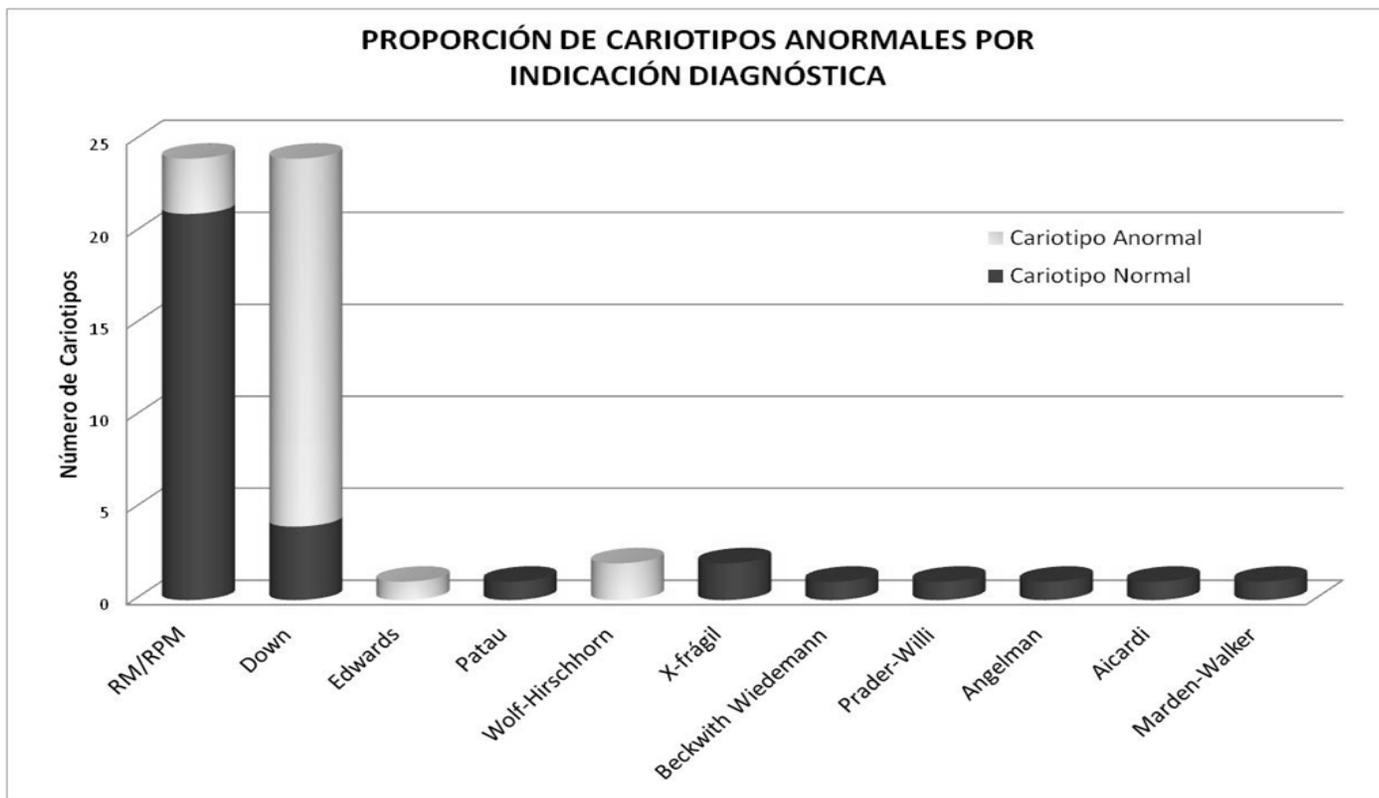


Figura 22. Proporción de cariotipos anormales con respecto a la indicación diagnóstica



6.3 EDADES

El promedio de edades de los pacientes y de los padres se muestran en la siguiente tabla. El rango de edad de los pacientes va de Recién Nacidos (RN) a 49 años. Los promedios de edades se representan en la figura 23.

DIAGNÓSTICO	Edad Materna (años)	Edad Paterna (años)	Edad de los pacientes (años)
General (SD, RM y RPM)	29	30.5	5.81
Síndrome de Down (trisomía 21)	30.7	33.4	3.51
RM/RPM Cariotipo normal	27.9	28.8	8.3
RM/RPM y Otros síndromes con cariotipo normal y anormal	25.8	28.5	8.17

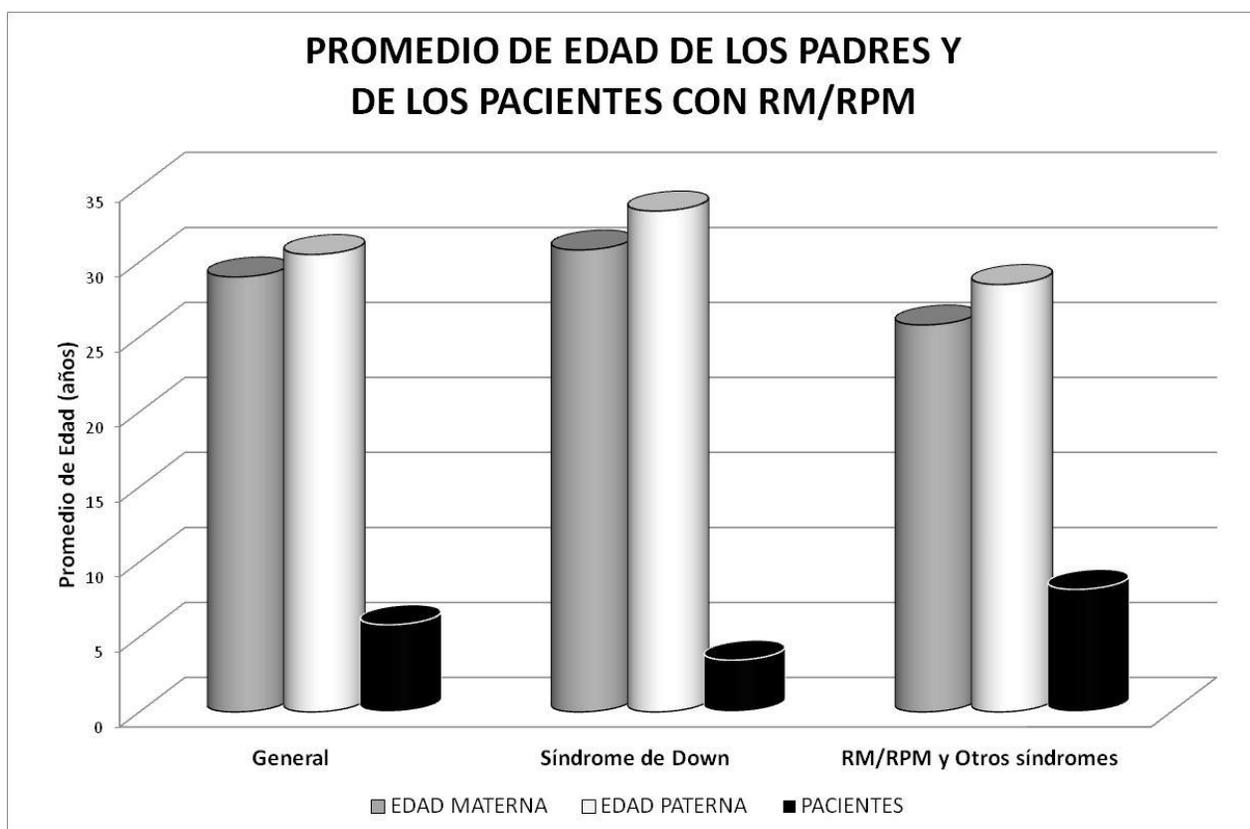


Figura 23. Promedio de edad de los padres y pacientes RM/RPM

Es importante mencionar que hay una diferencia significativa en la edad entre los pacientes que acuden con diagnóstico de SD y los pacientes con RM/RPM, la mediana en los pacientes con SD es de 0,17 años que son los primeros meses de vida (2 meses) y en los pacientes con RM/RPM la mediana es de 7 años.



6.4 CORRELACIÓN FENOTIPO CARIOTIPO

6.4.1 Pacientes con síndrome de Down

6.4.1.1 Cariotipo normal

De cada uno de los cuatro casos con cariotipo normal, se leyeron alrededor de 25 metafases. En cuanto al fenotipo los pacientes tuvieron menos de 25% de todas las características que sugieren SD, cabe destacar que se solicitó el análisis cromosómico para descartar un probable mosaico y la existencia de éste no puede descartarse sin analizar un mayor número de metafases y sin cultivar otro tejido.

6.4.1.2 Cariotipo anormal

a) Trisomía regular. En la figura 24 se muestran las frecuencias de las características clínicas encontradas en los pacientes con diagnóstico confirmado de SD por trisomía libre regular (sólo se pudieron recuperar 18 historias clínicas de los 20 pacientes). Se leyeron alrededor de 25 metafases por cada caso y en ninguno de éstos hubo historia familiar presuntiva de SD ni de otras aneuploidías. El promedio de edad materna fue de 30.7 años, de edad paterna 33.4, y el rango de edad de los pacientes fue de recién nacidos a 16 años, con un promedio de 3.51 años.

b) Caso con cariotipo 46,XX,+21,t(21;21)(q10;q10). El expediente de esta paciente no pudo recuperarse, lamentablemente no contamos con los datos clínicos, aunque se infieren que éstos corresponden en frecuencia similar a los de la trisomía regular, pues en la libreta de registro de cultivos sólo se indica como SD. Por las mismas razones, tampoco se pudo obtener el cariotipo de los padres.

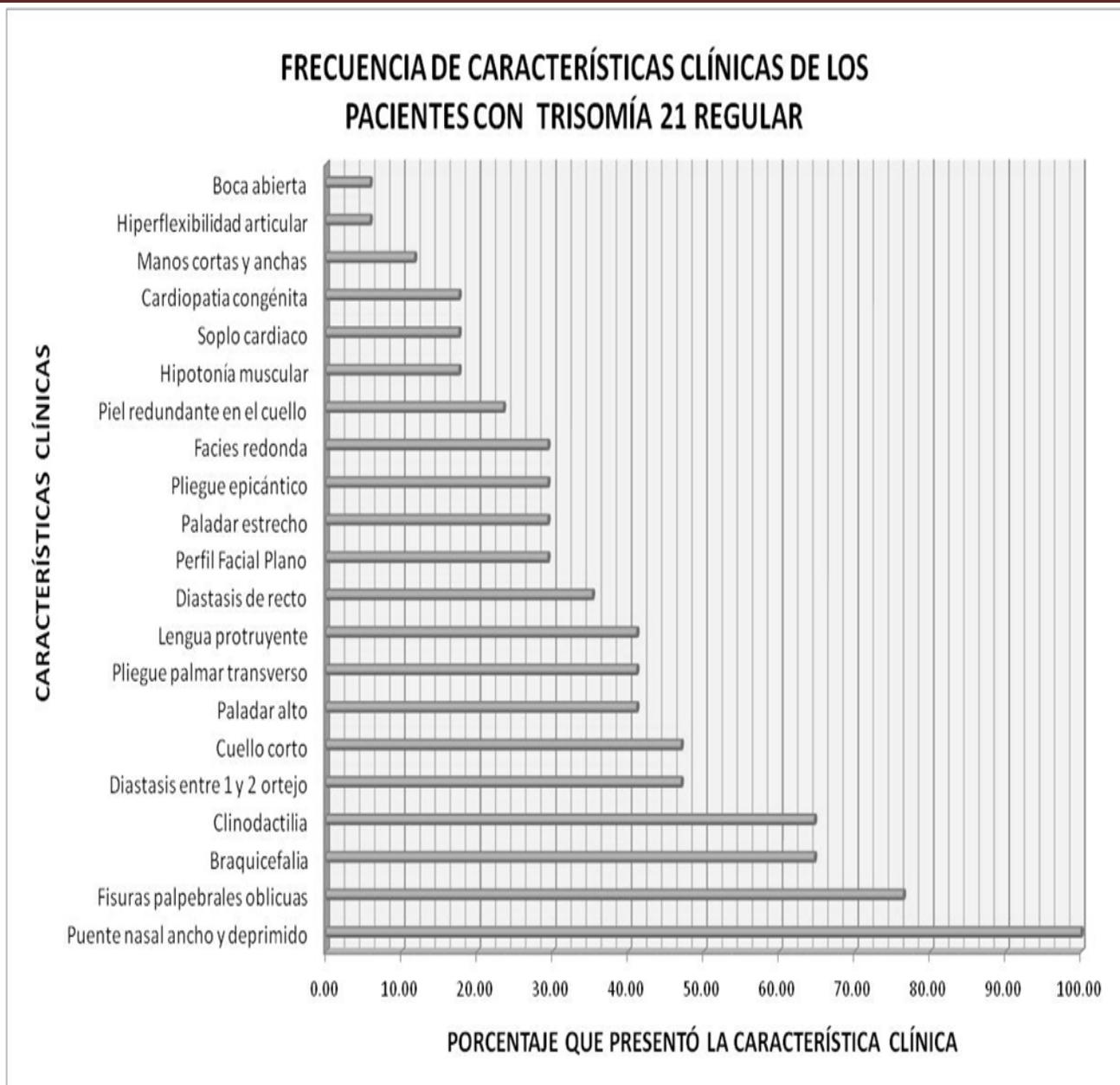


Figura 24 Hallazgos clínicos de los pacientes con trisomía 21 regular.

Todos los pacientes presentaron RM o RPM dependiente de la edad al diagnóstico.

6.4.2 Pacientes con diagnóstico de RM/RPM

6.4.2.1 Cariotipo normal

Se analizaron entre 20 y 30 metafases por caso, obteniéndose 21 pacientes con cariotipo normal, 12 fueron del sexo femenino y 9 del sexo masculino, dos de éstos presentaron polimorfismos en el cromosoma Y. El promedio de edad materna fue de 27.9 años y la paterna de 28.8. Los pacientes tuvieron un rango de edad de 2 meses a 14 años y el promedio fue de 8.3.



Se pudieron revisar 18 expedientes de los 21 pacientes con cariotipo normal, los datos prenatales se muestran en la tabla 15 y la frecuencia de las características clínicas en la figura 25. Es importante mencionar que la suma de pacientes no es de 18 y la del porcentaje no resulta en 100% debido a que algunos pacientes presentaron dos o más características o ninguna.

TABLA 15. HISTORIA FAMILIAR Y DATOS PRENATALES		
Datos	Pacientes	Porcentaje (%)
Antecedentes de Aborto	9	50
Infección vaginal	3	16.67
Infección de las vías urinarias	2	11.76
Amenaza de aborto	4	22.22

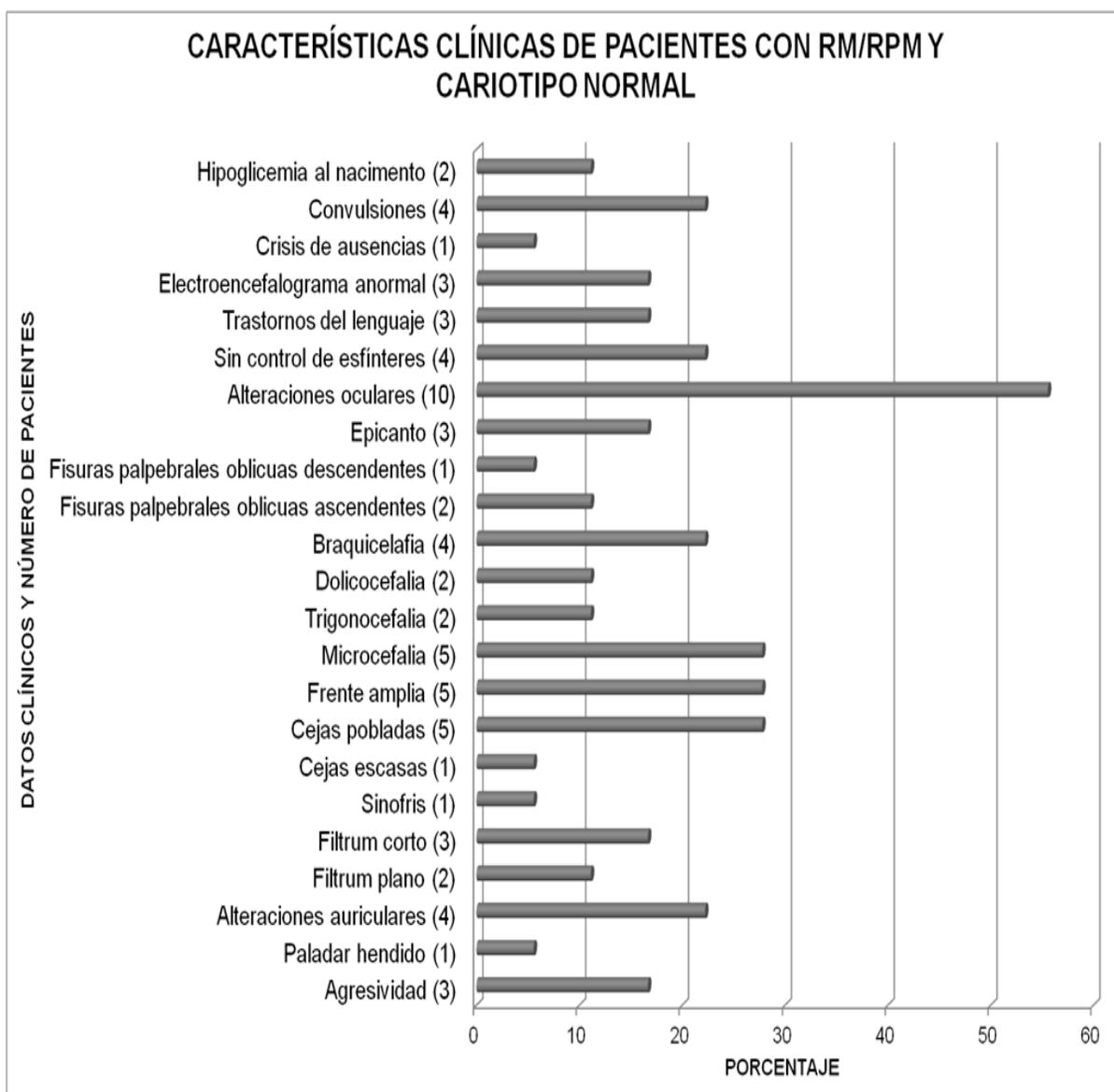


Figura 25. Hallazgos clínicos en los pacientes con RM/RPM y cariotipo normal.



6.4.2.2 Cariotipo anormal y estudios adicionales

a) Paciente con cariotipo 47,XYY. La edad del paciente al momento de la consulta fue de 5 años, además del RPM, tenía como características principales: retraso en el lenguaje, hipertelorismo, implantación baja de pabellones auriculares, dos hernias inguinales y desproporción de segmentos corporales. No hay historia familiar presuntiva de RM/RPM, ni antecedentes de amenaza de aborto, la madre tenía 24 años y el padre 25 al nacimiento del *propósitus*. Los citogenetistas del Servicio de Genética realizaron Bandas CBG para confirmar que el cromosoma extra corresponde a un Y y no a un cromosoma marcador.

b) Paciente con cariotipo 46,XX,+mar. La madre tenía 31 años y el padre 21 al nacimiento del *propósitus*, la paciente tenía 3 años 11 meses cuando acuden al Servicio de Genética, las características clínicas de la paciente fueron:

- Puente nasal deprimido, paladar alto, soplo cardíaco, hiperlaxitud articular, luxación congénita de cadera y escoliosis. Sin marcha y convulsiones.

Se realizó FISH con sondas subteloméricas 11q (D11S1037) y 11p (D11S2071) del estuche TotalVysion de Vysis® para descartar síndrome de Emmanuel. El resultado del análisis de 100 núcleos y 20 metafases fue el siguiente:

nuc ish subtel(11)(D11S1037X2)

47,XX,+mar. ish(11)(D11S1037-)

d) Paciente con cariotipo 46,XX,add(17)(p13.3). La paciente llegó al Hospital General por una cardiopatía congestiva y se solicitó una interconsulta al Servicio de Genética. La paciente de 49 años presentó RM, no hablaba, tenía un comportamiento ligeramente agresivo, tetralogía de Fallot, estenosis pilórica, cardiomegalia, ausencia de menarca y caracteres sexuales secundarios, hipoplasia uterina y ausencia de casi todas las piezas dentales, la madre tenía 30 años y el padre 32 al nacimiento del *propósitus*. El árbol genealógico de la familia se muestra en la figura 26.

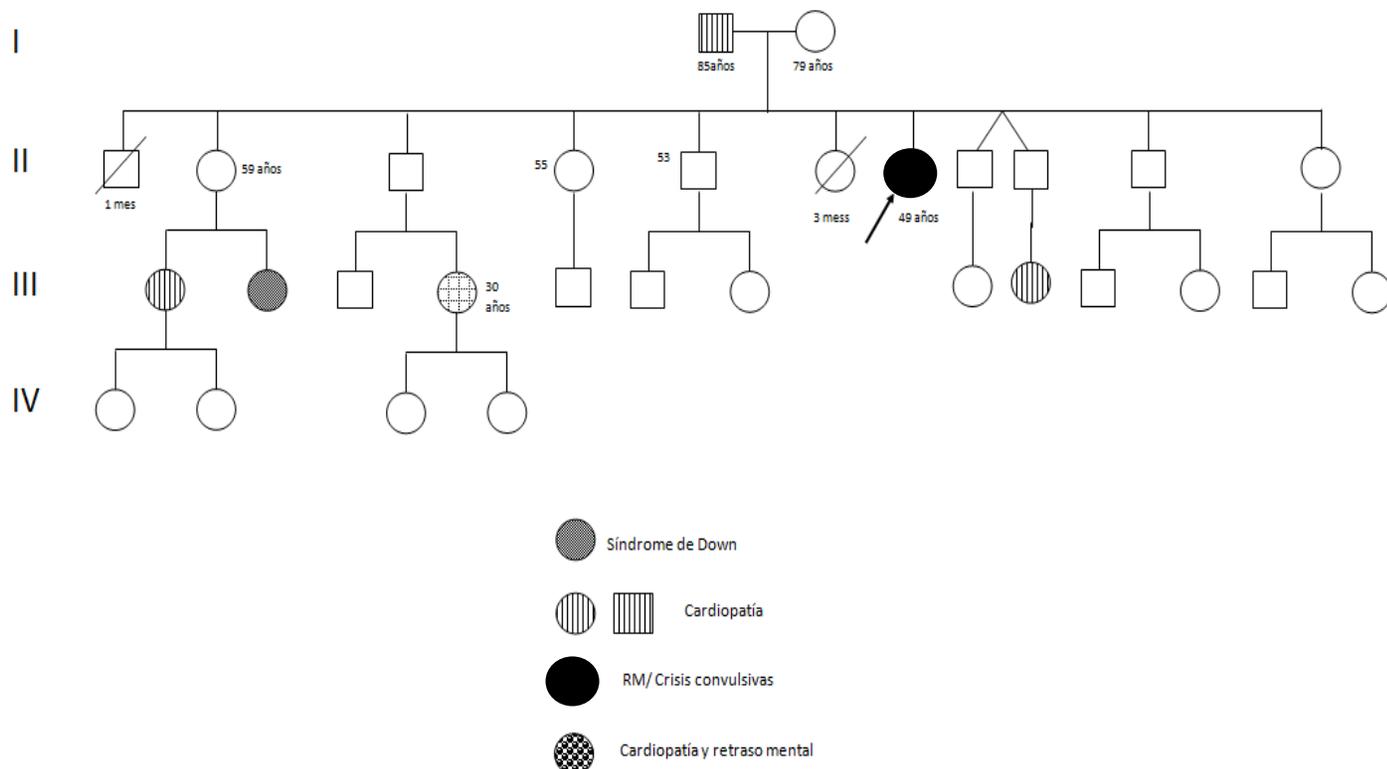


Figura 26. Historia familiar de la paciente con add17p13.3, nótese las muertes tempranas de sus hermanos II.1 y II. 6, además de sobrinas (III.2 y III.4) con RM.

Al realizarse el estudio citogenético en la paciente, se solicitó cariotipo a los padres, pero nunca regresaron a la consulta al Servicio de Genética, sin embargo, se realizó FISH con sonda 17p13.3 (LIS I) (D17S379) y se confirmó la presencia de su señal en el derivado del 17.

6.4.3 Pacientes con síndromes relacionados a RM

6.4.3.1 Cariotipo normal

Los 8 pacientes con síndromes relacionados a RM y que tuvieron cariotipo normal serán analizados brevemente durante la discusión de este trabajo.

6.4.3.2 Cariotipo Anormal y estudios adicionales

Pacientes con síndrome de Wolf Hirschhorn (WHS). El *propósitus* (Figura 27A) de 9.9 años y su hermana de 7.5 años (Figura 27B) coincidían en datos clínicos sugestivos de WHS adicionalmente la hermana presentaba anomalías del tracto urinario (Tabla 16).



Figura 27. Pacientes con diagnóstico de WHS

TABLA 16. DATOS CLÍNICOS DEL PACIENTE Y SU HERMANA		
Datos clínicos	Propósito	Hermana
Retraso en el crecimiento intrauterino	+	+
Deficiencia en el crecimiento y RM	+	+
Microcefalia	+	+
Frente amplia con glabella prominente	+	+
Hipertelorismo	+	+
Paladar hendido	+	+
Orejas malformadas y sordera	+	+
Convulsiones	+	
Defectos cardiacos	Defecto ventricular y estenosis pulmonar	Comunicación interauricular
Anomalías del tracto urinario	+	-

Se realizó cariotipo con alta resolución a los niños, encontrándose la delección en 4p en ambos (figura 28).

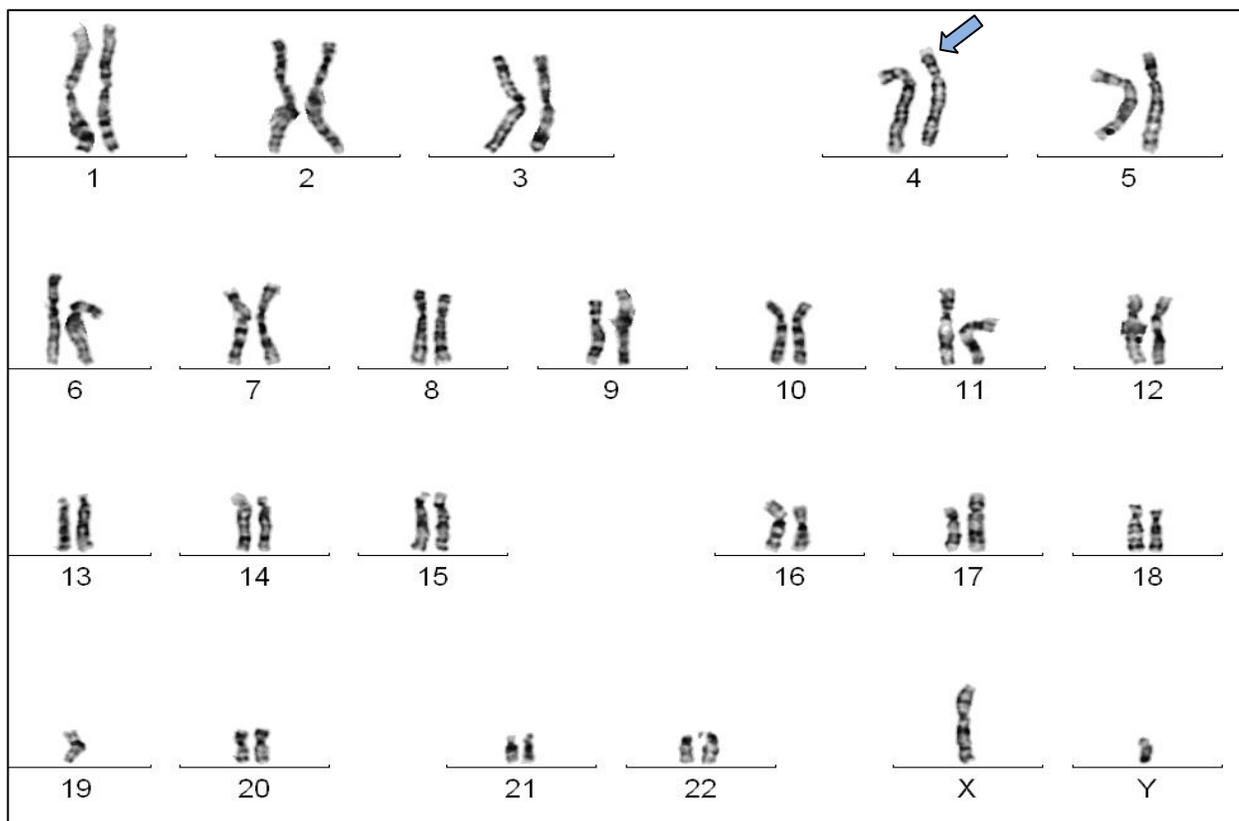


Figura 28. Cariotipo en bandas GTG del propósito la flecha indica la delección en 4p.



Posteriormente se efectuó el estudio citogenético a sus padres y a su hermana sana.

Observándose lo siguiente:

- Padre: Un rearrreglo entre los cromosomas 4 y 15, aparentemente una traslocación recíproca balanceada con fórmula cromosómica: 46,XY,t(4;15)(p16.1;p12?)
- Madre: cariotipo normal 46,XX
- Hija sana: con el mismo rearrreglo que su padre, 46,XX, t(4;15)(p16.1;p12?)

Con estos datos el cariotipo del *propósitus* y su hermana afectada serían:

- 46,XY,der(4),t(4;15)(p16.1;p12)pat
- 46,XX,der(4);t(4;15)(p16.1;p12)pat

Para confirmar los hallazgos citogenéticos se realizó FISH con sondas LSI de la región crítica de WHS y región subtelomérica del brazo corto del cromosoma 4 y para el cromosoma 15 se usaron sondas de región subtelomérica de 15q y sonda LSI PML. Las imágenes se mostrarán más adelante.

Al observar las metafases del padre al microscopio se observó que el derivado del cromosoma 15 se encontraba frecuentemente asociado a los otros cromosomas acrocéntricos y el derivado del cromosoma 4 nunca se encontraba asociado (figura 29), por lo que se sospecho una inserción del fragmento del cromosoma 4 en el cromosoma 15.

Al realizar bandas NOR (figura 30) en el padre, se observaron regiones organizadoras nucleolares en el derivado del 15 lo que confirmó que se trataba de una inserción y no de una traslocación. Por lo que la fórmula para la aberración detectada quedó de la siguiente manera:

- Padre: 46,XY,ins(15;4)(p12;p16.1p16.3)
- Hija portadora de la inserción: 46,XX,ins(15;4)(p12;p16.1p16.3)pat
- Hija con WHS; 46,XX,der(4)ins(15;4)(p12;p16.1p16.3)pat
- *Propósitus*: 46,XY,der(4)ins(15;4)(p12;p16.1p16.3)pat

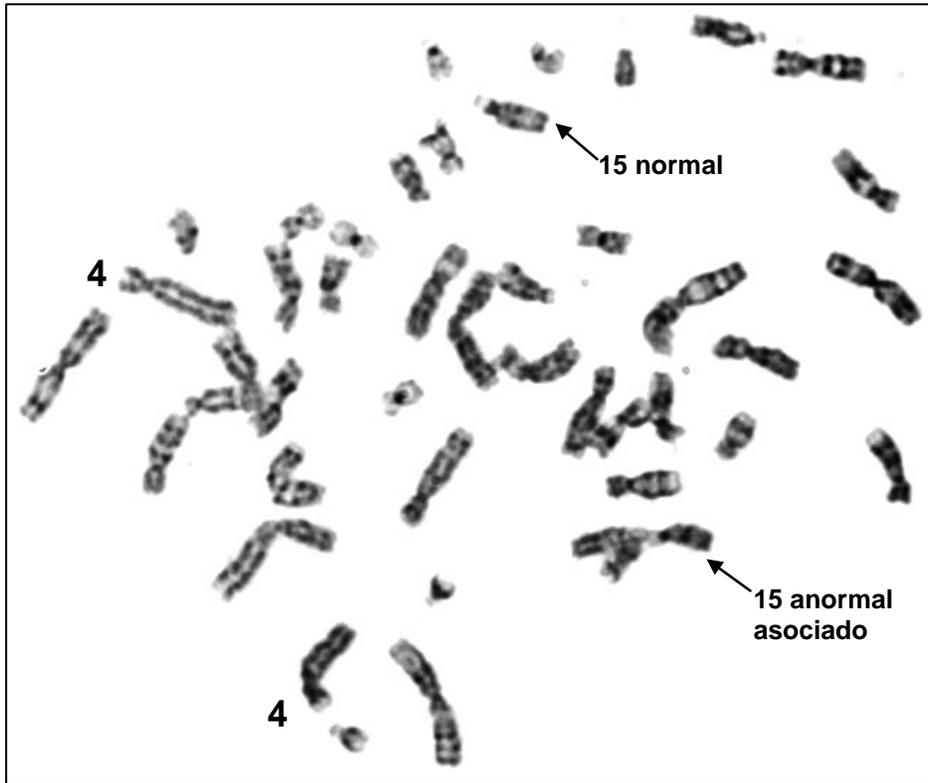


Figura 29. Metafase del padre donde se señala al cromosoma 15 anormal asociado a otros cromosomas acrocéntricos y el par cromosómico 4 no se encuentra asociado. No es posible distinguir el cromosoma 4 anormal debido a la resolución de la metafase.

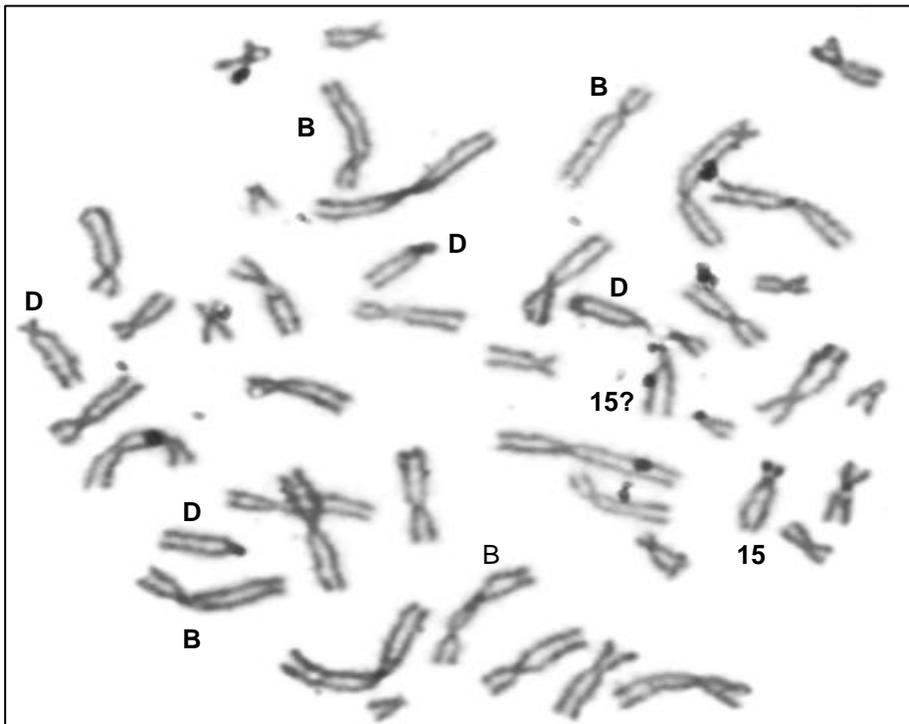


Figura 30. Bandas NOR en una metafase del padre donde se observan todos los cromosomas acrocéntricos del grupo D (cromosomas 13,14 y 15) con bandas NOR positivas y bandas NOR negativas en los cromosomas del grupo B que corresponde a los cromosomas 4 y 5. Se indican los probables cromosomas 15 que no pudieron confirmarse debido a la ausencia de patrón de bandeo.



En las figuras 31, 32 y 33 se muestran: (A) las bandas GTG del padre y de los hijos con el derivado del cromosoma 4 y (B) el FISH donde se confirma que la región subtelómerica del cromosoma 4 del padre se encuentra en el cromosoma 15, y la delección de 4p en los hijos con WHS. Es importante mencionar que en todas las figuras se ha escrito la nomenclatura correcta.

Adicionalmente se realizaron microarreglos de SNP, *Mapping 500K* (Affymetrix, Santa Clara, California) para establecer el tamaño de la delección en ambos niños, como parte de la validación de un protocolo de investigación en pacientes con RM idiopático (coordinado y realizado por los Dres. Susana Kofman, Carlos Venegas y Fernando Fernández del Servicio de Genética del Hospital General de México, Ver Anexo II). Éstos microarreglos contienen sondas de 25 nucleótidos que pueden identificar alrededor de 500 000 SNP. La distancia entre SNP es de 2.5 kbp y tienen en promedio una distancia de 5.8kb. El Estudio de Asociación del Genoma Completo (GWAS) en los dos niños afectados y sus padres permitió confirmar los CNV en los dos niños usando diferentes programas para obtener una mejor definición de la aberración cromosómica presente en los pacientes. Los datos obtenidos de los microarreglos fueron analizados tanto para la determinación del número total de copias de los alelos como de su especificidad con la Herramienta de Análisis del Número de Copias (CNAT). Este análisis confirmó que ambos mostraban sólo los alelos maternos en 4p, del nucleótido 0 al 6 626 861, por lo que tenían una delección terminal de ~6.6Mb (Figuras 34 a la 37).

Cabe señalar que el empleo de esta metodología no permitió detectar el rearrreglo cromosómico en el padre de los pacientes, debido a que se trata de un rearrreglo aparentemente balanceado y esta metodología sólo identifica ganancias o pérdidas de material genético y en caso de que hubiera una ganancia o pérdida críptica, ésta tampoco se identificaría ya que los microarreglos empleados no incluyen secuencias de los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos, por lo que no se puede determinar si hay pérdida de cromatina en el brazo corto del cromosoma 15 debido a la inserción del segmento del cromosoma 4 en la región antes mencionada.

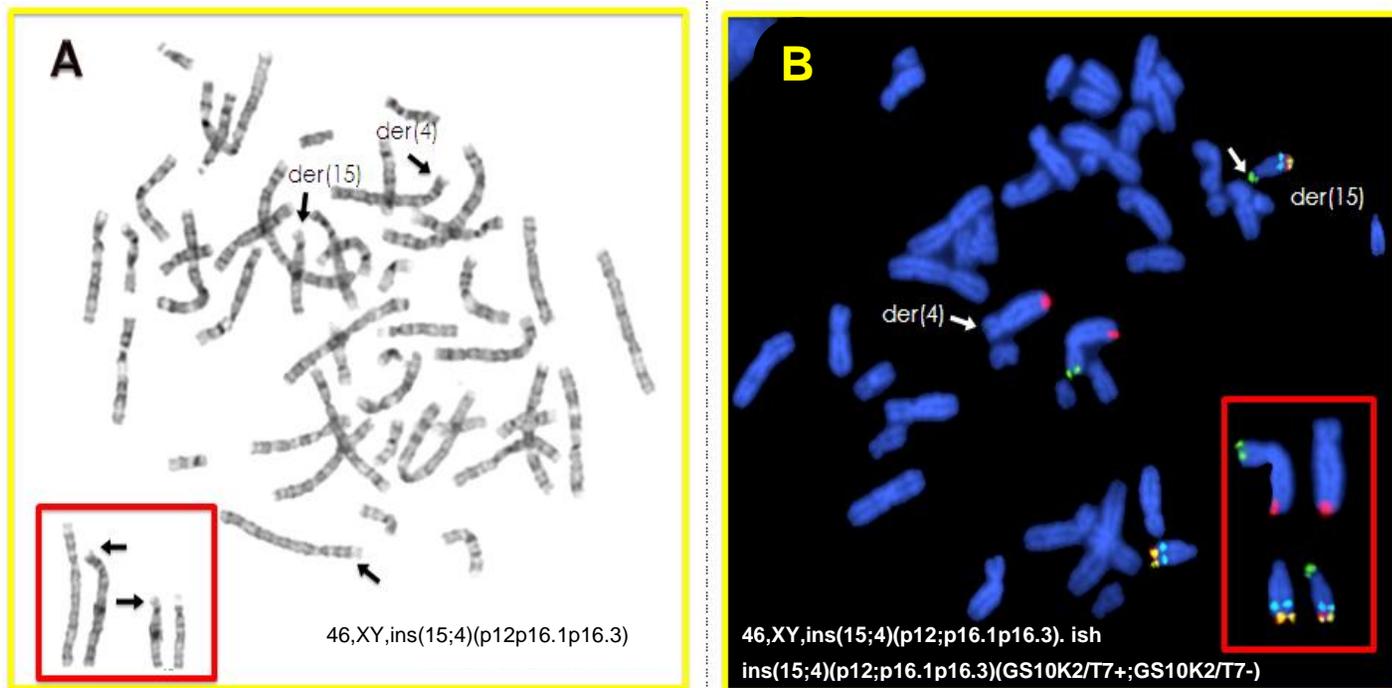


Figura 31. En la figura A se muestra una metafase de alta resolución en Bandas GTG del padre del *propósitus* y en el recuadro rojo se observan los dos derivados indicando las regiones involucradas en cada cromosoma. En la figura B se observa una metafase en FISH donde la región subteloérica del brazo corto del cromosoma 4 se encuentra en el brazo corto del cromosoma 15.

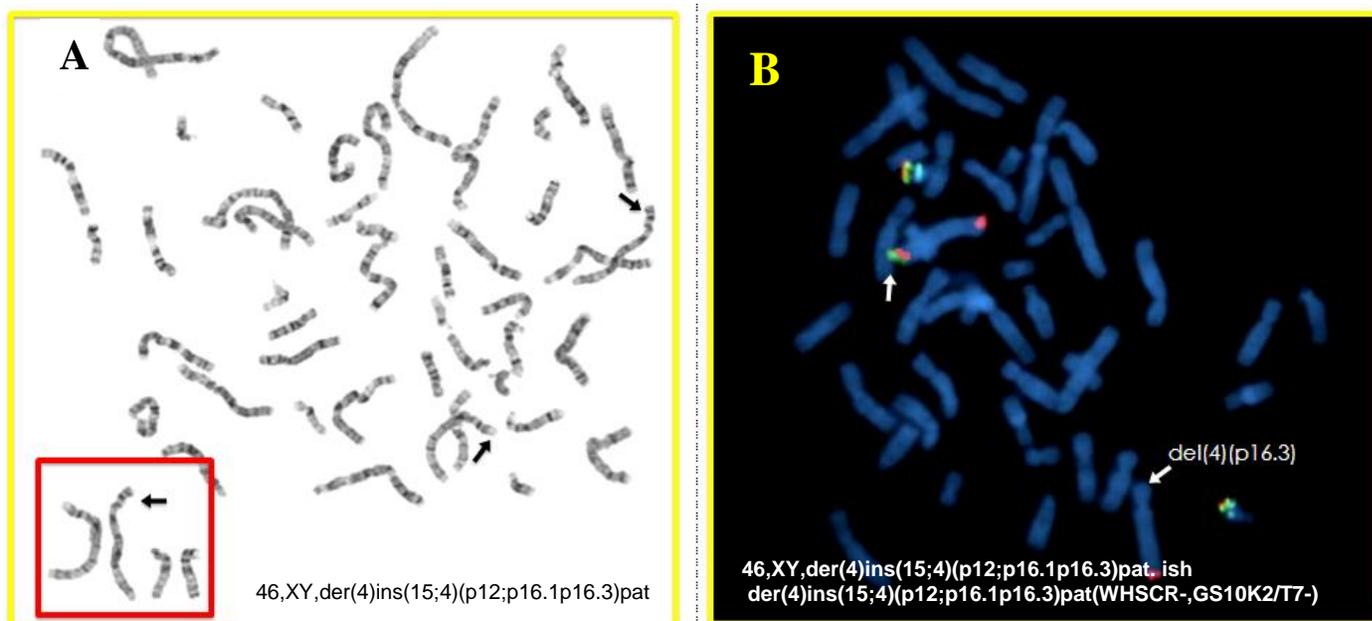


Figura 32. En la figura A se muestra una metafase de alta resolución con Bandas GTG del *propósitus* y en el recuadro rojo se observan el cromosoma derivado, indicando la delección en el brazo corto del cromosoma cuatro y los dos cromosomas 15 normales. En la figura B se observa una metafase con FISH donde la región subteloérica y la sonda de la región crítica de WHS en el brazo corto del cromosoma 4 se encuentran deletadas.

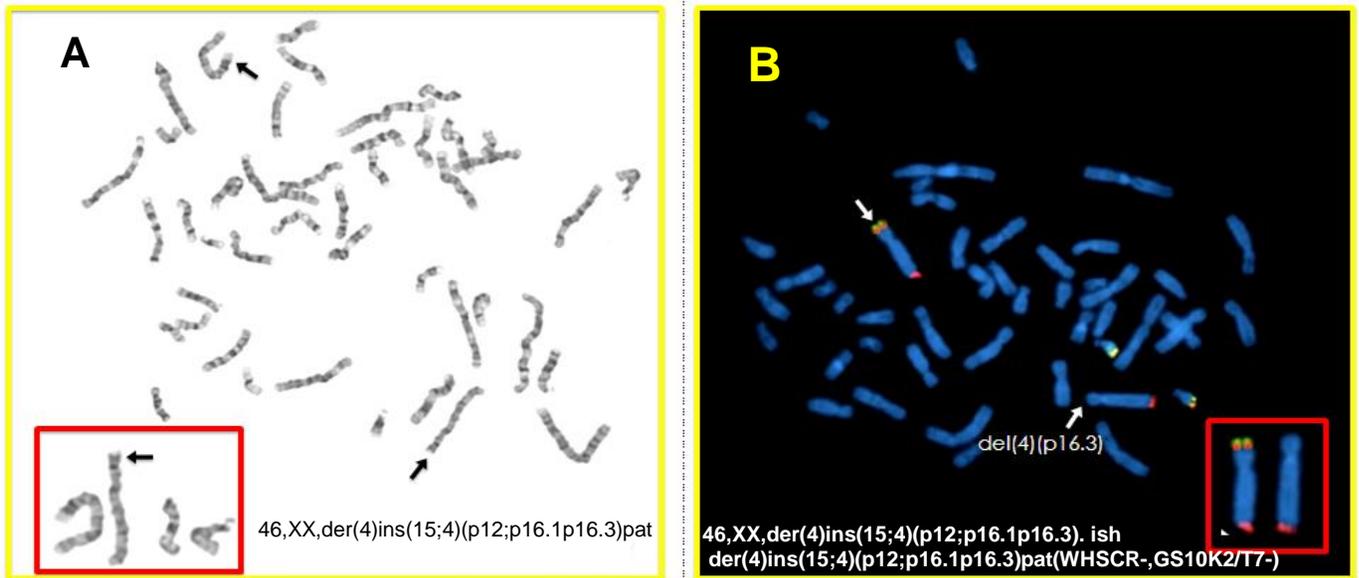


Figura 33. En la figura A se muestra una metafase de alta resolución con Bandas GTG de la hermana del *propósito*, en el recuadro rojo se observan el cromosoma derivado, indicando la delección en el brazo corto del cromosoma cuatro y los dos cromosomas 15 normales. En la figura B se observa una metafase con FISH donde la región subteloamérica y la sonda de la región crítica de WHS en el brazo corto del cromosoma 4 se encuentran deletadas.

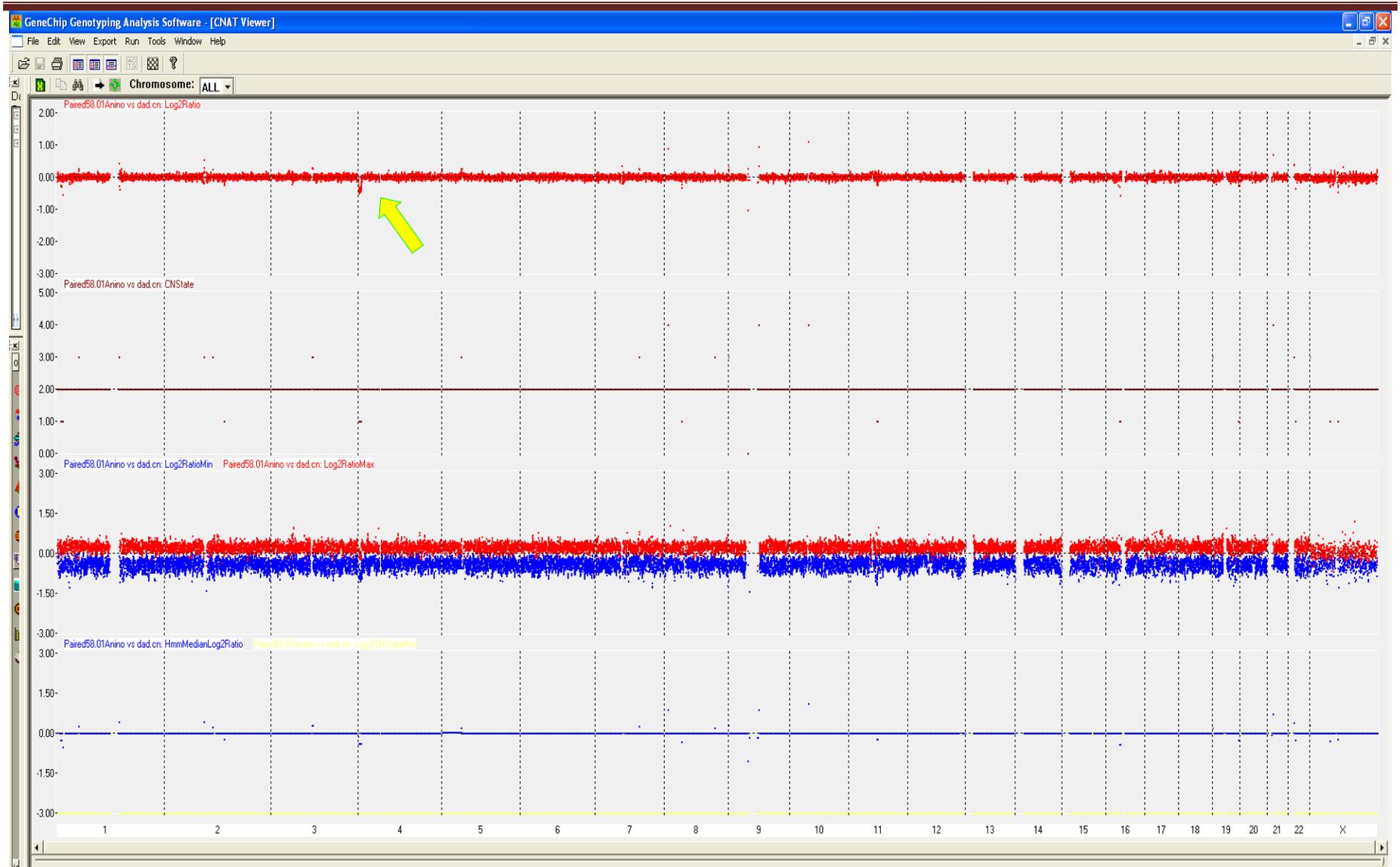


Figura 34. Resultados de los microarreglos del *propósitus*, se muestran los resultados del microarreglo de todos los cromosomas del paciente, la flecha indica la delección de 4p.

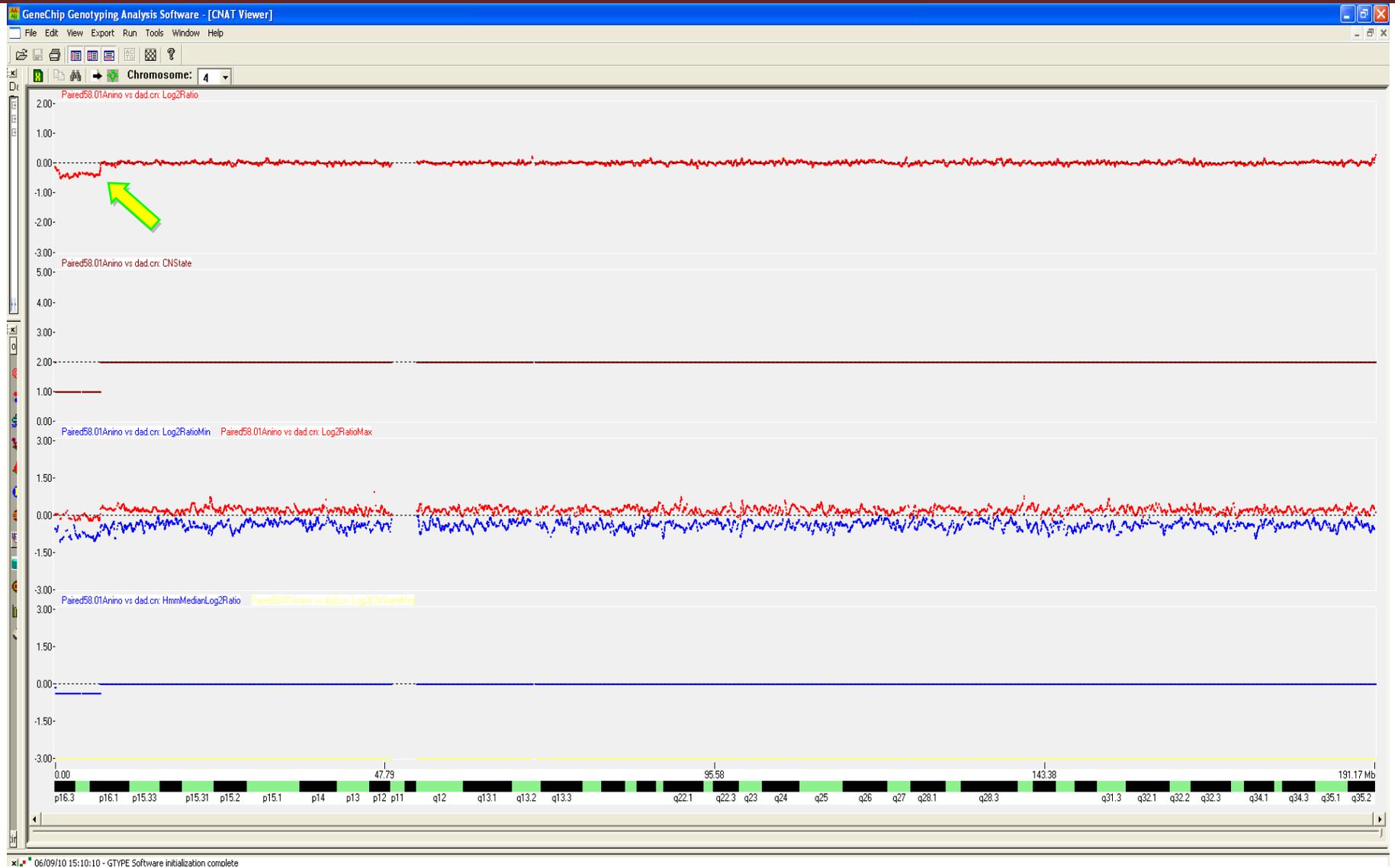
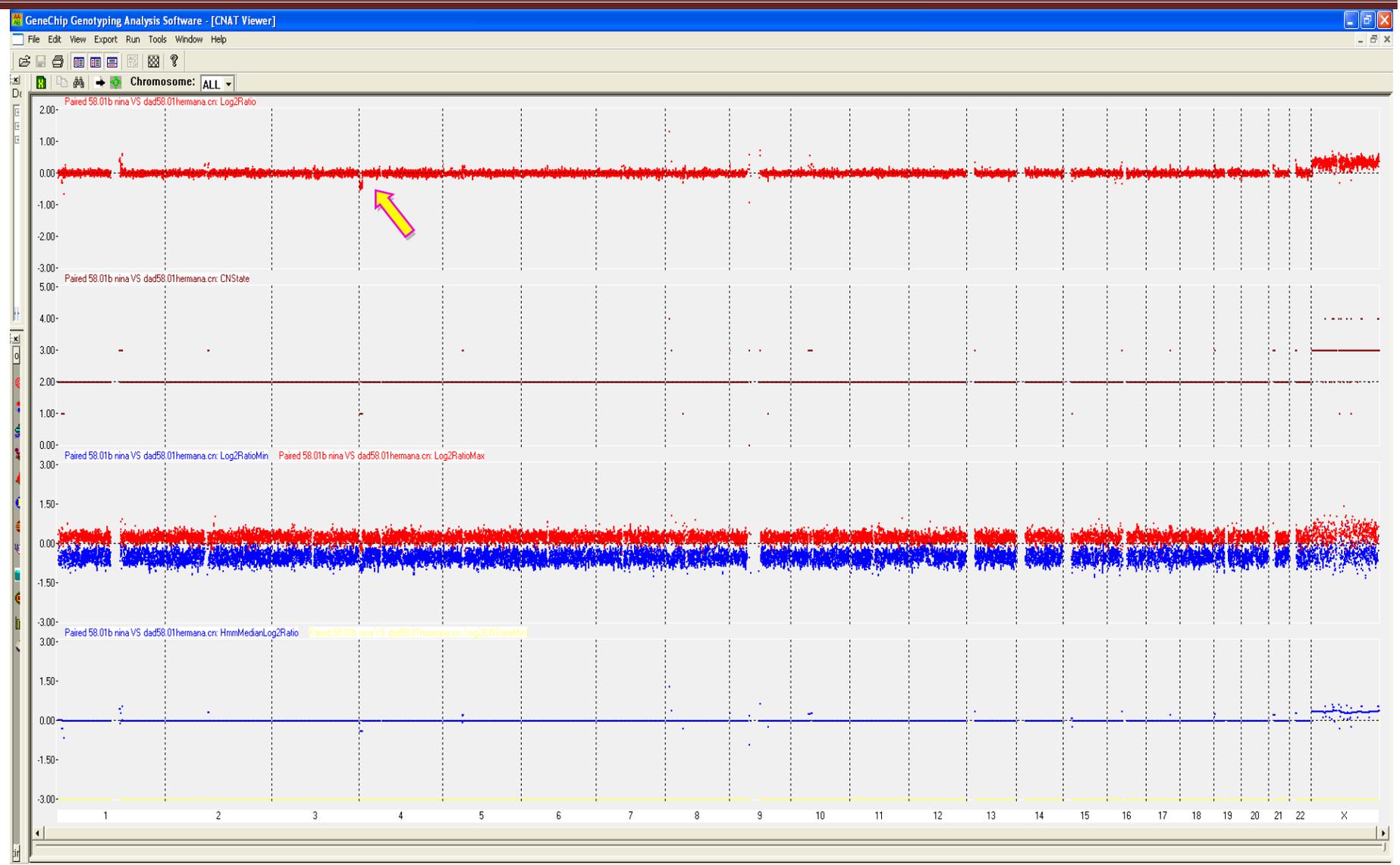


Figura 35. Resultados de los microarreglos del *propósitus*, se observa el microarreglo del cromosoma 4 donde se observa claramente la pérdida de material genético en la porción distal del brazo corto del cromosoma 4 en la banda p16.1.



06/09/10 15:10:10 - GTYPE Software initialization complete

Figura 36. Resultados de los microarreglos de la hermana del paciente, se muestran los resultados del microarreglo de todos los cromosomas, la flecha indica la delección de 4p.

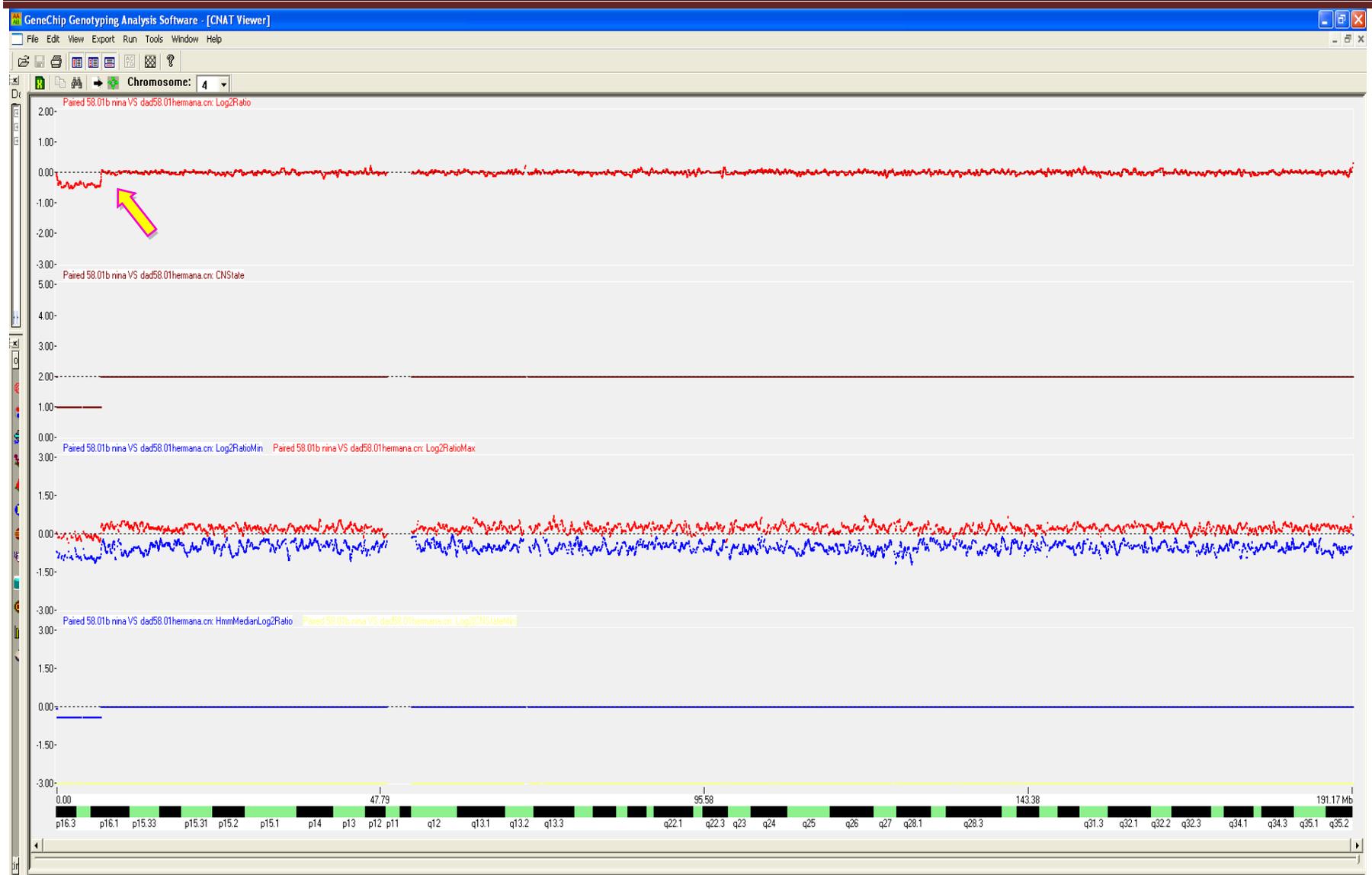


Figura 37. Resultados de los microarreglos de la hermana del paciente se observa el microarreglo del cromosoma 4 donde se observa claramente la pérdida de material genético en la porción distal del brazo corto del cromosoma 4 en la banda p16.1.



7. DISCUSIÓN

Las anomalías cromosómicas constituyen 12% de todas las causas genéticas de RM. La aneuploidía más frecuente es la trisomía 21 [Winnepeninckx, *et al*; 2003]. En los casos estudiados en el presente trabajo la alteración cromosómica más frecuente fue la trisomía 21 (19/59) y además se detectaron otras 6 aberraciones cromosómicas, dos numéricas y cuatro estructurales, en el resto de los pacientes (33/59) el cariotipo fue normal. Se obtuvo una mayor frecuencia a lo reportado debido a que la mayoría de los pacientes estudiados tenían fenotipo característico de algún síndrome en particular, principalmente SD (ver figura 21), pero si consideramos solo aquellos pacientes con RM/RPM no asociado a algún síndrome (ver tabla 13) se encontró que solo 3 de 24 pacientes presentaron alteraciones cromosómicas que corresponde a 12.5%.

En un paciente con RM/RPM las pruebas genéticas están indicadas si:

- ❖ Existe una historia familiar positiva de retraso mental o del desarrollo, de abortos o de mortinatos sin causa explicada.
- ❖ El retraso del desarrollo o mental se asocia con rasgos dismórficos, fenotipo conductual indicativo de alguna alteración cromosómica en particular.
- ❖ Se hayan descartado por completo otras causas [González, *et al*; 2008]

Es importante realizar estudios citogenéticos bajo estas circunstancias para confirmar o descartar una aberración cromosómica en un individuo con fenotipo anormal con RM/RPM.

El análisis de los resultados obtenidos se muestra por rubros de acuerdo a lo mencionado durante la presentación de los resultados.

7.1 MOTIVO DE TOMA DE MUESTRA PARA CARIOTIPO

Como se mencionó anteriormente es de esperarse que de las 59 muestras procesadas, 40% (24/59) corresponda a pacientes con diagnóstico probable de SD (ver figura 21). Debido a su alta incidencia, constituye la causa más frecuente de RM [Winnepeninckx, *et al*; 2003], por otra parte, existe la ventaja de ser de fácil reconocimiento por médicos de otras especialidades y de la población general. El SD es uno de los casos en donde el genetista clínico puede establecer un diagnóstico clínico y usa las pruebas genéticas para confirmarlo y poder brindar un asesoramiento genético adecuado [Moeschler, *et al*; 2006].



El otro 40% corresponde a pacientes con RM/RPM idiopático a los que se realizó cariotipo con el fin de atribuir o descartar alguna causa cromosómica, dato que concuerda con lo reportado [González, et al; 2008].

El resto (20%) corresponde a pacientes cuyo diagnóstico se basa en la sospecha de un síndrome genético en particular (figura 21) o un síndrome cuyas causas se atribuyen a aspectos genéticos, pero aún no se ha elucidado la causa específica. En ellos se realiza cariotipo para descartar alguna aberración cromosómica que pudiera correlacionarse con los datos clínicos del paciente. Estos últimos, en conjunto, contribuyen con un porcentaje menor debido a la baja frecuencia con la que se presentan cada uno de estos síndromes en la población [Knight; 2008].

7.2 ANÁLISIS CROMOSÓMICO

De acuerdo a la tabla 13 y a la figura 22 en los pacientes con SD confirmado, la mayoría (95%) corresponde a trisomía 21 libre, tal como se ha reportado en otros estudios [Devlin, *et al*; 2004/ Luthardt, *et al*; 2001], el otro 5% correspondió a una traslocación (21;21), en los pacientes analizados no hubo evidencia citogenética de mosaicos, lo que se discutirá más adelante.

El análisis cromosómico en pacientes con RM debe realizarse a una resolución de 650 bandas y en casos específicos, 850 bandas [González, *et al*; 2008], en nuestro caso el análisis se realizó con una resolución promedio de 650 bandas. Se leyeron alrededor de 30 metafases, y en algunos casos, se llegaron a analizar menos, debido a las condiciones de cultivo y de procesamiento que impidieron tener una cantidad de material adecuada para el análisis.

Como se observa en la tabla 13 y en la figura 22, se procesaron 24 muestras de pacientes con RM/RPM, encontrándose en 3 anomalías cromosómicas, lo cual es concordante con la bibliografía en donde se reporta que la frecuencia de anomalías citogenéticas en la evaluación de pacientes con RM es de aproximadamente 10% [Moeschler, *et al*; 2006/ Winpenninckx, *et al*; 2003]

En la figura 22 se observa que en aquellos pacientes donde hubo sospecha de un síndrome en particular como resultado de una alteración cromosómica, el cariotipo resultó con la anomalía cromosómica esperada, como es el caso de los pacientes con SD, síndrome de Edwards y síndrome de Wolf Hirschhorn, lo cual demuestra que la elaboración de una buena historia clínica lleva a un diagnóstico clínico certero [Moeschler, *et al*; 2006/ González, *et al*; 2008].



7.3 EDADES

En la tabla 14 y en la figura 23 se observa de acuerdo al diagnóstico y al resultado del cariotipo, las edades materna y paterna que en todos los casos es muy similar, y corresponde a la edad reproductiva, generalmente no se reporta un efecto de edad paterna avanzada [Basel-Vanagaite; 2008].

En cuanto a la edad materna, es bien sabido que hay efecto de edad avanzada en el SD [Robinson, *et al*; 2002], se observa claramente en la tabla 14 y en la figura 22 que la edad materna al nacimiento de los pacientes con SD es ligeramente más alta que la de los pacientes con RM/RPM, en donde no se ha reportado efecto de edad materna avanzada, tanto en pacientes con cariotipo anormal como cariotipo normal con RM/RPM [Basel-Vanagaite; 2008].

El rango de edad de los pacientes estudiados es muy variado, pues va de RN a 49 años, sin embargo, existe una concordancia en el promedio de edades con el diagnóstico clínico. El promedio de edad de los pacientes con SD (Tabla 14 y figura 23) es de 3.51 años, lo que significa que los pacientes fueron referidos a la consulta al Servicio de Genética para un diagnóstico confirmatorio de SD, y que fueron captados desde el nacimiento o durante otras revisiones clínicas por los pediatras, lo que puede confirmarse por el resultado de la mediana, que fue de 2 meses, en cambio, el promedio de edad de los pacientes con diagnóstico de RM/RPM fue 8.17-8.3 años, es decir en edad escolar (mediana 7 años), donde se observó un retraso significativo en el lenguaje, en el aprendizaje y/o en el mismo comportamiento del paciente, y fueron referidos bajo ese diagnóstico a la consulta de Genética donde fueron revisados por un especialista y a partir de la elaboración de la historia clínica y la revisión del paciente se estableció la sospecha de un síndrome en particular realizándose el cariotipo para confirmar y en el resto de los pacientes se realizó el cariotipo para descartar alguna aberración cromosómica como causa del RM/RPM.

7.4 CORRELACIÓN FENOTIPO CARIOTIPO

7.4.1 Pacientes con síndrome de Down

7.4.1.1 Cariotipo normal

El 16% de los casos con diagnóstico de SD tuvieron cariotipo normal, los cuales presentaban menos de 25% de todas las características que sugieren SD, siendo la más frecuente las fisuras palpebrales oblicuas ascendentes, por lo que se sospechó de un probable mosaico y se solicitó cariotipo para descartarlo. En un estudio previamente reportado, se



estudiaron 208 pacientes con sospecha de SD, y 28.7% de los pacientes estudiados resultaron con cariotipo normal, (una proporción más alta debido al número de casos seleccionados y analizados), 49.5% de estos pacientes tuvieron una o más de las siguientes características pliegue palmar transverso, epicanto, hipotonía, fisuras palpebrales oblicuas ascendentes y lengua sobresaliente [Devlin, et al; 2004]

Existen pocos reportes de proporción de sexo en los mosaicos, en algunos estudios se indica que hay un exceso de femeninos [Mutton, et al 1996], en nuestro caso, los pacientes con cariotipo normal con sospecha de SD la proporción femenino masculino es de 3:1 (Tabla 13), lo que nos hace sospechar aún más la probable presencia de mosaicismo, sin embargo, el análisis de cariotipo nos sugiere que si éste estuviera presente, sería en muy baja proporción, ya que con el análisis de 30 metafases se detectan mosaicos de 10%.

Los mosaicos son más comunes que lo que previamente se pensaba, y pueden no presentar características clínicas significantivas, además el diagnóstico que casi siempre se considera en estos pacientes es el retraso en el aprendizaje y cursan sin un diagnóstico definitivo [Devlin, et al; 2004]. En los casos estudiados, el porcentaje de características clínicas es muy bajo, sin embargo no se puede descartar el mosaico para SD pues se leyeron solo 25 metafases por paciente, se requiere un análisis de más células, junto con otras técnicas como FISH para la región crítica de SD para descartar mosaicos en muy baja proporción y para descartar microduplicaciones, e incluso análisis de otros tejidos ya sea por citogenética convencional o por citogenética molecular, donde la proporción de células trisómicas puede ser variable. Por otra parte, el mosaicismo para trisomía 21 puede encontrarse en muy baja proporción (2.3%) incluso en sujetos con fenotipo normal.

7.4.1.2 Cariotipo anormal

a) Trisomía regular. En nuestro estudio, las características clínicas más frecuentes fueron: puente nasal ancho y deprimido, fisuras palpebrales oblicuas, braquicefalia, clinodactilia, diastasis entre 1 y 2 orjejo, cuello corto, paladar alto, pliegue palmar transverso y lengua protuyente, las cuales estuvieron en más de 40% de todos los casos estudiados (Figura 24) y que coinciden con las manifestaciones más frecuentes [Robinson, et al; 2002 / Devlin, et al; 2004]. Se leyeron alrededor de 25 metafases por cada caso y en ninguno de estos hubo historia familiar presuntiva de SD ni de otras aneuploidías, por lo que suponemos cromosoma 21 extra es de origen materno por un error durante la meiosis I debido a ocurre en cerca de 90% de los casos [Luthardt, et al; 2001].



b) Caso con cariotipo 46,XX,+21,t(21;21)(q10;q10).

En un estudio de SD por traslocación, de 157 casos, la proporción de herencia materna: paterna: *de novo* fue de 42:9:106. De estos, 51 casos fueron de t(21;21) o i(21), siendo solo un caso de origen materno y los otros 50 *de novo* [Mutton, et al 1996]. Por lo anterior, podemos inferir que en nuestro caso, el origen de la t(21;21) muy probablemente fue *de novo*, sin embargo, se debe realizar cariotipo a los padres para descartar una traslocación (21;21) en alguno de ellos y poder dar un asesoramiento genético adecuado. Para los portadores sanos de este tipo de rearme, sólo serían viables los productos trisómicos para el cromosoma 21, por lo que el riesgo de recurrencia sería 100%.

7.4.2 Pacientes con diagnóstico de RM/RPM

7.4.2.1 Cariotipo normal

Aunque se ha reportado que la proporción de varones con RM es mayor en relación a la mujeres debido al RM ligado al cromosoma X [González, et al; 2008/ Basel-Vanagaite; 2008]; en nuestro estudio tuvimos una proporción menor de hombres con RM y cariotipo normal (tabla 13). En la revisión de la historia familiar de los pacientes, no se observa ningún tipo de herencia en particular, por lo que es de esperarse que en la población estudiada la proporción no sea sesgada hacia el sexo masculino, sin embargo, cabe mencionar que en la consulta de Genética los pacientes con RM de sexo masculino son más frecuentes que las mujeres con RM. En cuando a los pacientes que tuvieron polimorfismos en el cromosoma Y, son considerados como variantes normales en la población [Moore, et al; 2001]. Sin embargo, se requiere comprobar que el material adicional o faltante sea sólo heterocromatina constitutiva y no incluya material genético que pudiera estar implicado en el fenotipo. Esto puede hacerse mediante unas bandas CBG, debido a que el cromosoma Y corresponde a una herencia holándrica y se puede realizar cariotipo al padre, con el fin de verificar si realmente corresponden a un polimorfismo.

En la tabla 15, se observa que la mitad de las madres de los pacientes estudiados con RM/RPM tienen antecedentes de abortos (1 a 3), lo que las haría candidatas a algunas de ellas a estudios citogenéticos como parte del manejo de las parejas con problemas de fertilidad. El hecho de que además tengan hijos con RM permite suponer que éstos pudieran ser el resultado de la segregación de una aberración cromosómica balanceada en alguno de los padres. El 22% de las madres de los pacientes presentaron amenaza de aborto, sin embargo, en ninguna de sus historias clínicas se indica el manejo que se dió, o si lo atribuyen a un factor



ambiental o teratogénico. En una proporción menor de los expedientes se indica que las madres de los pacientes tuvieron infecciones durante el embarazo, lamentablemente no se marca el tiempo de duración de la infección, el tratamiento ni el agente etiológico, para que pudieran correlacionarse como causa del RM/RPM en el paciente.

En la figura 25 se muestran las características clínicas presentes con más frecuencia en los pacientes con RM y cariotipo normal y se observa que 55% tuvieron alteraciones oculares principalmente hipertelorismo. El examen de las anomalías menores puede sugerir la etiología o contribuir al reconocimiento de un síndrome en particular, lo que lo convierte en un factor importante en el diagnóstico [Moeschler, et al; 2006]. Ninguno de estos pacientes tuvo rasgos característicos de algún síndrome genético en particular; sin embargo, se observa que dos pacientes tuvieron hipoglicemia al nacimiento, por lo que si no se manejó adecuadamente pudo ocasionar el RM/RPM en estos pacientes.

El uso de tecnologías basadas en microarreglos, permite caracterizar CNV y SNP responsables de RM/RPM de origen idiopático [Marilyn, et al; 2009], en un estudio retrospectivo de 36 199 pacientes con RM idiopático y con cariotipo normal 2703 (7.46%) mostraron desbalances cromosómicos detectados por a-CGH, por lo que este tipo de tecnologías aunado a un cariotipo de alta resolución, nos permitirán detectar más anomalías cromosómicas en este tipo de pacientes [Hochstenbach, et al; 2009].

Muchos niños que tienen RM y dismorfias a menudo no tienen malformaciones mayores, simplemente tienen una apariencia inusual comparada con la población general. En particular, las formas leves de RM carecen de rasgos clínicos sugestivos, resultado de la interacción de múltiples genes y factores no genéticos. Durante el desarrollo, el cerebro es más susceptible a la acción de agentes tóxicos que en la edad adulta, debido a que durante la vida prenatal ocurren la mayoría de los procesos de organización y maduración. Por otra parte, la barrera hematoencefálica no está formada completamente hasta el sexto mes del desarrollo intrauterino, por lo que el cerebro en desarrollo está expuesto a la acción de toxinas y otros agentes. Adicionalmente, mutaciones en un gen pueden llevar a desregulación epigenética, modificando la transcripción o el silenciamiento de otros genes necesarios para el desarrollo de las funciones cerebrales. Los mecanismos epigenéticos juegan un papel muy importante en las funciones cerebrales, participando en la capacidad para modificar, reorganizar y remodelar la plasticidad sináptica durante el aprendizaje, la formación de la memoria, y en la respuesta al



daño. La implementación de nuevas tecnologías y herramientas bioinformáticas para la “secuenciación de última generación” (que permite el análisis del genoma completo, el transcriptoma y el interactoma) puede llevarnos a la detección de mutaciones y variaciones estructurales, y ampliar las posibilidades en el diagnóstico de casos de RM idiopático. Entender las vías patológicas que están presentes en el RM inexplicable representa un reto a futuro para incrementar tanto la prevención como posibles terapias [Galasso, et al; 2010].

7.4.2.2 Cariotipo anormal y estudios adicionales

a) Paciente con cariotipo 47,XYY

La prevalencia de niños con cariotipo 47,XYY es de 1 por cada 1000 de estos el 95% tiene un IQ de 73-129 [Stochholm, *et al*; 2010]. El fenotipo en este tipo de pacientes va de normal a una inteligencia ligeramente disminuida, con impedimento verbal que requiere terapia de lenguaje. En la etapa escolar tienen problemas con lectura y escritura, suelen tener hiperactividad, con deterioro de las funciones motoras y talla alta. Los niveles de testosterona son frecuentemente normales y usualmente son fértiles [Ross, et al; 2009]. El paciente de nuestro estudio, presenta retraso en el lenguaje, probablemente como consecuencia del cromosoma Y extra, el resto de las características clínicas no se relacionan con el fenotipo 47,XXY, por lo que podrían deberse a otros factores genéticos. En este caso se realizaron bandas C para corroborar rápidamente la presencia de 2 cromosomas Y al teñir la región de heterocromatina constitutiva del cromosoma Y.

b) Paciente con cariotipo 46,XX,+mar

La t(11;22) es la única traslocación no robertsoniana recurrente, los portadores tienen fenotipo normal, y son identificados después de tener hijos con un der(22) como cromosoma supernumerario o por tener problemas de fertilidad. El tipo de individuos anormales más frecuentes asociados a esta traslocación presentan cariotipo 47,XX o 47,XY,+der(22)t(11;22)(q23;q11.2), conocido como síndrome de Emanuel, el derivado es producto de una segregación 3:1. Los pacientes con este síndrome tienen fenotipo característico que incluye RM severo, malformaciones faciales y defectos cardiacos, además los pacientes masculinos presentan anomalías en genitales. Los cariotipos desbalanceados con 46 cromosomas, producto de la segregación adyacente I, con el derivado del cromosoma 11 o el derivado del cromosoma 22 generalmente no son viables. El riesgo mínimo de recurrencia de nacimientos con cariotipo desbalanceado es de 1.8-5.6% y varía dependiendo del portador de la



traslocación, el riesgo es mayor si el portador es la mujer. En este rearrreglo, los puntos de ruptura están situados en regiones palindrómicas ricas en repetidos de AT, sugiriendo la inestabilidad genómica como mecanismo de formación de éste lo cual hace que el rearrreglo sea recurrente [Emanuel, *et al*; 2008].

La paciente con cariotipo 46,XX,+mar vista en este estudio, tenía RPM, defectos cardiacos, sin marcha, convulsiones, puente nasal deprimido, paladar alto, hiperlaxitud articular, luxación congénita de cadera y escoliosis. La abuela paterna contaba con el antecedente de un aborto posterior al nacimiento del padre. Debido a estos antecedentes y a la morfología del marcador, se sospechó de un probable der(22)t(11;22) y se realizó FISH con sondas subteloméricas 11q (D11S1037) y 11p (D11S2071) del estuche comercial TotalVision de Vysis® para descartar síndrome de Emanuel, el resultado del análisis de 100 núcleos y 20 metafases fue el siguiente:

nuc ish subtel(11)(D11S1037X2)

47,XX,+mar.ish (11)(D11S1037-)

Lo que nos indica que el marcador no contiene secuencias para el brazo largo del cromosoma 11.

Sin embargo, debido a la constitución genómica del cromosoma 22 no se puede descartar que el cromosoma marcador no sea un rearrreglo de esa región cromosómica con otro cromosoma. Se han reportado marcadores pequeños supernumerarios del cromosoma 22 relacionados a abortos espontáneos y RM, uno donde el padre tenía cariotipo 47,XY,+der(22)mat, la madre de éste había tenido 5 abortos y contaba con hermanos sanos [Balkan, *et al*; 2010] y el segundo es un individuo con un der(22)t(8;22)(p22;q11.2)mat, los rasgos clínicos sobresalientes son: puente nasal deprimido, fisuras palpebrales hacia arriba, clinodactilia, RM, e historia familiar de RM [Mundhofir, *et al*; 2010]. Lamentablemente, no se pudo realizar cariotipo a los padres para confirmar esta hipótesis y no contamos con toda la información preconcepcional de nuestros pacientes, pero declararon no haber tenido abortos antes del nacimiento del *propósitus*, sin embargo al tratarse de desbalances genómicos, los abortos pueden producirse durante las primeras semanas de gestación lo que sería clínicamente indetectable si la madre no sospecha de embarazo y lo considera como un retraso menstrual.



d) Paciente con cariotipo 46,XX,add(17)(p13.3)

Esta paciente de 49 años, acudió al Hospital General de México por una cardiopatía y los especialistas pidieron una interconsulta al Servicio de Genética donde se elaboró un árbol genealógico (Figura 26), encontrándose los siguientes hallazgos:

- Los padres de la paciente tuvieron 11 hijos, dos de los cuales fallecieron por causas desconocidas los primeros meses de vida (II.1 y II.6).
- El padre presenta cardiopatía, al igual que la propósita y dos de sus sobrinas (III.3 y III.9).
- Hay un familiar con SD (III.2), pero no se conoce el cariotipo.
- Y existe otro familiar que tiene RM y crisis convulsivas (III.4), con dos hijas aparentemente normales.

La paciente presentó RM, no hablaba, tenía un comportamiento ligeramente agresivo, tetralogía de Fallot, estenosis pilórica, cardiomegalia, ausencia de menarca y caracteres sexuales secundarios, hipoplasia uterina y ausencia de casi todas las piezas dentales, la madre tenía 30 años y el padre 32 al nacimiento del *propósitus*.

En la mayoría de los casos, las anomalías cromosómicas aparentemente balanceadas no están asociadas a fenotipos anormales y pueden transmitirse a través de varias generaciones sin detección, sin embargo, los portadores de este tipo de traslocaciones tienen un riesgo alto de fallas reproductivas [Gribble, *et al*; 2005], debido a estas condiciones se solicitó estudio citogenético a la paciente. El cariotipo arrojó el siguiente resultado:

46,XX,add(17)(p?),

Se solicitó cariotipo a los padres, pero nunca regresaron a consulta, sin embargo, se realizó FISH con sonda 17p13.3 (LIS I) (D17S379) y se confirmó la presencia de la señal en el derivado del 17. Por lo que se comprueba que existe casi en su totalidad el cromosoma 17 con un fragmento de material genético extra de origen desconocido. Se puede descartar además, la probabilidad de ser un isocromosoma de 17q o una duplicación de 17p ya que si fuera un isocromosoma la paciente tendría fenotipo de síndrome de Smith Magenis y de Mieller Diecker, y si se tratara de una duplicación presentaría estigmas de síndrome de duplicación de 17p.

Existe un reporte de trisomía parcial de 9q22.3 por microduplicación donde el afectado presenta estatura baja, discapacidad intelectual, microcefalia, estenosis pilórica, dismorfias faciales y defectos cardiacos, con una historia familiar de tres miembros con RM, retraso en el crecimiento y dismorfias faciales, asociando al gen *PTCH1* y otros genes al fenotipo del



paciente [Izumi, et al; 2011]. Existen otras regiones cromosómicas relacionadas con la estenosis pilórica como 16p13p12, 16q24, que son de carácter monogénico, y también se ha encontrado asociación en 11q14q22 y Xq23 [Everett, et al; 2008], lo que podría sugerirnos algún probable rearrreglo con estos cromosomas relacionados a estenosis pilórica. No se han reportado casos con anomalías cromosómicas relacionadas con hipoplasia uterina y estenosis pilórica. Aún cuando se hubiera realizado cariotipo a sus padres el rearrreglo pudo ser *de novo*, por lo que en esta paciente sería importante aplicar otras metodologías, para poder determinar el origen del material adicional, como aCGH o microarreglos de SNP.

7.4.3 Pacientes con Síndromes Relacionados a RM

7.4.3.1 Cariotipo normal

Síndrome de Patau. La paciente de dos meses de edad tenía labio y paladar hendido, dextrocardia e insuficiencia aórtica. Al no tener todos los rasgos clínicos característicos de la trisomía trece se sospechaba de un mosaico, el cual fue descartado al resultar el cariotipo normal analizándose 30 metafases. Por lo que las malformaciones presentes pudieron ser el resultado de otras causas como síndromes monogénicos o multifactoriales.

Síndrome de X frágil. Se realizó cariotipo convencional en dos pacientes con diagnóstico de X-frágil, solo se contó con un expediente, los antecedentes familiares indican un primo hermano con RPM y una tía ambos por rama paterna con trastorno mental, sin embargo, la historia familiar no es sugestiva de RM ligado al X y por el lado materno no había antecedentes de RM.

La prueba citogenética para diagnosticar el Síndrome de X frágil consiste en someter la muestra a un cultivo deficiente de folatos para que se expresen los sitios frágiles FRAXA y FRAXE, sin embargo, esta técnica es tardada, tiene un alto riesgo de falsos negativos y puede no detectar portadoras [Steiner, et al; 2005]. El método actual para descartar el síndrome de X frágil consiste en el estudio molecular de la expansión CGC en el gen *FMR1* (Xq27.3) [González, et al; 2008]. Sin embargo, se debe realizar cariotipo con bandas GTG como parte del protocolo para descartar una alteración cromosómica relacionada con el RM.

El síndrome de X-frágil es la causa heredada más común de RM en varones y la segunda de causa genética, sólo después del síndrome de Down. Aproximadamente 2% de todos los pacientes con RM (de ambos géneros) tiene una mutación en este gen (con una prevalencia en el rango de 0 a 28.6%), por lo que debe ser considerado en pacientes con retraso



mental inexplicable en presencia de una historia familiar positiva, un fenotipo consistente y ausencia de anomalías cromosómicas aparentes [Moeschler, et al; 2006].

Los dos pacientes estudiados tuvieron cariotipo normal, lo que era esperado, debido a que no se realizó la técnica con medio deficiente de folatos para la expresión del sitio frágil, se leyeron solo 30 metafases para descartar alguna otra aberración cromosómica. A ambos pacientes se les realizaron las pruebas moleculares para el diagnóstico del síndrome, pero lamentablemente desconocemos los resultados.

Síndrome de Beckwith Wiedemann. El síndrome de Beckwith Wiedemann se caracteriza por sobrecrecimiento de músculos, lengua, corazón, hígado y riñón. En 50% de los casos se deben a alteraciones en la regulación epigenética de genes improntados en la región 11p15.5. En 30-50% de los pacientes se presenta hipoglucemia, lo que da por consecuencia RM si no se atiende a tiempo [Miller, et al; 2001b], del caso que ingreso con este diagnóstico, no contamos con expediente clínico, sin embargo, el análisis citogenético se realizó con el fin de descartar una alteración cromosómica relacionada con el brazo corto del cromosoma 11 en la región p15.5, ya sea una deleción o una duplicación o incluso un rearrreglo balanceado que altere la regulación de los genes improntados en esa región. El cariotipo fue normal, lo que no descarta mutaciones o microdeleciones en el centro de impronta, alteraciones epigenéticas ni DUP que nos lleve a este fenotipo.

Síndrome de Prader Willi. Para la confirmación del diagnóstico se deben realizar estudios de metilación, con lo cual se corroboran 99% de los casos, Sin embargo para poder brindar un asesoramiento genético adecuado debe establecerse la causa del síndrome. Debido a que 70% de los pacientes presenta deleción del cromosoma 15q11.2 paterno [Gardner, et al; 2004e], se realiza el FISH para la región crítica, cuando los estudios de FISH son normales, deben indicarse estudios para descartar tanto la disomía uniparental (en el 28% de los casos) como mutaciones o alteraciones en el centro de impronta (1%) [González, et al; 2008]. En nuestro caso, se realizaron los estudios de metilación, sin embargo desconocemos los resultados. En paralelo se realizó cariotipo convencional para descartar una probable causa cromosómica relacionada al fenotipo. El paciente estudiado de 11 años, con abdomen globoso y RM tuvo cariotipo normal.



Síndrome de Angelman. El síndrome de Angelman tiene un retraso mental severo, convulsiones, ausencia del habla y risas inapropiadas [Miller, *et al*; 2001b], el 70% de todos los casos son debidos a deleciones en el cromosoma materno y 10-15% se deben a mutaciones en el gen *UBE3A* [Bugghenout, *et al*; 2009].

Otras condiciones clínicas que pueden ser similares a las características clínicas del síndrome de Angelman, en especial durante la infancia, son el síndrome de Rett, la deleción terminal 22q13.3, el síndrome de Mowat-Wilson, el síndrome de retraso mental ligado al cromosoma X con alfa talasemia (ATR-X), el síndrome de Lennox-Gastaut, la encefalopatía estática con retraso mental, el autismo infantil y la parálisis cerebral no específica [González, *et al*; 2008]

En el caso estudiado, la paciente ingresó por síndrome de Angelman y se le realizó cariotipo bajo el mismo procedimiento que en el caso del paciente con síndrome de Prader Willi. Sin embargo, debido a la edad de la paciente (3 años) y a los datos clínicos presentes, se decidió realizar el diagnóstico diferencial de síndrome de Rett. Estas pacientes a partir de los 6 a los 18 meses, cursan con una desaceleración del crecimiento de la cabeza, tienen comportamiento autista y movimientos característicos de las manos. El diagnóstico se hizo por búsqueda de mutaciones en el gen *MECP2* las cuales se encuentran en aproximadamente 70-80% de todos los casos de síndrome de Rett clásico [Ballestar, *et al*; 2005]. El diagnóstico fue positivo a mutación en *MECP2* y como era de esperarse el resultado del cariotipo fue normal.

Síndrome de Aicardi. Las características principales de este síndrome son encefalopatía, lupus eritomatoso, problemas neuronales, microcefalia y RPM. Se han identificado mutaciones en los genes *AGS1*, *AGS2*, *AGS3*, *AGS4*, y *AGS5*, que codifican para una endonucleasa, y que se encuentran en los cromosomas 3p21, 13q14, 11q13, 19p13 y 20q11 respectivamente [Crow, *et al*; 2009]. Al paciente que ingresó con este diagnóstico, cuyas características clínicas incluían: hernia umbilical, sepsis, esplenomegalia e insuficiencia respiratoria, se le realizó cariotipo para descartar alguna aberración cromosómica que implicara alguna de las regiones cromosómicas antes mencionadas, sin embargo, el cariotipo fue normal.

Síndrome de Marden Walker. Se caracteriza por micrognatia, paladar hendido, orejas de implantación baja, contracturas articulares congénitas, disminución de la masa muscular y retraso psicomotor, aunque hay muy pocos pacientes reportados, se cree que la herencia de



este síndrome es autosómica recesiva [Garavelli, et al; 2000]. En nuestro caso, al paciente se le realizó cariotipo para descartar alguna aberración cromosómica que implicará genes relacionados al fenotipo, el cariotipo también fue normal.

Cabe señalar que la realización de cariotipo en algunos pacientes con síndromes monogénicos ha llevado a la localización de los genes implicados al detectar en ellos principalmente rearrreglos cromosómicos que implican rompimientos en los *loci* de los genes implicados [Strachan; 2006b].

7.4.3.2 Cariotipo anormal y estudios adicionales

Síndrome de Edwards. Aunque no fue posible revisar el expediente de esta paciente, era de esperarse que el cariotipo resultara anormal, dadas las características clínicas que describen esta aneuploidía. El cariotipo resultó 47,XX,+18, alrededor del 80% de los nacidos vivos con esta aneuploidía son mujeres y la esperanza de vida es de 10 meses [Figuera, et al; 2001]

Pacientes con Síndrome de Wolf Hirschhorn (WHS).

El *propósitus* y su hermana (Figura 27A y 27B respectivamente) tenían fenotipo clínico de Síndrome de Wolf Hirschhorn (Tabla 16). Por lo que se realizó cariotipo de alta resolución para confirmar la delección. Se ha comprobado que 45% de los casos son producto de una traslocación críptica [Aviña, et al; 2008] por lo que también se les realizó cariotipo a los padres para corroborar (dado que se trata de un caso familiar) si alguno de ellos era portador de un rearrreglo cromosómico balanceado. Los resultados de las pruebas citogenéticas y genómicas (Figuras 28-37) demostraron que el padre era portador de una inserción, en la cual, la región distal del brazo corto del cromosoma 4 se encontraba en la región NOR de uno de sus cromosomas 15, con cariotipo, 46,XY,ins(15;4)(p12;p16.1p16.3), por lo que los hijos afectados presentan solamente la monosomía 4p al haber recibido los cromosomas paternos der(4) y 15 normal, con cariotipos 46,XY,der(4)ins(15;4)(p12;p16.1p16.3)pat y 46,XX,der(4)ins(15;4)(p12;p16.1p16.3)pat respectivamente como producto de una segregación adyacente I (Figura 38). La hija con fenotipo normal recibió ambos derivados paternos por lo que su cariotipo es: 46,XX,ins(15;4)(p12;p16.1p16.3) siendo una portadora balanceada al igual que su padre producto de una segregación alterna (figura 38). Los riesgos de recurrencia para el padre y para la hija portadora es de: 25% de productos con cariotipo normal, 25% portadores balanceados como ellos, 25 % con WHS y 25% con trisomía de 4p. Otro tipo de segregaciones como la adyacente 2, 3:1 o 4:0 darían productos no viables.

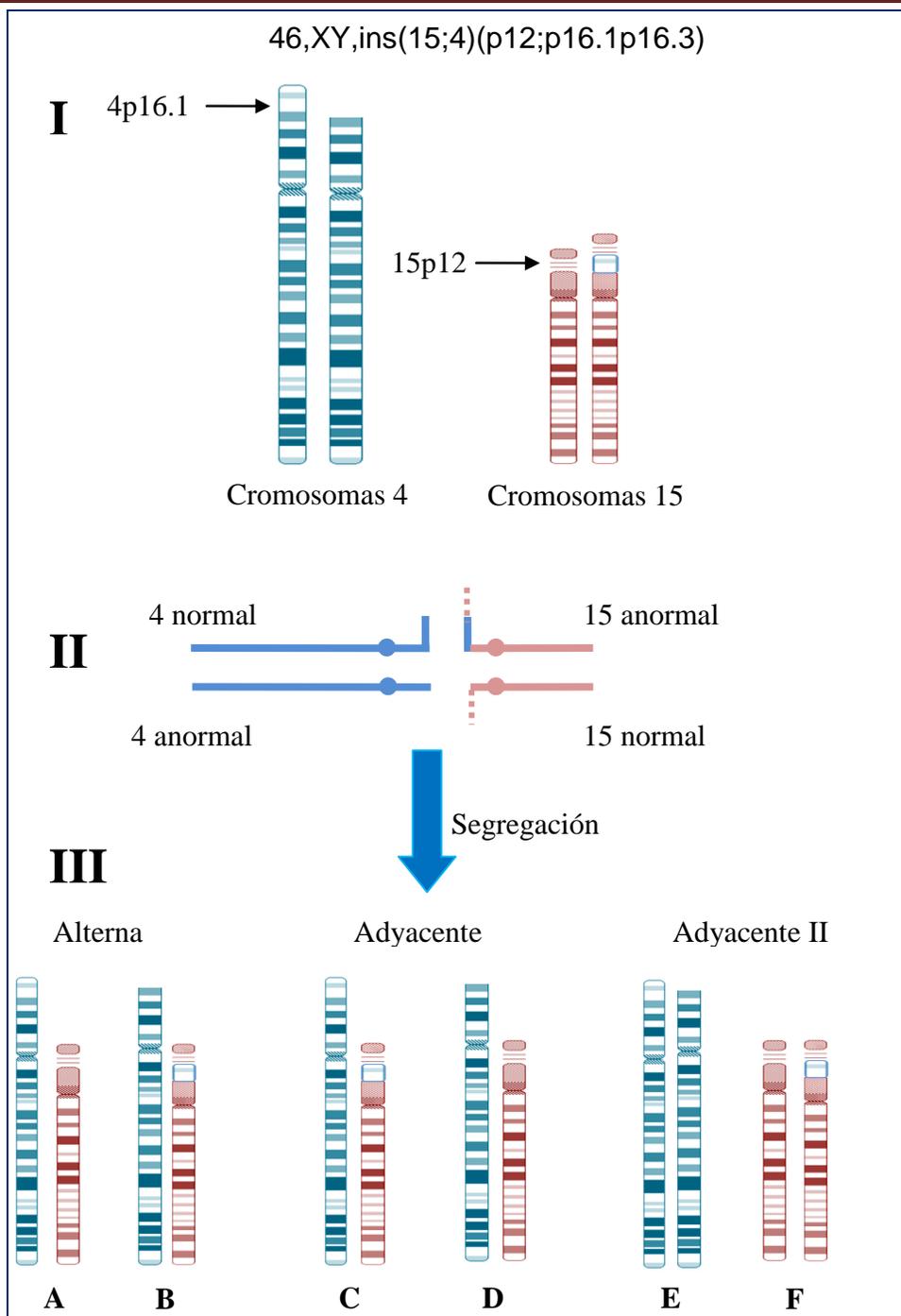


Figura 38. Diagrama de las segregaciones de los portadores de la inserción, la figura I muestra ambos pares cromosómicos del lado izquierdo el cromosoma normal indicando los puntos de ruptura y del lado derecho el cromosoma anormal. La figura II corresponde a la cruz de paquiteno que se forma durante la meiosis. La figura III corresponde a las posibles segregaciones. El gameto A da origen a un individuo normal, el B a un portador de la inserción, el C corresponde a un individuo con trisomía parcial de 4p, el D a un individuo con deleción de 4p y presentaría WHS. Las figuras E y F corresponden a gametos que al fecundarse darían productos con trisomías y monosomías casi completas, por lo que no serían viables, al igual que las segregaciones 3:1 y 4:0 que no se muestran en la figura.



Existen escasas publicaciones de familias con recurrencia de WHS, los casos publicados principalmente son derivados de traslocaciones entre el brazo corto del cromosoma 4 y otros cromosomas, algunos detectados por citogenética convencional y otros detectados y caracterizados a partir de los resultados de aCGH (tabla 17). Generalmente no nace otro niño con WHS cuando se detecta como portador a alguno de los padres debido al diagnóstico prenatal.

TABLA 17. ALTERACIONES CROMOSÓMICAS RELACIONADOS A WHS DETECTADAS A PARTIR DE CASOS FAMILIARES Y DEL USO DE MICROARREGLOS		
Alteración cromosómica	Historia Familiar	Referencia
46;XX,der(4)t(4;10)(p16.3;p15)mat t(2;4)(q37;p15)	WHS por TAR y FISH	Goodship, et al; 1992
46,XY,der(4),t(4;8) (p15.32;p22)	2 afectados WHS, 4 generaciones	Wheeler, et al;1995
46,XY,der(4),t(4;8) (p15.32;p22)	Caso familiar WHS	Wheeler, et al; 1995
der(4)t(4;21)(p16.3;q22.1)	Tres afectados trisomía parcial 21 y monosomía parcial 4	Sebastio, et al; 1996
t(1;4) (q44;p16.3) t(4;8)(p16.2;p23.1) t(4;21)(p16.3;q22.3)	Historias familiares con deleciones y duplicaciones	Partington, et al; 1996
Hermanos 45,XX/XY,der(4)t(4;22)(p16.3;q11.2)mat,-22	WHS con VCF	Reddy, et al; 1996
46,XX,der(4)t(4;11)(p16.3;p15.5)pat	Cinco generaciones, varios afectados WHS	Reid, et al; 1996
t(4;11)(p16.1;q23.3)	4 abortos, una hija WHS	Panasiuk, et al; 2007
46,XX, der(4)t(4;15)(p16.3;p11.2) 46,XY,der(4)t(4;15)(p16.2; p11.2) 46,XY,der(4)t(4;14/22)(p16.1;14/22)	WHS, casos familiares	South, et al; 2008
der(4)t(4;11)(p16.1;q23.3)	WHS y otras malformaciones	Iwanowski, et al;2011

A la fecha, solo hay un caso publicado con inserción del cromosoma cuatro (46,XY,ins(2;4)(p24;p15.3p13))[Asamoah, *et al*; 1998], sin embargo, el paciente no está afectado con WHS debido a los puntos de ruptura del rearreglo cromosómico de este caso.

En un estudio de 33 pacientes por aCGH se encontró que 15 fueron producto de traslocaciones desbalanceadas, que fueron detectadas por una trisomía parcial de otro cromosoma y monosomía parcial de 4p, los brazos cortos de los cromosomas 8,11 y 15 fueron los más frecuentes, 5/15 fueron heredados y el resto *de novo* [Panasiuk, et al; 2007].

El uso de aCGH para caracterizar síndromes de deleción como el WHS presenta ciertas ventajas, caracteriza la monosomía en los pacientes que previamente se ha detectado la deleción, ya sea por cariotipo o por FISH, además, puede revelar traslocaciones crípticas desbalanceadas. Por otra parte, brinda información adicional del tamaño aproximado de la deleción y duplicación en el caso de traslocaciones desbalanceadas que no pueden caracterizarse usando FISH de regiones subtelo méricas. Esta metodología ha permitido



demostrar que las traslocaciones en los pacientes con WHS son más frecuentes que lo que previamente se reportaba [Panasiuk, *et al*; 2007].

Se ha buscado una correlación entre las manifestaciones clínicas y el tamaño de la deleción en el WHS, de algunas características, si ha sido posible hacer la correlación. Sin embargo, hay reportes de pacientes atípicos que parecen tener manifestaciones mayores o menores que las predichas por el tamaño de la deleción. La hipótesis que se plantea en algunos de estos casos, es que puede ser debido a traslocaciones desbalanceadas no reconocidas, donde el material trisómico puede ser el responsable de la desviación en las manifestaciones clínicas [South, *et al*; 2008].

Por otra parte, el aCGH no reconoce traslocaciones desbalanceadas que involucran los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos, estas regiones no están presentes en las plataformas de aCGH, lo que se considera como una desventaja, ya que como se señaló anteriormente, estas traslocaciones no son raras (alrededor del 20%) [South, *et al*; 2008].

En otro estudio, de un total de 11688 individuos con discapacidad mental y cariotipo normal, a quienes se les realizó FISH con sondas subteloméricas, 15 pacientes presentaron deleción de 4p y en 7 de éstos (46.6%) la deleción fue parte de una traslocación desbalanceada [Panasiuk, *et al*; 2007]. En otra serie, de 145 traslocaciones identificadas, 17 (11.7%) involucran brazos cortos de cromosomas acrocéntricos translocados en otros cromosomas [South, *et al*; 2008].

Por otra parte, se han reportado estudios de diagnóstico prenatal usando microarreglos a partir de la detección de alteraciones cromosómicas en los fetos. Así se reportó un producto con WHS por edad materna avanzada, el resultado del microarreglo y el cariotipo fue 46,XY,der(4)t(4;10)(p16.1;p15.3),dup(8)(p21.3p22), el cariotipo convencional y los microarreglos de los padres resultaron normales [Chen, *et al*; 2011]. Sin embargo, se deberían realizar otras pruebas citogenéticas para descartar que los padres sean portadores de un rearrreglo balanceado.

La no detección de rearrreglos balanceados y desbalances en brazos cortos de cromosomas acrocéntricos se convierte en una limitación de los microarreglos en la caracterización de los rearrreglos genómicos en pacientes con WHS y otras patologías. Por ello, es fundamental que se realice cariotipo junto con otras técnicas convencionales y análisis con FISH tanto en el afectado como en los padres, los cuales pueden ser portadores de traslocaciones crípticas que pueden conferir un riesgo de recurrencia significativo.



Es importante señalar, como se demostró en los casos estudiados, que una revisión clínica exhaustiva y la integración de un diagnóstico presuntivo, es indispensable para que el empleo de las técnicas citogenéticas, moleculares y genómicas puedan hacerse de manera adecuada y obtener un diagnóstico preciso en los pacientes con RM con o sin defectos congénitos asociados. Esto permitió otorgar un asesoramiento genético a los pacientes y a sus familias.

Los padres de pacientes con RM, frecuentemente preguntan por un riesgo de recurrencia en un futuro hijo. Si el paciente tiene un síndrome conocido y caracterizado o si los padres son portadores de algún rearrreglo cromosómico, el riesgo de recurrencia puede ser dirigido e incluso ofrecerles diagnóstico prenatal. Para pacientes con RM no sindrómico en quienes no se ha detectado una alteración genética, y no hay historia familiar positiva, el riesgo empírico de RM para un próximo hijo es de 8% [Tzschach, *et al*; 2007]



8. CONCLUSIONES

- ❖ La elaboración de una buena historia clínica y el análisis exhaustivo de las características fenotípicas del paciente con RM son fundamentales para establecer un diagnóstico presuntivo y para realizar pruebas genéticas dirigidas hacia la confirmación de dicho diagnóstico.
- ❖ De 59 pacientes estudiados 27 (45.7%) tuvieron cariotipo anormal, de éstos, 77.7% (21/27) corresponde a pacientes con Diagnóstico de síndrome de Down, 11.1% (3/27) a pacientes con diagnóstico de RM/RPM no sindrómico, 7.4% (2/27) a pacientes con diagnóstico de síndrome de Wolf Hirshhorn y 3.7% (1/27) a síndrome de Edwards.
- ❖ Es importante realizar el cariotipo a los pacientes con diagnóstico de SD para confirmar la trisomía 21 libre y poder descartar alteraciones cromosómicas y mosaicos en este tipo de pacientes ya que el resultado de cariotipo repercute directamente en el asesoramiento genético. Cuando se detecta una alteración cromosómica es necesario realizar cariotipo a los padres para identificar a un probable portador y dar asesoramiento para riesgos de recurrencia de la alteración encontrada. También es importante contar un número significativo de células para poder descartar mosaicos y dar el asesoramiento adecuado.
- ❖ Los pacientes con diagnóstico de SD con cariotipo normal, requieren de pruebas adicionales como FISH para la región crítica de SD, y el análisis de un mayor número de metafases y de otro tejido para descartar un probable mosaicismo que este relacionado con el fenotipo.
- ❖ Se pudieron identificar dos rearrreglos cromosómicos en los pacientes con RM/RPM, en uno un rearrreglo desbalanceado y en el otro un cromosoma marcador. A estos se les realizaron pruebas adicionales para caracterizar el rearrreglo, sin embargo, aunque fueron informativas, no fueron concluyentes para determinar el origen del material genético extra.
- ❖ Los pacientes con Diagnóstico de RM/RPM que tuvieron cariotipo normal, requieren pruebas adicionales, como técnica de alta resolución (más de 650 bandas), FISH para regiones subteloméricas, aCGH y/o microarreglos para SNP o CNV para descartar ganancias y/o pérdidas submicroscópicas, o desbalances genómicos.



- ❖ El resultado de cariotipo normal en los pacientes con sospecha de algún síndrome monogénico en particular, resulta informativo para el genetista clínico, pues se descartan alteraciones cromosómicas adicionales al diagnóstico del paciente o permiten la identificación de alguna asociada al padecimiento.
- ❖ El caso familiar de WHS es un ejemplo claro de la complementación de todas las técnicas y tecnologías con las que contamos actualmente para identificar y caracterizar rearrreglos cromosómicos determinando el tamaño de las regiones implicadas.
- ❖ Las técnicas de citogenética convencional, son herramientas primordiales para el estudio de pacientes con RM, ya que nos permiten identificar ganancias y pérdidas de material genético, traslocaciones, inversiones y otros rearrreglos cromosómicos balanceados.
- ❖ Las técnicas de citogenética molecular como el FISH, aCGH y aSNP nos permiten detectar ganancias y pérdidas submicroscópicas de material genético, que no pueden observarse por citogenética convencional, sin embargo, no pueden detectar rearrreglos balanceados ni rearrreglos que involucren brazos cortos de cromosomas acrocéntricos, por otra parte, todas alteraciones que se encuentren por microarreglos, deben confirmarse por otras técnicas moleculares como el FISH.



9. BIBLIOGRAFÍA

1. Asamoah A, Nandi KN, Prouty L, Thurmon TF, Chen H. (1998) A case of insertional translocation involving chromosomes 2 and 4. *Clin Genet*; 53(2):142-6.
2. Atención Integral de la Persona con Síndrome de Down (2007), Secretaria de Salud. (http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/Sindrome_Down_lin_2007.pdf)
3. Aviña JA, Hernández DA. (2008) Síndrome de Wolf-Hirschhorn: Microdelección distal del brazo corto del cromosoma 4. *Rev Chil Pediatr*; 79 (1): 50-53
4. Balkan, İsi H, Gedik A, Erdemoglu, Budak T. (2010) A small supernumerary marker chromosome, derived from chromosome 22, possibly associated with repeated spontaneous abortions. *Genet. Mol. Res*; 9(3):1683-1689
5. Ballestar E, Ropero S, Alaminos M, Armstrong J, Setien F., Agrelo R, Fraga M. F, Herranz M, Avila S, Pineda M, Monros E, Esteller M. (2005) The impact of MECP2 mutations in the expression patterns of Rett syndrome patients. *Hum Genet*; 116: 91–104. DOI 10.1007/s00439-004-1200-0)
6. Basel-Vanagaite L. (2008). Molecular Genetics of Mental Retardation. In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0021454
7. Bassett A, Cooper S, Wu Chenyi, Travers A. (2009) The folding and unfolding of eukaryotic chromatin. *Curr Opin Genet Dev*; 19:159–65. DOI 10.1016/j.gde.2009.02.010
8. Battaglia A, Carey JC. (2003) Diagnostic evaluation of developmental delay/mental retardation: An overview. *Am J Med Gen C Semin Med Genet* 15; 117C:3-14
9. Bickmore WA. (2001) Karyotype Analysis and Chromosome Banding In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester
10. Blennow E, Lagerstedt K, Malmgren H, Sahlen S, Schoumans J, Anderlid BM. (2008) Concurrent microdeletion and duplication of 22q11.2. *Clin Genet*; 74: 61–67
11. Buggenhout G, Fryns JP. (2009) Angelman syndrome (AS, MIM 105830). *Eur J Hum Genet* ; 17:1367–73
12. Cerruti Mainardi P. (2006) Cri du chat syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases*; 1:33 DOI:10.1186/1750-1172-1-33
13. Chan A, Lakshminrusimha S, Heffner R, Gonzalez-Fernandez F. (2007) Histogenesis of retinal dysplasia in trisomy 13. *Diagn Pathol*;2:48 doi:10.1186/1746-1596-2-48
14. Chelly J, Khelifaoui M, Francis F, Chérif B, Bienvenu T. (2006) Genetics and pathophysiology of mental retardation, *Eur J Hum Genet*; 14:701-13



15. Chen CP, Su YN, Chen YY, Su JW, Chern SR, Chen YT, Chen WL, Chen LF, Wang W. (2011) Wolf-Hirschhorn (4p-) syndrome: Prenatal diagnosis, molecular cytogenetic characterization and association with a 1.2-Mb microduplication at 8p22-p21.3 and a 1.1-Mb microduplication at 10p15.3 in a fetus with an apparently pure 4p deletion. *Taiwan J Obstet Gynecol*;50(4):506-511.
16. Crow YJ, Rehwinkel J. (2009) Aicardi-Goutières syndrome and related phenotypes: linking nucleic acid metabolism with autoimmunity. *Hum Mol Genet*, (18): Review Issue 2 doi:10.1093/hmg/ddp293.
17. Daw SC, Taylor C, Kraman M, Call K, Mao J, Schuffenhauer S, Meitinger T, Lipson T, Goodship J, Scambler P. (1996) A common region of 10p deletion in DiGeorge and velocardiofacial syndromes. *Nat Genet*; 13(4):458-60
18. Devlin L, Morrison PJ. (2004) Accuracy of the clinical diagnosis of the Down Syndrome. *U Med J*; 73(1): 4-12.
19. Devriendt K. (2005). Hydatidiform mole and triploidy: the role of genomic imprinting in placental development. *Hum Reprod Update*; 11:137-42 DOI:10.1093/humupd/dmh060
20. Dimitri P, Caizzi R, Giordano E, Accardo MC, Lattanzi G, Biamonti G. (2009) Constitutive heterochromatin: a surprising variety of expressed sequences. *Chromosoma*;118:419–35. DOI 10.1007/s00412-009-0211-y
21. Duarte AC, Menezes AIC, Devens ES, Roth JM, Garcias GL, Martino-Roth MG. (2004) Patau syndrome with a long survival. A case report . *Genet. Mol. Res*; 3 (2): 288-92
22. Eggermann T, Begemann M, Binder G, Spengler S. (2010) Silver-Russell Syndrome: genetic basis and molecular genetic testing. *Orphanet Journal of Rare Disease*; 5:19
23. Elsea SH, Finucane B. (2009) Smith–Magenis Syndrome. In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley&Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0021428
24. Everett KV, Chioza BA, Georgoula C, Reece A, Capon F, Parker KA, Cord-Udy C, McKeigue P, Mitton S, Pierro A, Puri P, Mitchison HM, Chung E, Gardiner M. (2008) Genome-wide High-Density SNP-Based Linkage Analysis of infantile hypertrophic pyloric stenosis identifies loci on chromosomes 11q14-q22 and Xq23. *Am J Hum Genet*; 82: 756–762.



25. Feenstra I, Brunner HG, Van Ravenswaaij CMA. (2006) Cytogenetic genotype-phenotype studies: Improving genotyping, phenotyping and data storage. *Cytogenet Genome Res*; 115:231–239. DOI: 10.1159/000095919.
26. Figuera LE, Rivera H, Cantú José María. (2001) Alteraciones cromosómicas de los autosomas en: *Genética Clínica, Diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias*. 3ª ed. El manual moderno, México; 127-136
27. Fryns JP, Lukusa TP (2005) Monosomies. In: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. Doi: 10.1038/npg.els.0005545
28. Fukami M, Muroya K, Miyake T, Manami I, Kato F, Yokoi H, Suzuki Y, Tsubouchi K, Nakagomi Y, Kikuchi N, Horikawa R, Ogata T.(2011) *GATA3* abnormalities in six patients with HDR syndrome. *Endocr J*; 58(2):117-21
29. Galasso C, Lo-Castro A, El-Malhany N, Curatolo P. (2010) “Idiopathic” mental retardation and new chromosomal abnormalities. *Ital J Pediatr* 14;36:17
30. Garavelli L, Donadio A, Banchini G, Magnani C, Calzolari E, Fryns J.P. (2000) Marden-Walker syndrome: case report, nosologic discussion and aspects of counseling. *Genet Couns*; 11(2):111-8.
31. Gardner RJ, Sutherland GR. (2004a) Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling. 3ª ed. Chapter 1. Elements of Medical Cytogenetics. Oxford University Press, NY: 3-20
32. Gardner RJ, Sutherland GR. (2004b) Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling. 3ª ed. Chapter 4. Autosomal Reciprocal Traslocation in: Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling Oxford University Press, NY: 59-97
33. Gardner RJ, Sutherland GR. (2004c) Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling. 3ª ed. Chapter 16. Down Syndrome, other full Aneuploidies and Poliploidy Oxford University Press, NY: 249-263
34. Gardner RJ, Sutherland GR. (2004d) Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling. 3ª ed. Chapter 17. Structural Rearrengements Oxford University Press, NY: 264-293
35. Gardner RJ, Sutherland GR. (2004e) Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling. 3ª ed. Chapter 20. Disorders Associated with aberrant Genomic Imprinting Oxford University Press, NY: 311-293
36. Gijsbers A, Lew J, Bosch C, Schuurs-Hoeijmakers J, van Haeringen J. *et al.* (2009) A new diagnostic workflow for patients with mental retardation and/or multiple congenital abnormalities: test arrays first. *Eur J Hum Genet*. 17: 1394 – 1402.



37. González Alvarado S, Sanz Rojo R, García Santiago J, Gaztañaga Expósito R, Bengoa A, Perez-Yarza EG. (2008) Criterios de diagnóstico genético en casos de retraso mental y del desarrollo de origen idiopático. *An Pediatr (Barc)*; 69(5):446-53
38. Goodship J, Curtis A, Cross I, Brown J, Emslie J, Wolstenholme J, Bhattacharya S, Burn J. (1992) A submicroscopic translocation, t(4;10), responsible for recurrent Wolf-Hirschhorn syndrome identified by allele loss and fluorescent in situ hybridization. *J Med Genet*; 29:451-4
39. Gribble SM, Prigmore E, Burford DC, Porter KM, Ng BL, Douglas EJ, Fiegler H, Carr P, Kalaitzopoulos D, Clegg S, Sandstrom R, Temple IK, Youings SA, Thomas NS, Dennis NR, Jacobs PA, Crolla JA, Carter NP. (2005) The complex nature of constitutional de novo apparently balanced translocations in patients presenting with abnormal phenotypes *J Med Genet*; 42(1):8-16
40. Hochstenbach R, van Binsbergen E, Engelen J, Nieuwint A, Polstra A, Poddighe P, Ruivenkamp C, Sikkema-Raddatz B, Smeets D, Poot M. (2009) Array analysis and karyotyping: workflow consequences based on a retrospective study of 36,325 patients with idiopathic developmental delay in the Netherlands. *Eur J Med Genet*; 52(4):161-9.
41. Hsieh CL. (2001) Cytogenetic Techniques. In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester
42. Hsu H-F, Hou J-W. (2007) Variable expressivity in Patau syndrome is not all related to trisomy 13 mosaicism. *Am J Med Genet Part A*; 143A:1739–48.
43. INEGI, (2004) Las personas con discapacidad en México: una visión censal. (http://www.inegi.gob.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/censos/poblacion/2000/discapacidad/discapacidad2004.pdf)
44. Iwanowski PS, Panasiuk B, Van Buggenhout G, Murdolo M, Myśliwiec M, Maas NM, Lattante S, Korniszewski L, Posmyk R, Pilch J, Zajaczek S, Fryns JP, Zollino M, Midro AT. (2011) Wolf-Hirschhorn syndrome due to pure and translocation forms of monosomy 4p16.1 → pter. *Am J Med Genet A*; (8):1833-47. doi: 10.1002/ajmg.a.34005.
45. Izumi K, Hahn A, Christ L, Curtis C, Neilson DE. (2011) Familial 9q22.3 microduplication spanning PTCH1 causes short stature syndrome with mild intellectual disability and dysmorphic features. *Am J Med Genet*, 155A(6):1384-9. doi: 10.1002/ajmg.a.33959.



46. Knight S, Lese CM, Precht KS, Kuc J, Ning Y, *et al.* (2008) an optimized set of human telomere clones for studying telomere integrity and architecture. *Am. J. Hum. Genet*; 67:320–332
47. Krebs JE, Goldstein ES, Kilpatrick ST. Chromatin, in: Lewin's Genes X. Jones and Bartlett Publishers. Boston, 2010; 220-238
48. Kriek M, White SJ, Bouma MC, Dauwerse HG, Hansson KBM, Nijhuis JV, Bakker B, van Ommen JB, den Dunnen JT, Breuning MH. (2004) Genomic imbalances in mental retardation. *J Med Genet*; 41:249–255. doi: 10.1136/jmg.2003.014308.
49. Li MM, Andersson HC. (2009) Clinical application of microarray-based molecular cytogenetics: an emerging new era of genomic medicine. *J Pediatr*; 155(3):311-7.
50. Lupski JR. (2009) Genomic disorders ten years on. *Genome Med*; 1:42. doi:10.1186/gm42
51. Luthardt FW, Keitges E. (2001) Chromosomal Syndromes and Genetic Disease. In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley & Sons, Ltd:Chichester.
52. Mc Neil N., Ried T. (2000) Novel molecular cytogenetic techniques for identifying complex chromosomal rearrangements: technology and applications in molecular medicine. *Expert Rev Mol Med*; 1-14.
53. Miller OJ, Therman E. (2001a) Human Chromosomes, 4^a ed. Chapter 6. Chromosome Bands. Springer-Verlag; NY:79-94
54. Miller OJ, Therman E. (2001b) Human Chromosomes, 4^a ed. Chapter 21. Euploid Chromosome Aberrations, Uniparental Disomy, and Genomic Imprinting. Springer-Verlag; NY. 2001b:79-94
55. Moeschler JB, Shevel M. (2006) Clinical genetic evaluation of the child with mental retardation or developmental delays. *Pediatrics*;117:2304-16
56. Moore CM, Best RG. (2001a) Chromosomal Genetic Disease: Structural Aberrations In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester
57. Moore CM, Best RG. (2001b) Chromosome Preparation and Banding In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
58. Moore CM, Best RG. (2007) Chromosome Mechanics In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. doi: 10.1002/9780470015902.a0001441.pub2
59. Moreno Izco F, Zuazo Zamalloa E, González Alvaredo S, Bereciartu Irastorza P. (2009) Síndrome de delección 22q11: un fenotipo en expansión. *Neurología*; 24(1):69-714



60. Mundhofir FE, Kooper AJ, Winarni TI, Smits AP, Faradz SM, Hamel BC. (2010) A small (sSMC) chromosome 22 due to a maternal translocation between chromosomes 8 and 22: a case report. *Genet Couns*; 21(1):99-108.
61. Mutton D, Alberman E, Hook EB. (1996) Cytogenetic and epidemiological findings in Down syndrome, England and Wales 1989 to 1993. *J Med Genet*; 33:387-394.
62. Oyedeji OA, Fadero FF, Joel-Medewase VI, Olusola EP, Oyedeji GA. (2007) Edwards syndrome in a neonate from a developing country; reasons for concern: a case report . *The Internet Journal of Third World Medicine*; 4(1)
63. Panasiuk B, Leśniewicz R, Spółczyńska A, Myśliwiec M, de Die Smulders Ch, Sawicka A, Midro AT. (2007) Translocation form of Wolf-Hirschhorn syndrome --assessment of recurrence rate probability. *Adv Med Sci*; 52 Suppl 1:166-70
64. Partington MW, Fagan K, Soubjaki V, Turner G (1996) Translocations involving 4p16.3 in three families: deletion causing the Pitt-Rogers-Danks syndrome and duplication resulting in a new overgrowth syndrome. *J Med Genet*;34:719-728
65. Rampakakis E, Arvanitis DN, Di Paola D, Zannis-Hadjopoulos M. (2008) Metazoan origins of DNA replication: regulation through dynamic chromatin structure. *J Cell Biochem*; 106:512–20
66. Raymond L. (2004) Genetics of learning disability. *ACNR*;4(3):10-13
67. Reddy KS, Sulcova V, Siassi B (1996), Two sibs with Wolf-Hirschhorn and DiGeorge deletions resulting from an unbalanced chromosome rearrangement, 45,XX/XY, der(4)t(4;22)(p16.3;q11.2)mat,-22. *J Med Genet*;33:852-855
68. Reid Evan, Morrison N, Barron L, Boyd E, Cooke A, Fielding D, Tolmie JL. (1996) Familial Wolf-Hirschhorn syndrome resulting from a cryptic translocation: a clinical and molecular study. *J Med Genet*; 33:197-202
69. Reynolds T. (2006) Down Syndrome: Antenatal Screening In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS), John Wiley & Sons, Ltd. Chichester
70. Robinson WP, McFadden DE. (2002) Chromosomal Genetic Disease: Numerical Aberrations. In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS), John Wiley & Sons, Ltd. Chichester.
71. Rocco de Oliveira RM, do Nascimento Verreschill LT, Nunes Lipayll MV, Piñero Eçal L, Dourado Guedes A, Bianco B. (2009) Y chromosome in Turner syndrome: review of the literature. *Sao Paulo Med J*; 127(6):373-8.



72. Ross JL, Zeger M, Kushner H, Zinn A, Roeltgen DP. (2009) An extra X or Y chromosome: contrasting the cognitive and motor phenotypes in childhood in boys with 47,XYY syndrome or 47,XXY Klinefelter syndrome. *Dev Disabil Res Rev*; 15(4): 309–317
DOI:10.1002/ddrr.85
73. Rossi E, Riegel M, Messa J, Gimelli S, Maraschio P, Ciccone R, Stropo M, Riva P, Perotta CS, Mattina T, Memo L, Baumer A, Kucinskis V, Castellan C, Schinzel A, Zuffradi O. (2009) Duplications in addition to terminal deletions are present in a proportion of ring chromosomes: clues to the mechanism of formation. *J Med Genet*; 456:147-154
74. Salman M, Jhanwar SC, Ostrer H. (2004) Will the New Cytogenetics replace the old cytogenetics?. *Clin Genet*; 66:265-75
75. Schalock RL, Luckasson RA, Shogren KA, Borthwick-Duffy S, Bradley V, Buntinx WH, Couter DL, Craig E, Gomez SC, Lachapelle Y, Reeve A, Snell ME, Spreat S, Tassé MJ, Thompson JR, Verdugo MA, Wehmeyer ML, Yeager MH. (2007) The renaming of mental retardation: understanding the change to the term intellectual disability. *Intellect Dev Dis*; 45(2): 116-24
76. Schinzel A, Riegel M, Baumer A. (2005) Microdeletion Syndromes. In Encyclopedia of Life Sciences (ELS), John Wiley & Sons, Ltd. Chichester. DOI: 10.1038/npg.els.0005549
77. Sebastio G, Perone L, Guzzetta V, Sebastio L, Vicari L, Della Casa R, Gurrieri F, Zappata S, Pomponi MG, Mazzei A, Neri G, Andria G, Brahe C. (1996) Molecular and cytogenetic characterization of a recurrent unbalanced translocation (4;21)(p16.3;q22.1): relevance to the Wolf-Hirschhorn and Down syndrome critical regions. *Am J Med Genet*; 63(2):366-72.
78. Shaffer LG, Bui TG. (2007) Molecular cytogenetic and rapid aneuploidy detection methods in prenatal diagnosis. *Am J. Med Genet C Semin Med Genet*. 145C(1):87–98.
79. Shaffer LG. (2005a) American College of Medical Genetics guideline on the cytogenetic evaluation of the individual with developmental delay or mental retardation. *Genet Med*; 7: 650-4
80. Shaffer LG.(2005b) Karyotype Interpretation in: Encyclopedia of Life Sciences (ELS), John Wiley & Sons, Ltd. Chichester, DOI: 10.1038/npg.els.0005778
81. Sharkey FH, Maher E, FitzPatrick DR, (2005) Chromosome analysis: what and when to request. *Arch Dis Child*; 90:1264–69. DOI: 10.1136/adc.2004.068668
82. Smeets D. (2004) Historical prospective of human cytogenetics: from microscope to microarray. *Clinical Biochemistry*; 37:439–446.



83. South ST, Whitby H, Battaglia A, Carey JC, Brothman AR. (2008) Comprehensive analysis of Wolf – Hirschhorn syndrome using array CGH indicates a high prevalence of translocations. *Eur J Hum Genet*;16, 45–52
84. Spurbeck JL, Adams SA, Stupca PJ, Dewald GW. (2004) Primer on medical genomics. Part XI: visualizing human chromosomes. *Mayo Clin Proc*; 79:58-75
85. Staynov DZ. (2008) The controversial 30nm chromatin fibre. *Bioessays*; 30: 1003-09.
86. Steiner CE, Mantovani-Guerreiro M, Marques de Faria AP, Lopes-Cendes I. (2005) Laboratorial Diagnosis of fragile X syndrome. *Arq Neuropsiquiatr*, 63(3-A):564-570.
87. Stochholm K, Juul S, Gravholt C. (2010) Diagnosis and mortality in 47,XYY persons: a registry study. *Orphanet Journal of Rare Diseases*; 5:15.
88. Strachan T, Read AP. (2006a) *Genética Humana*, 3^a ed. Capítulo Dos. Estructura y Función de los Cromosomas, Mc Graw-Hill Interamericana; México, 2006: 33-57
89. Strachan T, Read AP. (2006b) *Genética Humana*, 3^a ed .Capítulo Catorce. Identificación de Genes Patológicos Humanos. Mc Graw-Hill Interamericana; México: 418-435
90. Tartaglia NR, Howell S, Sutherland A, Wilson R, Wilson L. (2010) A review of trisomy X (47,XXX). *Orphanet Journal of Rare Diseases*; 5:8.
91. Trask BJ. (2002) Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting. *Nat Rev Genet*; 3:769-778.
92. Trojer P, Reinberg D. (2007) Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Mol Cell*; 28:1-13. DOI 10.1016/j.molcel.2007.09.011
93. Tzschach A, Ropers HH. (2007) Genetics of Mental Retardation. *Dtsch Arzteb*;104(20):A1400–5
94. Vekemans M. (2005) Trisomy. in: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*, John Wiley & Sons, Ltd. Chichester. doi: 10.1038/npg.els.0005544
95. Verma RS, Babu A. (1995a) *Human Chromosomes Principles and Techniques*. 2^a ed. Chapter 2. Tissue Culture Techniques and chromosome preparation. Mc Graw Hill Inc. NY: 6-69
96. Verma RS, Babu A. (1995b) *Human Chromosomes Principles and Techniques*. 2^a ed. Chapter 3. Banding Techniques. Mc Graw Hill Inc. NY: 6-69
97. Warburton D. (2005) Chromosome Analysis and Identification. in: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*, John Wiley & Sons, Ltd. Chichester. DOI:10.1038/npg.els.0005775.
98. Weksberg R, Shuman S, Beckwith JB. (2010) Beckwith–Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet*; 18, 8–14



-
99. Wheeler PG, Weaver DD, Palmer CG. (1995) Familial translocation resulting in Wolf-Hirschhorn syndrome in two related unbalanced individuals: clinical evaluation of a 39-year-old man with Wolf-Hirschhorn syndrome. *Am J Med Genet.*; 55(4):462-5.
 100. Wheeler PG, Weaver DD, Palmer CG. (1995) Familial translocation resulting in Wolf-Hirschhorn syndrome in two related unbalanced individuals: clinical evaluation of a 39-year-old man with Wolf-Hirschhorn syndrome. *Am J Med Genet*; 55(4):462-5.
 101. Winnepeninckx B, Rooms L, Kooy RF. (2003) Mental retardation: a review of the genetic causes. *Br J Dev Dis*; 49 (1) 96:29-44.
 102. Wu C, Bassett A, Travers A. (2007) A variable topology for the 30-nm chromatin fibre. *EMBO reports*; 8:1129–34. doi:10.1038/sj.embor.7401115.



ANEXO I

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

1. **ÁCIDO CLORHÍDRICO 0.01N.**
Se miden 8mL de HCl concentrado (37%) y se aforan a 1L con agua destilada, la solución se almacena en un recipiente de vidrio a temperatura ambiente.
2. **ALBÚMINA BOVINA.**
Se disuelven 0.1g de Albúmina bovina (GIBCO) en 5 mL de agua destilada, una vez disuelto se agregan 50µL de ácido fórmico (MERCK).
3. **BROMURO DE ETIDIO.**
Pesar 1mg de Bromuro de Etidio y disolver en 10mL de agua inyectable.
4. **COLCHICINA AL 0.02%.**
Pesar 2 mg de colchicina (GIBCO) y diluir en 10mL de agua inyectable.
5. **ETANOL AL 70%**
Se miden 35mL de etanol absoluto y se agregan 15 mL de agua destilada, la mezcla se mantiene cerrada.
6. **ETANOL AL 85%**
Se miden 42.5mL de etanol absoluto y se agregan 7.5mL de agua destilada.
7. **MEDIO RPMI 1640 SUPLEMENTADO.**
Adicionar en condiciones de asepsia, a un frasco de 100mL de medio RPMI 1640, 10mL de suero fetal bovino.
8. **NITRATO DE PLATA (AgNO₃) al 50%**
Se pesan 2.5g de AgNO₃ y se disuelven en 5mL de agua destilada.
9. **SOLUCIÓN 0.4XSSC-0.3% NP40**
Se miden 20mL de solución 20XSSC, 3 mL de NP-40 y se afora a 1L con agua destilada evitando la formación de espuma. La solución se guarda a 4°C en un recipiente de vidrio.
10. **SOLUCIÓN 2XSSC 0.1%, NP40**
Se miden 100mL de solución 20XSSC, 1 mL de NP-40 y se afora a 1L con agua destilada evitando la formación de espuma. La solución se guarda a 4°C en un recipiente de vidrio.



11. SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS pH 6.8.

Pesar 7.08g de Na_2HPO_4 (MERCK) y disolver en un matraz aforado de 1L con agua destilada, agregar poco a poco 6.74g de KH_2PO_4 (MERCK) y aforar a 1L, medir pH y ajustar.

12. SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS pH 7.

Pesar 8.65g de Na_2HPO_4 (MERCK) y disolver en un matraz aforado de 1L con agua destilada, agregar poco a poco 5.26g de KH_2PO_4 (MERCK) y aforar a 1L, medir pH y ajustar.

13. SOLUCIÓN DE MADURACIÓN 2XSSC.

Medir 5 mL de solución 20XSSC y diluir con 45mL de agua destilada

14. SOLUCIÓN HIPOTÓNICA (KCl 0.075M)

Pesar 5.5912g de KCl (MERCK) y aforar con agua destilada a 1 L



ANEXO II



HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO O.D.
SERVICIO DE GENÉTICA



México DF. 13 de diciembre de 2011

M. en C. Alicia Beatriz Cervantes Peredo

Investigador en Ciencias Médicas

Presente.

Estimada M. en C. Cervantes:

Los abajo firmantes participantes en el Proyecto de Investigación No. DIC/11/310/04/42 de la Dirección de Investigación del Hospital General de México y Proyecto CONACYT "Estudio multicéntrico y multidisciplinario para el diagnóstico clínico-molecular y manejo de niños mexicanos con Retraso Mental" con Clave no. 2005-c01-13947, autorizamos el uso de los datos obtenidos del análisis con microarreglos 5.0 de Affymetrix de un caso familiar de Síndrome de Wolf-Hirschhorn en la tesis "DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS EN INDIVIDUOS CON RETRASO MENTAL QUE ACUDEN AL SERVICIO DE GENÉTICA DEL HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO" que para obtener el título de Química Farmacéutica Bióloga presenta la alumna de la Facultad de Química, U.N.A.M. Luz María Garduño Zarazúa y de la cual Ud. es asesora. El empleo de estos datos contribuirá a mostrar la forma en que actualmente se deben estudiar los pacientes con Retraso Mental.

Atentamente

Dra. Susana H. Kofman Epstein
Consultor técnico

Dr. Carlos A. Venegas Vega
Médico Especialista

Dr. Fernando Fernández Ramírez
Investigador en Ciencias Médicas