



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

ANÁLISIS CLÍNICO, CITOGENÉTICO Y MOLECULAR DE LOS PACIENTES
CON DELECIÓN 4p EN EL HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO
GÓMEZ DEL 2002-2012

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA

PRESENTA:

DRA. MIRENA CRISTINA ASTIAZARÁN OSORNIO

TUTORA: DRA. VERÓNICA FABIOLA MORÁN BARROSO

ASESORES DE TESIS: DRA. CONSTANZA GARCÍA DELGADO

M. EN C. ALICIA BEATRIZ CERVANTES PEREDO

CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO 2016





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



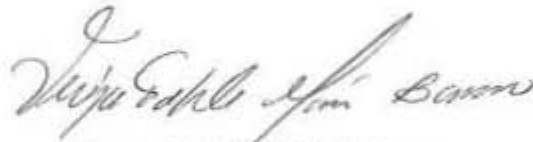
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.

Directora de tesis:



Dra. Verónica Fabiola Morán Barroso
Jefe del Departamento de Genética Médica
Hospital Infantil de México Federico Gómez

Asesoras de tesis:



Dra. Constanza García Delgado
Profesor adjunto de la Especialidad de Genética Médica
Hospital Infantil de México Federico Gómez



M. en C. Alicia Beatriz Cervantes Peredo
Servicio de Genética, Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga
Facultad de Medicina UNAM

AGRADECIMIENTOS

Al Hospital Infantil de México Federico Gómez y sus pacientes.

Por ser mi casa durante cuatro años y a los pacientes por ser los mejores maestros. Gracias.

A Jacinto, Monina, Karín, Chintín, Héctor, Mirella y Julieta.

Por el amor incondicional, por ser mis pilares en todo momento y por su comprensión. Gracias.

A la Dra. Verónica Morán.

Por sus enseñanzas, correcciones y apoyo y por demostrarme con el ejemplo que las cosas grandes se logran con el trabajo diario. Gracias.

A la Dra. Constanza García Delgado y el Dr. Francisco Flores.

Por compartirme sus conocimientos y sabiduría de genética y de la vida y porque no pasó un solo día sin que me saludaran con una sonrisa. Gracias.

A la Maestra Alicia.

Por todas y cada una de sus correcciones, por enseñarme a cuestionar todo en la ciencia (en el buen sentido) y por darme las herramientas para poder ser mejor cada día en mi profesión. Gracias.

A mis compañeros Caro, Rodrigo, Maura, Ale, Chris, Pau, Ame y Leo.

Por las risas, los abrazos, las palabras de aliento y porque todos los días sentí que llegaba a una familia. Gracias.

A la Dra. Susana Kofman, la M. en C. Laura Gómez Laguna y la Biol. Karem Nieto Martínez del Servicio de Genética del Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga. Por su colaboración en este trabajo. Gracias.

Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo de la Beca Carlos Slim de impulso a la investigación en salud del Instituto Carlos Slim de Salud durante los años 2014 y 2015. El análisis preliminar de este proyecto se presentó en plataforma oral en el XXXVIII Congreso Nacional de Genética Humana/III Congreso Latinoamericano de Genética Humana en noviembre de 2013 y también fue presentado en cartel en las X Jornadas de Residentes de Pediatría HIM-INP 2014, obteniendo el segundo lugar en el concurso de trabajos libres.

ÍNDICE

	Página
Resumen	
1. Marco teórico	
1.1 Niveles de organización del DNA	8
1.2 Estructura de los cromosomas	12
1.2.1 Centrómero	12
1.2.2 Telómero	14
1.3 Clasificación de los cromosomas	15
1.4 Ciclo celular	16
1.4.1 Fase M o Mitosis	17
1.4.2 Meiosis	19
1. 5 Alteraciones cromosómicas	21
1.5.1 Alteraciones cromosómicas numéricas	21
1.5.2 Aberraciones cromosómicas estructurales	23
1.5.3 Consecuencias de las translocaciones en la segregación.	25
1.6 Técnicas de citogenética convencional y molecular	27
1.6.1 Cariotipo	27
1.6.2 Análisis por hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia (FISH)	29
1.6.3 Cariotipo molecular o hibridación genómica comparativa sobre microarreglos (aCGH)	32
1.7 Indicaciones para estudios citogenéticos	33
1.8 Características del cromosoma 4	35
1. 9 Síndrome de Wolf-Hirschhorn	37
1.9.1 Características clínicas	40
1.9.1.1 Tablas de crecimiento	43
1.9.2 Bases citogenéticas	44
1.9.3 Bases moleculares	45
2. Planteamiento del problema	48
3. Pregunta de investigación	49
4. Justificación	50
5. Objetivos	51
6. Material y métodos	52
7. Análisis estadístico	53

8. Descripción de variables	53
9. Resultados	
9.1 Resultados estadísticos	54
9.2 Pacientes correspondientes al grupo 1	57
9.3 Pacientes correspondientes al grupo 2	67
9.4 Pacientes correspondientes al grupo 3	74
10. Discusión	80
11. Conclusiones	90
12. Referencias	91
Anexos	
I. Consentimiento informado para toma de fotografías clínicas	98
II. Consentimiento informado para toma de muestra de sangre	99
III. Técnica de cariotipo con bandas GTG	100
IV. FISH (Análisis de Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia)	102

RESUMEN

Introducción: El síndrome de Wolf-Hirschhorn (SWH) se define como un síndrome de genes contiguos causado por una delección de material en la porción distal del brazo corto del cromosoma 4, en la región p16.3. Las características clínicas del SWH incluyen dismorfias faciales, retraso en el crecimiento pre y postnatal, déficit intelectual y crisis convulsivas. Su incidencia es de 1/50,000 recién nacidos vivos. Es posible detectar la delección con cariotipo con bandas GTG, sin embargo, para 40% de los pacientes se requiere de cariotipo molecular por técnicas de FISH y/o microarreglos por tratarse de delecciones submicroscópicas. Los pacientes se clasifican en tres grupos de acuerdo al fenotipo y al tamaño de la delección: leve (≤ 3.5 Mb), clásico (de 5 a 18 Mb) y grave (de 22 a 25Mb).

Justificación: el HIMFG es un hospital de concentración y referencia de pacientes con malformaciones y déficit intelectual, entre ellos pacientes con fenotipo del SWH. El abordaje incluye el estudio citogenético con técnicas convencionales, sin embargo, hasta en 30 al 40% de los pacientes la anomalía cromosómica no es detectada. El estudiar a estos pacientes nos permitió conocer las características de nuestra población, identificar casos que pudieron beneficiarse de estudios moleculares. El describir la frecuencia y la características clínicas, citogenéticas y moleculares aporta conocimiento acerca del perfil de la población mexicana con SWH.

Objetivo general: Describir las características clínicas, citogenéticas y moleculares de los pacientes con SWH atendidos en el Departamento de Genética del HIMFG de 2002 a 2012.

Material y métodos: Se revisaron los registros de cariotipos realizados con bandas GTG en el Laboratorio de Citogenética del Departamento de Genética del HIMFG de los años 2002 a 2012. Se incluyeron pacientes cuya indicación para cariotipo fue fenotipo de SWH y se reevaluaron clínicamente aquellos pacientes que fue posible localizar. Se realizó FISH con sonda para WHSCR en los pacientes con características clínicas de SWH y cariotipo normal. En aquellos con delección negativa para WHSCR, además se realizó FISH con sonda subtelomérica para 4p.

Resultados: Se identificaron 16 pacientes con diagnóstico clínico de SWH correspondiendo al 0.31% de los todos los análisis de cariotipo con bandas GTG analizados en el periodo de estudio y a 1% de las cromosopatías. Un paciente fue eliminado del análisis por no encontrarse expediente clínico completo; en dos pacientes solo se contó con datos recabados del expediente, por lo que finalmente se incluyeron únicamente 13 pacientes para el análisis de la correlación clínica/citogenética molecular. En 7 de 13 pacientes (53.8%) se demostró una alteración en 4p con cariotipo con bandas GTG. Se reportó cariotipo normal en 6 pacientes (46.1%) a quienes se les realizó FISH, así como a una paciente con fórmula 46,XX,add(4)(p16.3). El 100% de los pacientes tuvo características faciales compatibles con el SWH, retraso del desarrollo psicomotor o discapacidad intelectual, crisis convulsivas y restricción del crecimiento. De acuerdo a las alteraciones citogenéticas identificadas, los pacientes se clasificaron en tres grupos: Grupo 1 pacientes con cariotipo con bandas GTG anormal, se incluyeron siete pacientes; Grupo 2 pacientes con cariotipo normal con bandas GTG y FISH positivo para la delección, se incluyeron tres pacientes; Grupo 3 pacientes con cariotipo normal y FISH negativo, se incluyeron tres pacientes.

Discusión: En el 53.8% de los 13 pacientes (7 pacientes) incluidos en este estudio se confirmó la delección con bandas GTG, lo que concuerda con la literatura en la que se reporta que el 50-60% de los casos se confirman con esta metodología, los cuales corresponden al grupo 1. Las características clínicas encontradas en este grupo son similares a las reportadas en pacientes en la categoría clásica. Los pacientes del grupo 2 los cuales corresponderían a la categoría leve tuvieron más malformaciones mayores de las esperadas. Los pacientes del grupo 3 en quienes

no se pudo confirmar el diagnóstico de SWH por las técnicas citogenética disponibles en este estudio posiblemente tengan deleciones muy pequeñas o translocaciones críticas no balanceadas las cuales se pueden detectar con microarreglos de alta densidad. Tomando en cuenta los 13 pacientes, la relación mujer:varón fue de 1.6:1 lo cual es similar a la relación 2:1 reportada previamente. El 100% de los pacientes incluidos en esta tesis tuvo características faciales compatibles con el SWH, incluyendo RDPM o discapacidad intelectual, crisis convulsivas y RCIU o RCEU.

Conclusiones: La frecuencia del SWH por datos clínicos para la población del HIMFG en que se solicitó estudio citogenético es de 1:320 y como cromosomopatía es del 1%. En este trabajo se describe a 15 pacientes con diagnóstico clínico de SWH y en 13 de ellos fue posible confirmar el diagnóstico por estudio citogenético y/o citogenético molecular. En la mayoría de los pacientes fue posible confirmar el diagnóstico por técnica de bandas GTG y FISH. Se identificaron las principales manifestaciones clínicas fenotípicas del síndrome y se dio asesoramiento genético. Hasta donde sabemos, en México no hay reportes previos de series de pacientes con el SWH.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 NIVELES DE ORGANIZACIÓN DEL DNA

La información genética en los seres humanos se encuentra contenida en el ácido desoxirribonucleico o DNA el cual tiene una estructura en doble hélice que de manera extendida mide aproximadamente 2 metros. El DNA se superenrolla para disponerse en un núcleo de aproximadamente 10µm; cada cadena de la doble hélice, entre otros componentes, está formada por las bases nitrogenadas que son adenina, timina (la cual se reemplaza en el RNA por uracilo), guanina y citosina. Las bases nitrogenadas son complementarias, es decir, las adeninas de una cadena forman enlaces de tipo puente de hidrógeno con las timinas de la otra cadena y las guaninas con las citosinas. Las bases nitrogenadas se unen con una pentosa y un grupo fosfato para formar un nucleótido, así las cadenas del DNA están formadas por polinucleótidos (Frank-Kamenetskii MD, 2002, Del Castillo RV, et al., 2012)(Figura 1).

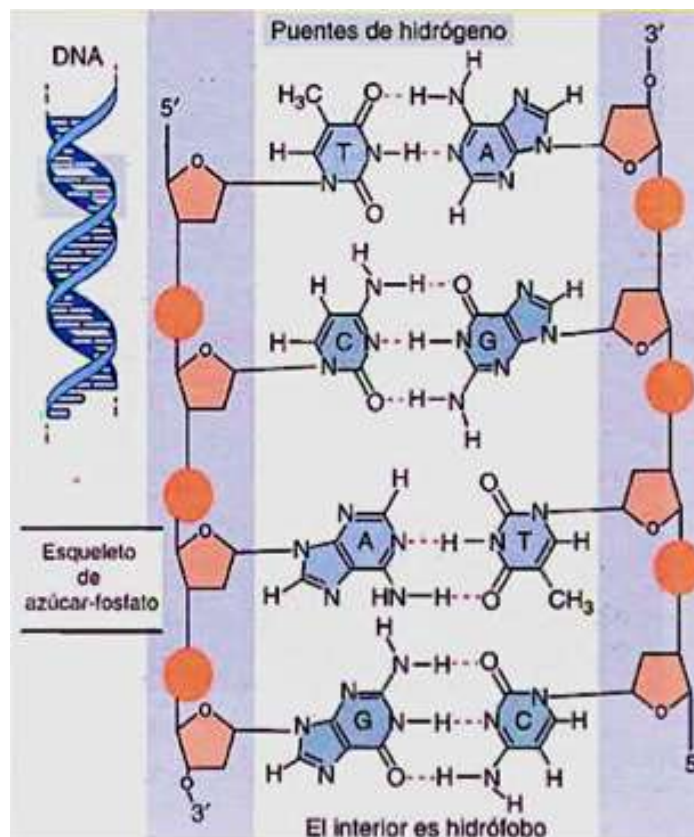
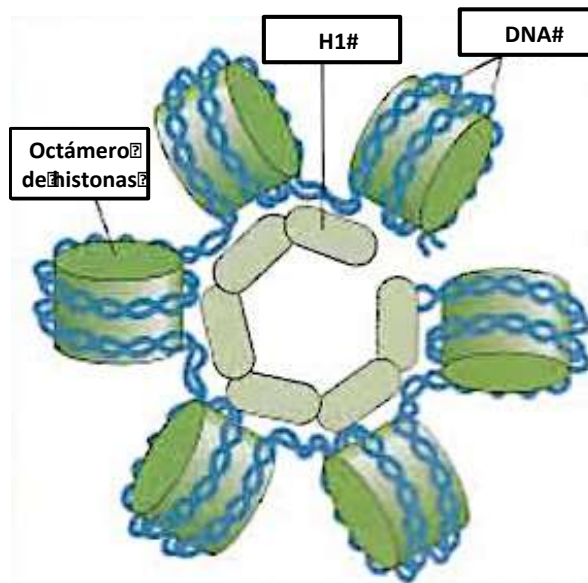


Figura 1. Estructura del DNA. Se muestran los nucleótidos evidenciando la complementariedad entre las bases nitrogenadas adenina y timina (A-T) y guanina y citosina (G-C), formando puentes de hidrógeno entre las dos cadenas (Imagen modificada de Lewin, Benjamin. *Genes IX*. 9a ed. M. xico: McGraw-Hill Interamericana, 2008).

El DNA interactúa con proteínas para empaquetarse y mantenerse en el núcleo de las células eucariontes; la interacción del DNA con proteínas constituye la cromatina (Bickmore WA, 2005). La cromatina presenta dos estados dependiendo de su nivel de compactación y de la expresión de los genes entre otras características, de esta manera se clasifica en eucromatina y heterocromatina. La eucromatina siempre está activa, es decir es DNA que continuamente se expresa en el organismo. La heterocromatina se subclasifica en constitutiva y facultativa. La heterocromatina constitutiva siempre está inactiva, condensada y consiste de secuencias de DNA altamente repetidas las cuales no se transcriben, esta se encuentra en regiones centroméricas y teloméricas. La heterocromatina facultativa puede existir activa y descondensada o inactiva y condensada (Larizza L & Doneda L, 2005). Un ejemplo de heterocromatina facultativa es el cromosoma X el cual se inactiva transcripcionalmente en una etapa específica del desarrollo embrionario posterior a haber tenido expresión para el desarrollo normal de mamíferos euterios del sexo femenino (Chow JC, et al., 2010).

El DNA es una molécula que por sus múltiples grupos fosfato, tiene una carga negativa. Para poderse doblar hasta el último nivel de empaquetamiento que es el cromosoma, es necesario organizar la molécula y neutralizar su carga. Existen dos tipos de proteínas que se unen al DNA: histonas y no histonas. Las proteínas histonas son altamente positivas y logran cumplir la función de neutralizar la carga del DNA (Doenecke D, 2005). Hay subtipos de histonas, los cuales varían en su estructura primaria pero comparten la terciaria, la cual consiste en un motivo de pliegue de histona y un dominio globular. Las familia de histonas están formadas por H1 (rica en lisina), H2A y H2B (moderadamente ricas en lisina), H3 y H4 (ricas en arginina) (Doenecke D & Albig W, 2005). La región N-terminal de las histonas y el dominio globular son capaces de sufrir cambios como acetilación, fosforilación, metilación, ubiquitinación entre otros, los cuales modifican su interacción con el DNA y de esta forma influyen sobre diversos procesos celulares como transcripción, replicación y reparación del DNA (Bhaumik SR, et al. 2007).

El primer nivel de empaquetamiento de la cromatina es el nucleosoma, la partícula central o *core* del cual consiste en un núcleo central de 8 histonas, dos de tipo H2A, dos H2B, dos H3, dos H4 y 147 pb de DNA de doble cadena enrolladas 1.6 veces alrededor del octámero central. Entre cada nucleosoma hay DNA de enlace de aproximadamente 54 pb y una histona H1 que se considera de enlace (Doenecke D & Albig W, 2005). Los nucleosomas son estructuras dinámicas y cambios de tipo epigenéticos como por ejemplo la acetilación de histonas, pueden modificar dramáticamente su estructura y ulteriormente el estado de la cromatina (Doenecke, D, 2005) (Figura 2).



Diversos modelos que se basan en estructuras cristalográficas de alta resolución de los nucleosomas han demostrado que estos tienen la capacidad de cambiar su estado de unión al DNA dependiendo de las necesidades de la célula y no están confinados al octámero que se describió originalmente. La H1 facilita la organización del nivel de compactación secundario llamado la fibra de 30 nm que se denomina así por el grosor de la estructura formada para estabilizar los nucleosomas (Grigoryev SA & Woodcock CL, 2012; Luger K, et al., 2012).

Se ha estudiado la estructura de la fibra de 30 nm y se ha propuesto por ejemplo los modelos de solenoide para el cual se propone un modelo en espiral y otro modelo en zigzag (Del Castillo RV, et al., 2012). Algunos modelos proponen estructuras adicionales a la fibra de 30 nm *in vivo* ya que esta sólo se ha observado *in vitro*. Tecnologías como criomicroscopía electrónica y 3C (del inglés: *chromosome conformation capture*) han desafiado la idea de que sólo existe la estructura de la fibra de 30 nm y han propuesto modelos complejos que involucran fibras de 10 nm y 100 nm dobladas de manera irregular hasta lograr el nivel de compactación del cromosoma (Bian Q & Belmont AS, 2012) (Figura 3).

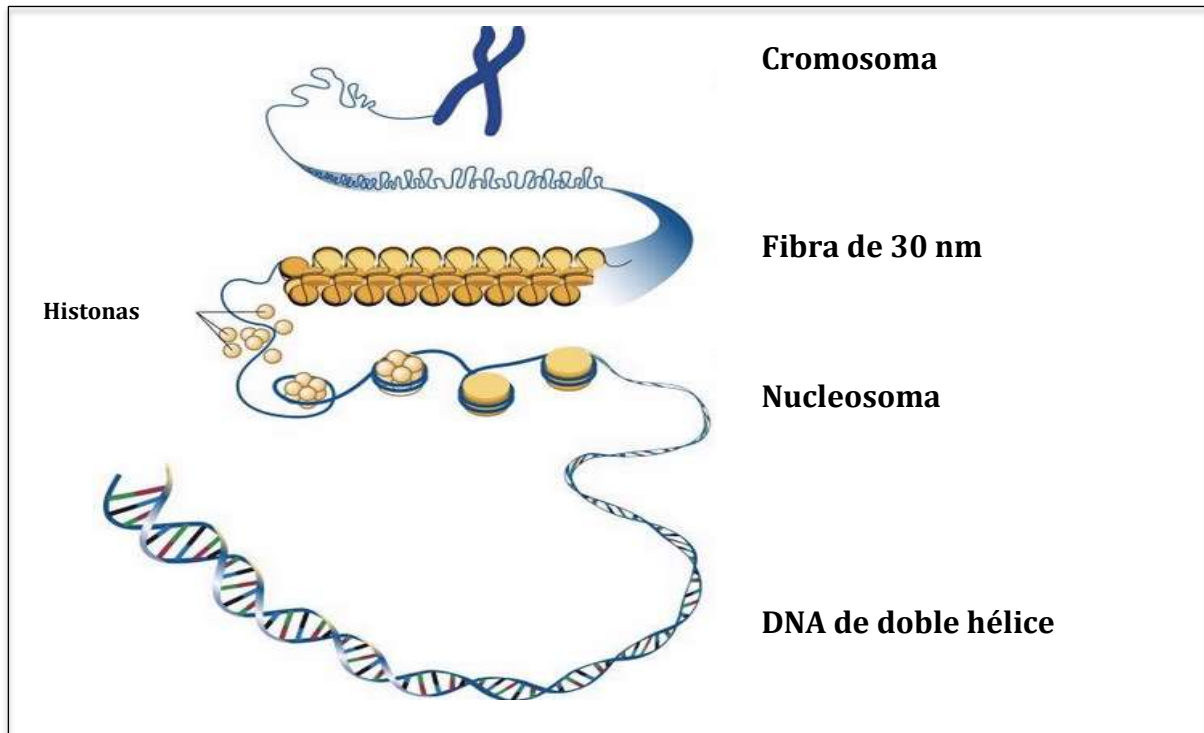


Figura 3. Esquema de los niveles de compactación del DNA. Se muestran las estructuras hasta el estado de cromosoma en metafase (Imagen modificada de Leja D, 2010).

1.2 ESTRUCTURA DE LOS CROMOSOMAS

En los seres humanos el DNA se distribuye en 23 pares de cromosomas, 22 de los cuales son autosomas y 1 par es de cromosomas sexuales. Las células que contienen 46 cromosomas se denominan diploides ($2n$) y las células que contienen 23 cromosomas son haploides ($1n$), los óvulos y los espermatozoides son las únicas células que se encuentran en situación haploide (Speicher MR, 2005).

Los cromosomas son estructuras complejas y dinámicas las cuales cambian su forma dependiendo de la etapa del ciclo celular en la que se encuentran (Cremer M, et al., 2005). Para el mantenimiento de los cromosomas durante el ciclo celular es imprescindible considerar a la familia de proteínas asociadas a la cromatina SMC (del inglés: *structural maintenance of chromosomes*) (Díaz-Martínez LA & Yu H, 2010). Las SMC están involucradas en los procesos de condensación y cohesión de cromátides hermanas los cuales son procesos críticos para la segregación adecuada de cromosomas, se pueden asociar y disociar a ellos dependiendo de la fase del ciclo celular en la que se encuentren (Liu S-T, et al., 2010).

Es importante recordar que el DNA no existe desnudo, siempre está en forma de fibras de cromatina y para los niveles superiores de condensación, se requiere además de las histonas la participación de las proteínas no histonas. Para la condensación del DNA son necesarias las histonas previamente discutidas así como otros elementos como la topoisomerasa II y las condensinas, principalmente. El complejo condensina I está formado por subunidades de SMC y moléculas reguladoras, específicamente las SMC2, SMC4, CAP-DR, CAP-G y CAP-H y está localizado en citoplasma. El complejo de condensina II ubicado en el núcleo, está formado por SMC2, SMC4, CAP-D3 y CAP-G2 (Díaz-Martínez LA & Yu H, 2010; Liu S-T, et al., 2010). Para la cohesión la célula se vale de proteínas como la cohesina la cual también está involucrada en la reparación del DNA y está compuesta por SMC1, SMC3, Rad21 y Scc3 (Seitan VC & Merkenschlager M, 2012).

1.2.1 CENTRÓMERO

Los cromosomas tienen regiones con funciones específicas y especializadas que en conjunto contribuyen a la correcta segregación de los mismos, protegen a la molécula de DNA y permiten clasificarlos (Gilchrist S & Bickmore WA, 2005; Paulson JR & Vagnarelli P, 2011). Al sitio de mayor constricción de un cromosoma se le llama centrómero. Las células eucariontes tienen un centrómero por cromosoma formado por secuencias de DNA

altamente repetidas en tándem. Este DNA se conoce como α satélite y se encuentra en todos los cromosomas y el monómero repetido puede ser de 169-172 pb con una diferencia de hasta 30-40% en su secuencia (Haaf T, 2006). Se encuentra también el cinetocoro, una estructura multiprotéica que permite la asociación con los microtúbulos del huso mitótico durante una parte específica del ciclo celular. El centrómero es el sitio que permite la correcta segregación del material genético durante la mitosis y meiosis por su unión a los microtúbulos (Plohl M et al., 2014).

Además de DNA α satélite, los centrómeros están constituidos por proteínas que colectivamente se les conoce como proteínas asociadas a centrómero o CENP, por sus siglas en inglés. Hay por lo menos 19 tipos de CENP y forman un sistema asociado al centrómero durante el ciclo celular. CENP-A es fundamental para el funcionamiento del centrómero, es una variante de la histona H3 y se requiere para la localización de otras CENP (Paulson JR & Vagnarelli P, 2011).

CENP-C está localizada entre el centrómero y el cinetocoro, el cual es una macromolécula trilaminar localizada sólo en centrómeros activos y está encargada del ensamblaje de los microtúbulos durante la mitosis (Kalitsis P, 2008) (Figura 4). Las estructuras del cinetocoro además señalan la activación y silenciamiento del punto de control del huso mitótico (Liu, ST et al., 2014), se ha demostrado que los ratones *knockout* para *Cenpa* y *Cenpc* mueren en etapas tempranas del desarrollo por disrupción de la segregación de los cromosomas durante la mitosis (Haaf T, 2006).

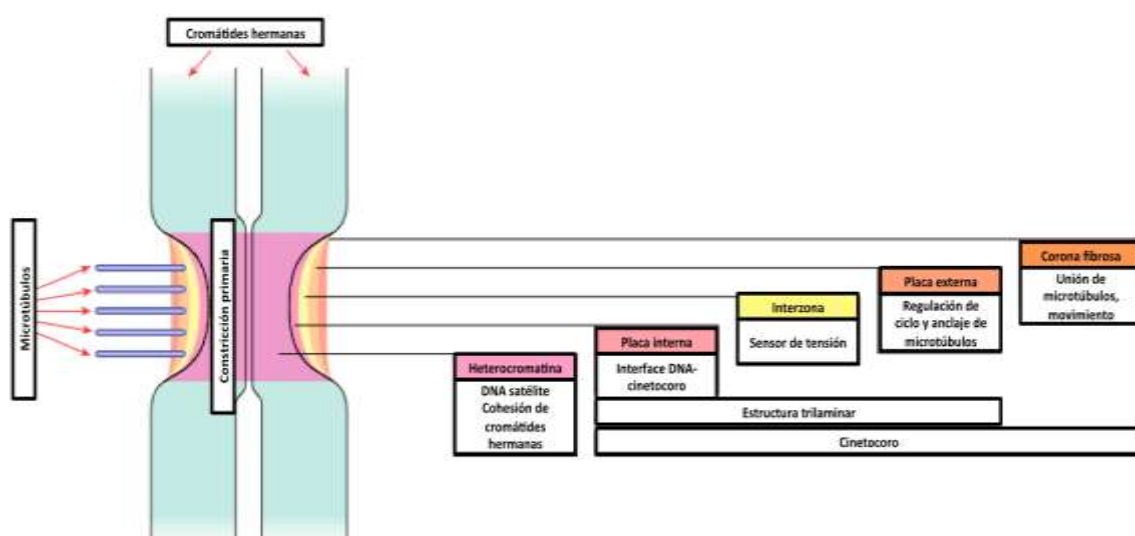


Figura 4. Centrómero. Se muestran los dominios funcionales y estructurales del centrómero (Imagen modificada de Kalitsis P, 2008).

1.2.2 TELÓMERO

Los telómeros son la parte más distal de los cromosomas, consisten en secuencias repetidas en tándem ricas en guanina y están asociados a proteínas (Hansen NJ, et al., 2005). Sus funciones consisten en prevenir la recombinación y proteger a los cromosomas de la degradación del DNA, entre otras. La longitud de los telómeros disminuye tras cada replicación, conocido como el problema del final de la replicación, y que conlleva a la senescencia celular (Olovnikov AM, 1996; Aviv A & Susser E, 2013). La replicación de los telómeros la realiza la telomerasa, una enzima presente en células germinales, endometriales, hematopoyéticas y aproximadamente 90% de células tumorales (Hansen NJ, et al., 2005). En los seres humanos, los telómeros consisten de miles de repetidos de un motivo de 6pb con la secuencia consenso 5'-TTAGGG-3', terminando en un extremo 3' de cadena sencilla rica en G con una extensión de 30 a 300 nucleótidos llamada saliente o asa T. Esta estructura impide que el extremo terminal de los cromosomas sea reconocido y confundido con una ruptura de doble cadena por la maquinaria de reparación de las mismas (Galati A, et al., 2013).

Los extremos 3' ricos en guanina también se propone que pueden formar estructuras complejas conocidas como G-cuadruplex y pueden tener conformaciones tridimensionales distintas. Asociadas al telómero hay proteínas que en humanos son el complejo shelterina compuesto por TRF1, TRF2, RAP1, TIN2, TPP1 y POT1 y cuya función principal es proteger al DNA y regular la actividad de la telomerasa. La telomerasa es una transcriptasa reversa que se encarga de mantener la longitud del telómero y está compuesta por hTERT y hTR (templado de RNA) (Gómez DE, et al., 2012) (Figura 5).

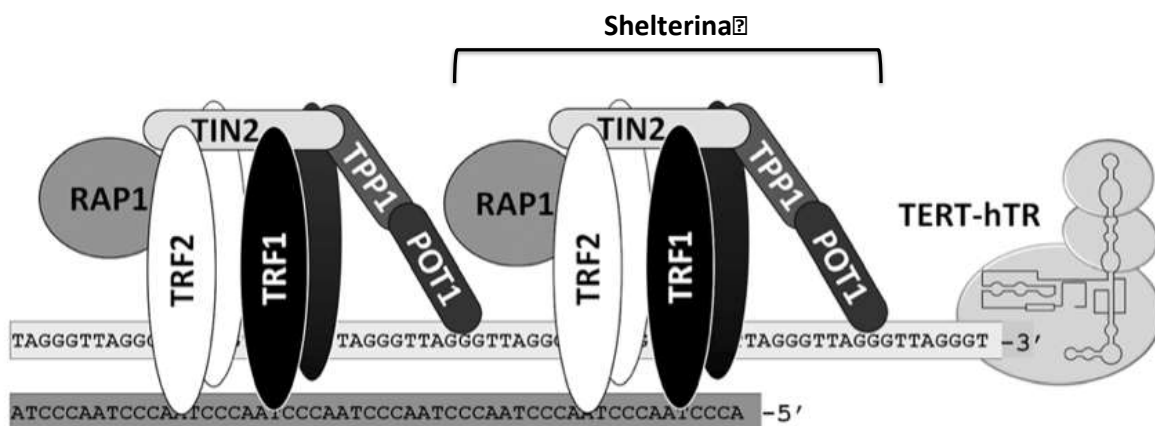


Figura 5. Esquema del telómero. Se muestra el repetido 5'-TTAGGG-3' en la secuencia de DNA y las proteínas asociadas, así como el complejo de shelterina (Modificada de Gómez DE, et al. 2012).

1.3 CLASIFICACIÓN DE LOS CROMOSOMAS

Los cromosomas se clasifican por la posición del centrómero en metacéntricos, submetacéntricos y acrocéntricos (ISCN, 2013). El centrómero divide al cromosoma en brazos de manera que el brazo corto se denomina “p” (*petit*, en francés) y el largo “q” (Figura 3). De esta forma, los cromosomas metacéntricos tienen el centrómero en el centro con los brazos p y q de tamaño similar; los submetacéntricos con el brazo p más corto que el q; y los acrocéntricos con el centrómero en un extremo resultan en un brazo p muy pequeño (Madian N & Jayanthi KB, 2014).

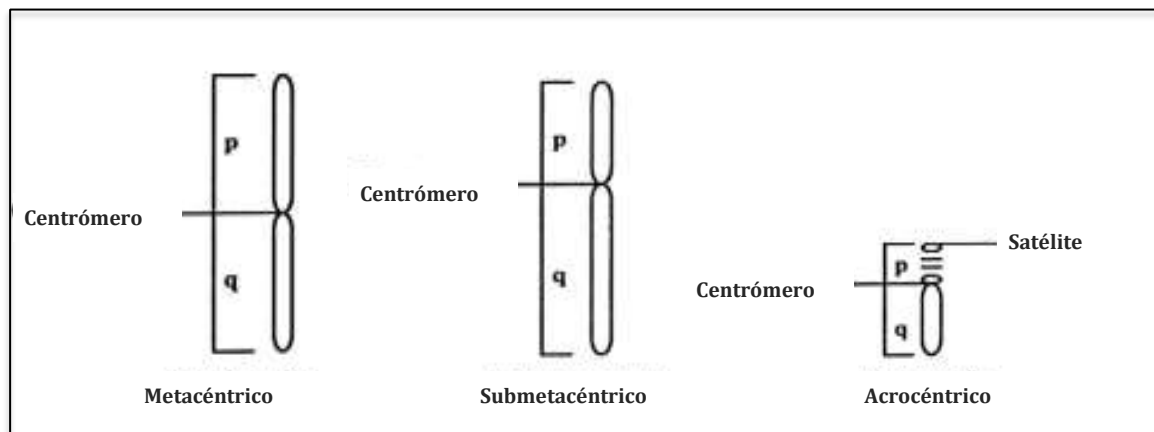


Figura 6. Clasificación de cromosomas de acuerdo a la posición del centrómero (Imagen modificada de Madian N & Jayanthi KB, 2014).

Tabla 1. Clasificación de cromosomas por tamaño descendente y posición de centrómero (Modificada de ISCN, 2013).

GRUPO	CROMOSOMAS	DESCRIPCIÓN
A	1-3	1 y 3 Metacéntricos grandes, 2 submetacéntrico grande
B	4-5	Submetacéntricos grandes
C	6-12, X	Submetacéntricos medianos
D	13-15	Acrocéntricos medianos con satélites
E	16-18	Submetacéntricos pequeños
F	19 y 20	Metacéntricos pequeños
G	21, 22, Y	Pequeños acrocéntricos con satélites. El Y no es acrocéntrico pero se coloca aquí por tamaño.

1.4 CICLO CELULAR

El ciclo celular tiene como finalidad la duplicación adecuada del genoma de una célula y distribución precisa del material genético a dos células hijas que serán genéticamente idénticas. Este proceso complejo se puede conceptualizar en dos fases: interfase (que se divide en G1, S, G2. G de *gap* en inglés o brecha y S de *synthesis*) y mitosis (Truman AW, et al., 2012). Durante estas fases, los cromosomas van modificando su nivel de compactación hasta llegar al máximo nivel en metafase (Moore CM & Best RG, 2007).

Para que el ciclo celular progrese es indispensable la participación de las ciclinas y la familia de proteínas cinasas dependientes de ciclinas (CDK por *cyclin-dependent kinases*) (Kitazono AA, et al., 2005). Las ciclinas son las subunidades necesarias para activar las CDK y tienen actividades específicas que contribuyen a las transiciones tiempo-específicas e irreversibles del ciclo celular. Son diferencialmente sensibles a inhibidores, están localizadas en diferentes sitios dentro de la célula y tienen blancos específicos, características que son esenciales para un buen control del ciclo celular (Bloom J, 2007). Las CDK son cinasas de serina y treonina que como monómero no tienen actividad enzimática y dependen de una o varias ciclinas específicas para funcionar. Recientemente, se han identificado microRNA (miRNA) y RNA largos no codificantes (lncRNA) como controladores del ciclo celular mediante mecanismos como regulación traduccional, epigenética, transcripcional, postranscripcional y andamiajes proteicos (Kitagawa M, et al., 2013).

Durante la fase G1, la célula se prepara para la replicación de DNA sintetizando las proteínas necesarias y detectando si el ambiente extracelular es apto para división celular. Es la única fase en la que la progresión del ciclo puede estar influida por el ambiente extracelular como disponibilidad de factores de crecimiento y nutrientes. En G1 la célula se compromete replicarse y dividirse y en ausencia de alteraciones es un proceso que ocurre de manera altamente coordinada y de forma automática (Li Y, et al., 2014).

Los orquestadores de la entrada a la fase G1 son los complejos CDK4, CDK6, CDK2 que se unen a ciclinas de la familia D (D1, D2, D3), ciclina E y A. La función principal de los complejos CDK4 y 6 es fosforilar proteínas como pRB, p107 y p130 para que dejen de controlar negativamente a factores de transcripción de la familia E2F cuyos blancos son genes involucrados en la replicación del DNA (Pajalunga D, et al., 2007). En la fase tardía de G1 se encuentra el punto de restricción el cual es controlado por CDK2/ciclina E y permite la entrada a la fase S (Stein GS, et al., 2002).

En la fase S el genoma se replica y los niveles elevados de CDK2/ciclina A son indispensables. Interesantemente, niveles altos de CDK2 también son fundamentales para evitar más de una replicación en la misma célula y tener información genética triple o cuádruple (Li Y, et al., 2014).

Posteriormente la célula entra a la fase G2 donde se lleva a cabo la mayor parte de la reparación del DNA y la preparación de la célula para la mitosis o fase M. Cuando se alcanza la fase G2, la célula contiene dos copias idénticas de cada uno de los 46 cromosomas. (Moore CM & Best RG, 2007). La transición G2/S está regulada por CDK1/ciclina B (Li Y, et al., 2014).

La actividad de las CDK es regulada por dos clases de proteínas cinasas inhibitoras dependientes de ciclinas (CKI): las familias INK4 y Cip/Kip. La familia INK4 comprende cuatro miembros llamados p15, p16, p18 y p19. Los inhibidores Cip/Kip incluyen a p21, p27 y p57. Los inhibidores INK4 previenen la asociación específicamente de CDK4 y 6 con las ciclinas D. Por el contrario, Cip/Kip se pueden unir a toda clase de ciclinas y CDK de manera independiente y regulan todas las fases del ciclo celular (Besson A, et al., 2008).

La división celular en humanos ocurre de dos modos diferentes: mitosis y meiosis. Las células somáticas se dividen por mitosis dando lugar a dos células hijas idénticas. La meiosis es un proceso especializado de las líneas germinales, que involucra una ronda de replicación del DNA seguida de dos divisiones celulares para producir células sexuales o gametos haploides (Moore CM & Best RG, 2007).

1.4.1 FASE M o MITOSIS

La fase M incluye a la mitosis que es el periodo de división nuclear, la cual tiene 5 etapas, más la citocinesis (Moore CM & Best RG, 2007).

1. Profase: Condensación de cromosomas en unidades visiblemente independientes. Formación de centriolos y microtúbulos en el huso mitótico.

2. Prometafase: Destrucción de membrana nuclear. Interacción de microtúbulos con cromosomas.

3. Metafase: Condensación máxima de los cromosomas y alineamiento en el plano medial entre los dos polos. El huso mitótico se termina de formar con fibras que conectan polo a polo y bipolar a los cinetocoros del centrómero.

4. Anafase: Los centrómeros de cromátides hermanas se dividen e inicia el movimiento hacia polos opuestos y la separación de los polos.

5. Telofase: Inicia la formación de la membrana nuclear alrededor de cada grupo de cromosomas.

Citocinesis: División del citoplasma celular en dos células hijas diploides con material genético idéntico (Figura 7).

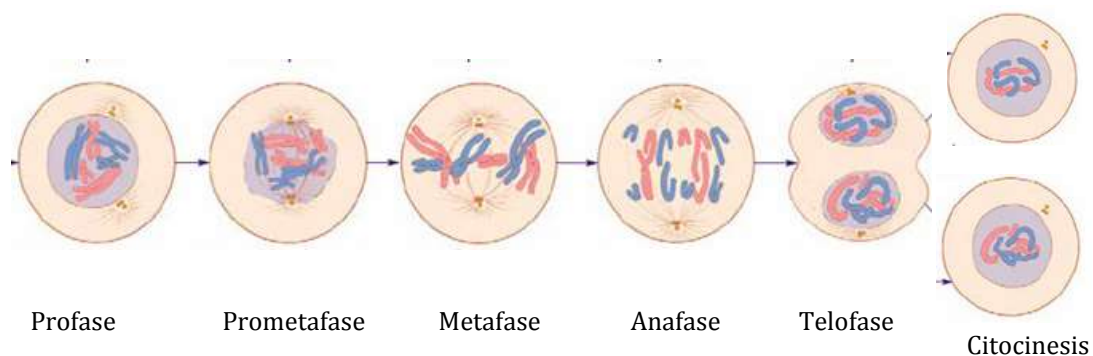


Figura 7. Esquema de las fases de la mitosis incluyendo la citocinesis. Se ilustra el movimiento de los cromosomas y la formación del huso mitótico. (Imagen modificada de Saltsman K, 2005).

1.4.2 MEIOSIS

La meiosis es un proceso de división celular que se realiza en las células germinales (Moore CM & Best RG, 2007). La profase I de la meiosis consta de las siguientes fases:

- Leptoteno: Condensación de cromosomas.
- Cigoteno: Alineamiento y unión de cromosomas homólogos por el complejo sinaptonémico. Cada par de homólogos es un bivalente (4 cromátides hermanas).
- Paquiteno: Máxima sinapsis entre bivalentes y ocurre el entrecruzamiento e inicia la formación de quiasmas.
- Diploteno: Degradación del complejo sinaptonémico, bivalentes se mantienen unidos por quiasmas.
- Diacinesis: Aumenta la condensación cromosómica y los quiasmas se desplazan hacia los telómeros (Kohli J & Hartsuiker E, 2008).

Posteriormente, metafase I, anafase I y telofase I resultan en dos células hijas con un número haploide ($1n$) de cromosomas pero con 46 cromátides, 2 en cada cromosoma. Al final de la meiosis II, el número de cromosomas se mantiene haploide con un total de 23 cromosomas o moléculas de DNA en cada célula hija. La recombinación se completa en paquiteno de la meiosis I, ocurre recombinación entre material genético de los cromosomas maternos y paternos la cual es un mecanismo importante para la diversidad de la progenie ya que cada individuo será genéticamente único (Hultén MA, 2010) (Figura 8).

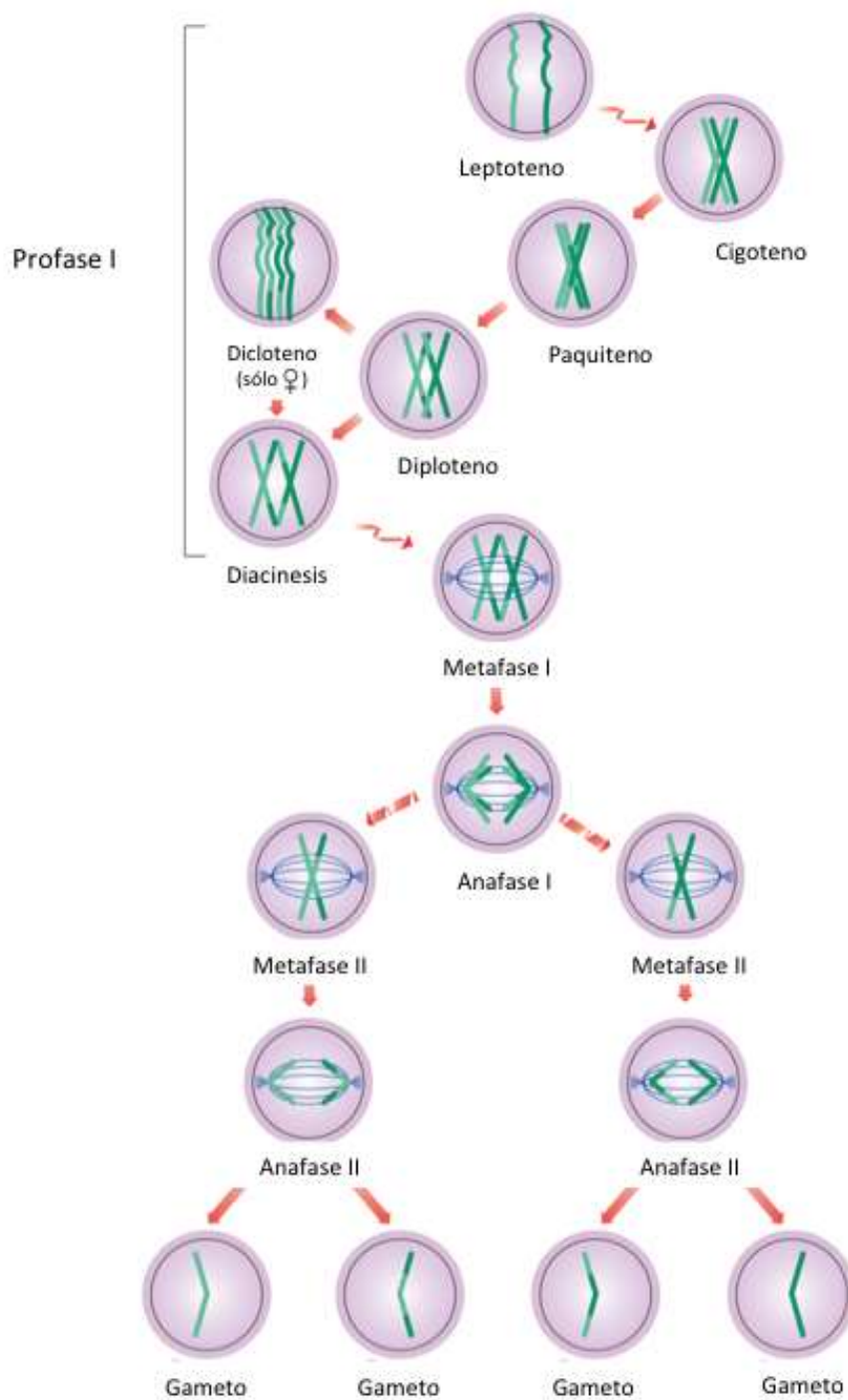


Figura 8. Esquema de la meiosis. Se muestran las fases I y II, se señalan los estadios de la profase I y los gametos obtenidos (Figura modificada de Moore CM & Best RG, 2007).

1.5 ALTERACIONES CROMOSÓMICAS

Las alteraciones cromosómicas pueden ser numéricas o estructurales y resultan en mecanismos patogénicos que ocasionan una gama de efectos sobre la dosis génica, disrupción de genes, efectos en la posición de genes, entre otros (Gardner RJM, et al., 2012).

1.5.1 ALTERACIONES CROMOSÓMICAS NUMÉRICAS

Las alteraciones numéricas se refieren a la ganancia o pérdida de uno o más cromosomas y se pueden clasificar en aneuploidías o poliploidías (Robinson WP & McFadden DE, 2002). Aneuploidía se refiere a la presencia en una célula de un número de cromosomas que no es múltiplo del número haploide. A la pérdida de un cromosoma se le denomina monosomía, a la pérdida de dos nulisomía y a la ganancia de uno trisomía en cigotos o células diploides (Delhanty J, 2010). Ocurren por un defecto en la segregación cromosómica durante la división celular y pueden ser por no disyunción meiótica o mitótica. La no disyunción mitótica da lugar a la presencia de dos ó más líneas celulares situación que se conoce como mosaicismo (Robinson WP & McFadden DE, 2002).

La no disyunción cromosómica es la segregación no balanceada de cromosomas y puede ocurrir en meiosis I o meiosis II (Shaffer L, 2005). En estos procesos cada cromosoma homólogo o cromátide hermana tiene que viajar a un polo de la célula para que la información genética se divida de manera equivalente entre las células hijas. Los defectos que pueden llevar a la segregación de cromosomas errónea incluyen las alteraciones en el citoesqueleto y el huso mitótico, anomalías intrínsecas del cromosoma (por ejemplo cromosomas dicéntricos), defectos en las proteínas (cohesinas, separinas, etc.) que controlan la separación de los cromosomas en la mitosis y meiosis, entre otros (Gollin SM & Skarja SR, 2005).

Las alteraciones del huso mitótico pueden ser por configuraciones anormales de los cromosomas durante la anafase y se denominan monotélica (sólo una cromátide hermana se ancla al huso mitótico), sintélica (dos cromátides hermanas se anclan a microtúbulos que provienen del mismo polo) o merotélica (una misma cromátide hermana se ancla al huso de los dos polos) (Walczak CE, et al., 2010) (Figura 9).

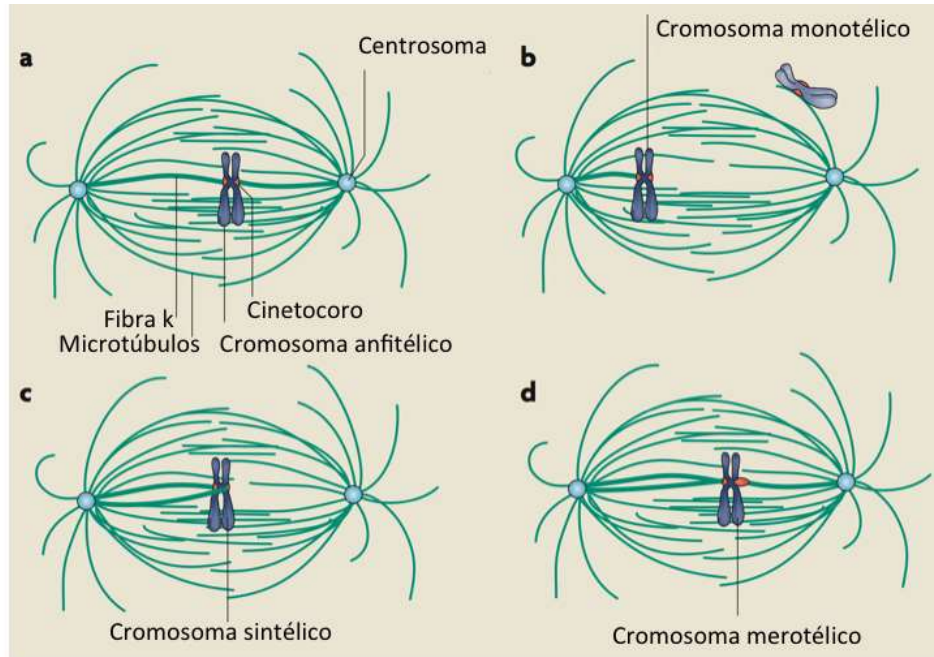


Figura 6. Configuraciones anormales de los cromosomas en el huso mitótico. A. Anitélico (normal). B. Monotélico. C. Sintélico. D. Merotélico (Imagen modificada de Walczak CE, et al., 2010).

Del 10 al 30% de los ovocitos humanos fertilizados presentan aneuploidías principalmente por errores en la meiosis I materna (Peters JM & Hauf S, 2005). Las trisomías representan la aneuploidía más común entre recién nacidos vivos, algunos ejemplos son los síndromes de Down (trisomía 21), Edwards (trisomía 18) y Patau (trisomía 13). En relación a alteraciones numéricas de los cromosomas sexuales está como ejemplo de monosomía el síndrome de Turner (45,X). Las anomalías cromosómicas específicas se han asociado a más de 60 síndromes identificables. Se encuentran presentes en más de 50% de los abortos espontáneos del primer trimestre, del 25 al 50% en abortos y mortinatos, 6% de óbitos, 5% de parejas con pérdidas gestacionales y del 0.5-0 al 6% de recién nacidos vivos (Shaffer LG & Lupski JR, 2000; Luthardt F, 2005).

Las poliploidías se refieren a ganancias que resultan en múltiplos exactos del número haploide (euploidías). En el caso de humanos una triploidía tendría 69 cromosomas y una tetraploidía 92 (Robinson WP y McFadden DE, 2002).

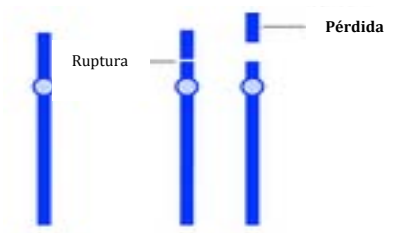
1.5.2 ALTERACIONES CROMOSÓMICAS ESTRUCTURALES

Las aberraciones cromosómicas estructurales son cambios físicos en la estructura de cromosomas que pueden resultar en malformaciones, retraso mental o un riesgo aumentado de abortos o infertilidad. La alineación incorrecta de cromosomas homólogos seguida de una recombinación o las rupturas cromosómicas pueden resultar en deleciones, duplicaciones, inversiones o translocaciones, entre otros, en la progenie con material genético balanceado o desbalanceado (Moore CM & Best RG, 2001; Hultén MA, 2010). Se presentan en 1:1000 recién nacidos vivos y ocasionan enfermedad por trisomía y/o monosomía de segmentos cromosómicos. Estos eventos se pueden presentar *de novo* o pueden ser heredados de un padre portador balanceado con fenotipo normal (Luthardt FW & Keiteges E, 2005).

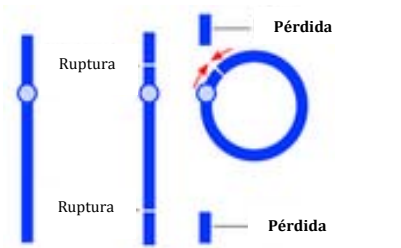
Las alteraciones estructurales cromosómicas comprenden (Moore CM & Best RG, 2001):

1. Delección: Pérdida de la parte de un cromosoma y trae como consecuencia monosomía de esa región. Se pueden clasificar en deleciones terminales (Figura 7a) y deleciones intersticiales (Figura 7c).
2. Anillo: Resulta de una ruptura en cada brazo de un cromosoma y la unión de los extremos o de la unión de secuencias teloméricas resultando en la pérdida de material de las regiones involucradas (Figura 7b).
3. Translocación: Intercambio de material genético entre cromosomas no homólogos (Figura 7d). Pueden ser balanceadas o no balanceadas (las cuales tienen repercusión en el fenotipo); recíproca o involucrando a cromosomas acrocéntricos.
4. Duplicación: Rearreglo que implica la presencia de una copia extra de una región cromosómica (Figura 7e).
5. Inversión: Resulta de dos puntos de ruptura en un cromosoma y la rotación en 180 grados del segmento resultante y la re inserción dentro del mismo cromosoma. Se clasifican en inversiones pericéntricas (cuando el segmento resultante involucra el centrómero) y paracéntricas (cuando los puntos de ruptura no involucran al centrómero) (Figura 7f).

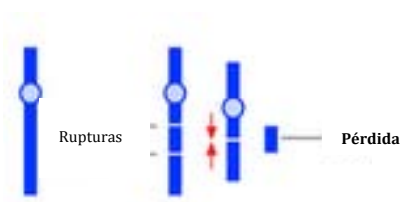
La recombinación homóloga no alélica o NAHR por sus siglas en inglés, fue el primer mecanismo descrito como causa de enfermedades genómicas las cuales están producidas por microdeleciones y microduplicaciones ocasionando fenotipo específicos. Para que ocurra es necesario que haya secuencias repetidas de bajo número de copias para que actúen como sustrato en la recombinación (Gu W, et al., 2008). La mayor parte de los síndromes por microdelección, incluyendo síndromes como el de Wolf-Hirschhorn se pueden deber a este mecanismo (Giglio S, et al., 2002).



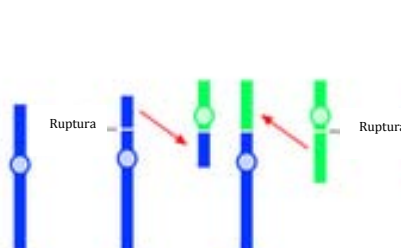
a) Delección terminal: un punto de ruptura.



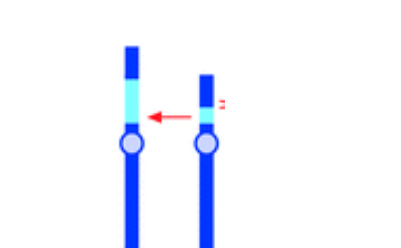
b) Anillo



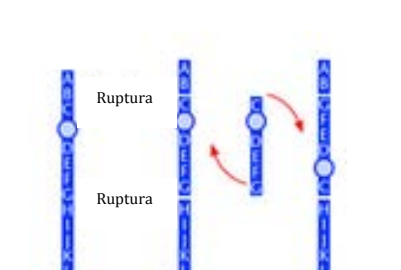
c) Delección intersticial: dos puntos de ruptura.



d) Translocación



e) Duplicación



f) Inversión

Figura 7. Aberraciones cromosómicas estructurales. Se muestran diagramas de las diferentes alteraciones cromosómicas (Moore CM & Best RG, 2001).

1.5.3 CONSECUENCIAS DE LAS TRANSLOCACIONES EN LA SEGREGACIÓN

En portadores de translocaciones la recombinación de cromosomas homólogos durante la meiosis está alterada y durante el proceso se forma un cuadrivalente, el cual se observa durante paquíteno en forma de cruz (de ahí el nombre de “cruz de paquíteno”) de manera que segmentos homólogos están alineados aún sin ser del mismo cromosoma. Este apareamiento ocurre después de la replicación y por ende consiste en cuatro cromátides. Al final los resultados posibles son (Figura 8):

- Segregación alterna- Los cromosomas alternos se dirigen juntos hacia un polo y los translocados hacia otro- todos los gametos son balanceados.
- Segregación adyacente I- Los centrómeros adyacentes no homólogos y se desplazan hacia el mismo polo resultando en un complemento cromosómico no balanceado al momento de unirse con otro gameto haploide con trisomía parcial para un cromosoma y monosomía parcial para el otro.
- Segregación adyacente II- Los centrómeros adyacentes homólogos se desplazan hacia el mismo polo resultando después de la fecundación en monosomía y trisomía casi completa por lo que generalmente no son compatibles con la vida.
- Segregación 3:1- 3 cromosomas del cuadrivalente se van hacia un mismo polo y sólo uno al polo opuesto; posterior a la unión con un gameto haploide el producto tendrá 47 cromosomas. En esta segregación existen 4 posibilidades distintas ya que cada una de ellas se desplazaría un cromosoma solo del cuadrivalente hacia un polo.
- Segregación 4:0- Los cuatro cromosomas del cuadrivalente se desplazan hacia el mismo polo dejando un polo sin y por consiguiente un gameto sin ninguno de los cromosomas del cuadrivalente.

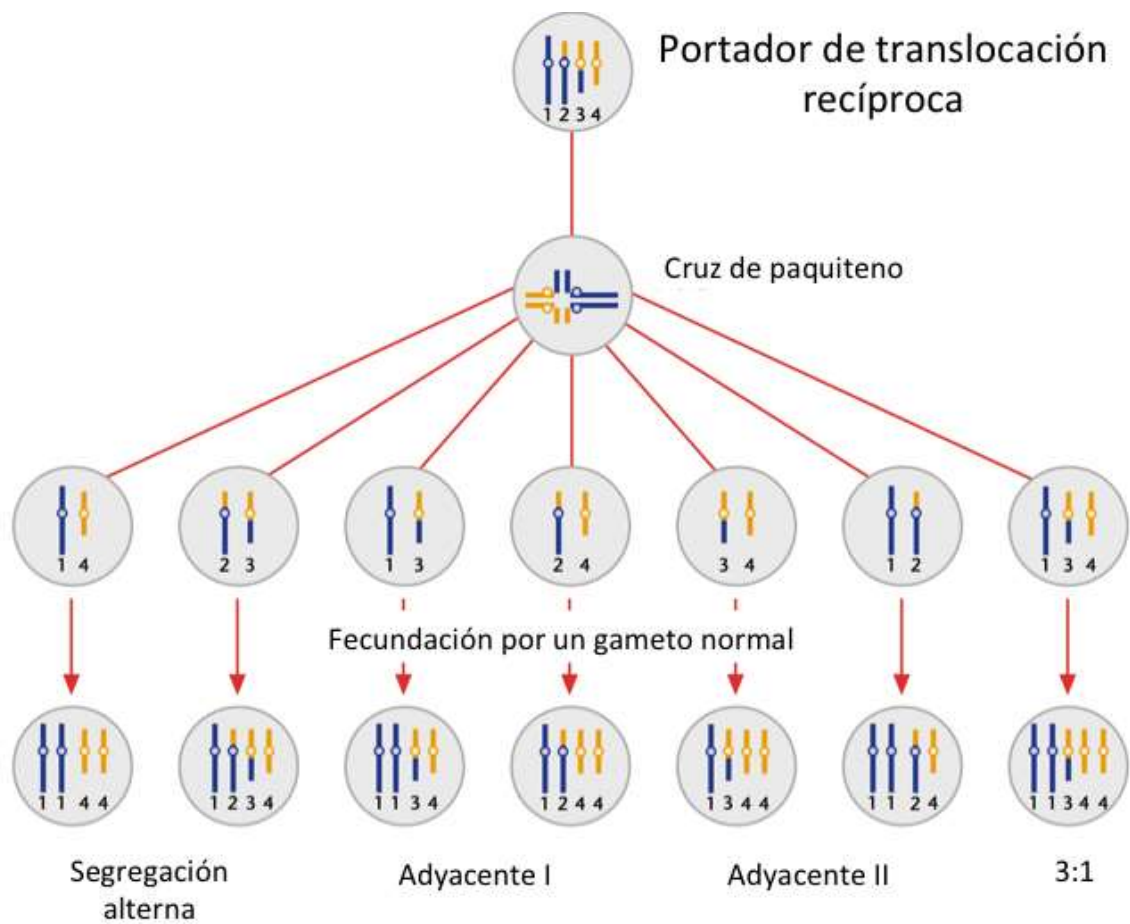


Figura 8. Complemento cromosómico de un portador de una translocación no balanceada y la subsecuente cruz de paquitenio con ejemplos de las posibilidades de segregación y los cigotos resultantes de fertilización por un gameto haploide (Modificado de Moore CM & Best RG, 2001).

1.6 TÉCNICAS DE CITOGENÉTICA CONVENCIONAL Y MOLECULAR

La citogenética es una rama de la genética que en la clínica es fundamental para el diagnóstico, pronóstico y en ocasiones tratamiento de los pacientes. Existen técnicas convencionales como el cariotipo con bandas GTG y técnicas moleculares como la hibridación con fluorescencia *in situ* o FISH, por sus siglas en inglés y la hibridación genómica comparada (CGH) sobre microarreglos (Jackson L, 2002; Beheshti B, et al., 2002).

1.6.1 CARIOTIPO

La citogenética convencional incluye las diferentes técnicas de tinción de bandas, las cuales se observan como regiones oscuras y claras en los cromosomas de acuerdo a un patrón característico de cada uno de ellos. El nivel de resolución se refiere al número de bandas que se pueden observar en un cariotipo considerándose que un número de 450 a 550 bandas es la resolución estándar y cuando por ejemplo se dice que hay una resolución de 800 bandas, se considera de alta resolución (ISCN 2013). Se pueden observar alteraciones de máximo 3-5 megabases (Mb) (considerando un poder de resolución de 500 a 800 bandas) con este método y se requieren de células en división para observar los cromosomas (Sharkey FH, et al., 2005).

Las causas moleculares por las cuales los cromosomas se tiñen de manera distinta son complejas e involucran cambios en la estructura de la cromatina y composición de las bases del DNA. La técnica más comúnmente utilizada es la tinción con bandas GTG o bandas G en la cual se utiliza los colorantes Giemsa y Wright así como otros componentes como tripsina para obtener el patrón de bandas. Con esta técnica se observan bandas claras (ricas en guanina y citosina) y bandas oscuras (ricas en adenina y timina). Las bandas claras son regiones transcripcionalmente activas y ricas en genes y en secuencias GC. Las bandas oscuras contienen menor cantidad genes así como regiones heterocromáticas y secuencias AT (Holmquist JP, 2005) (Figura 9).

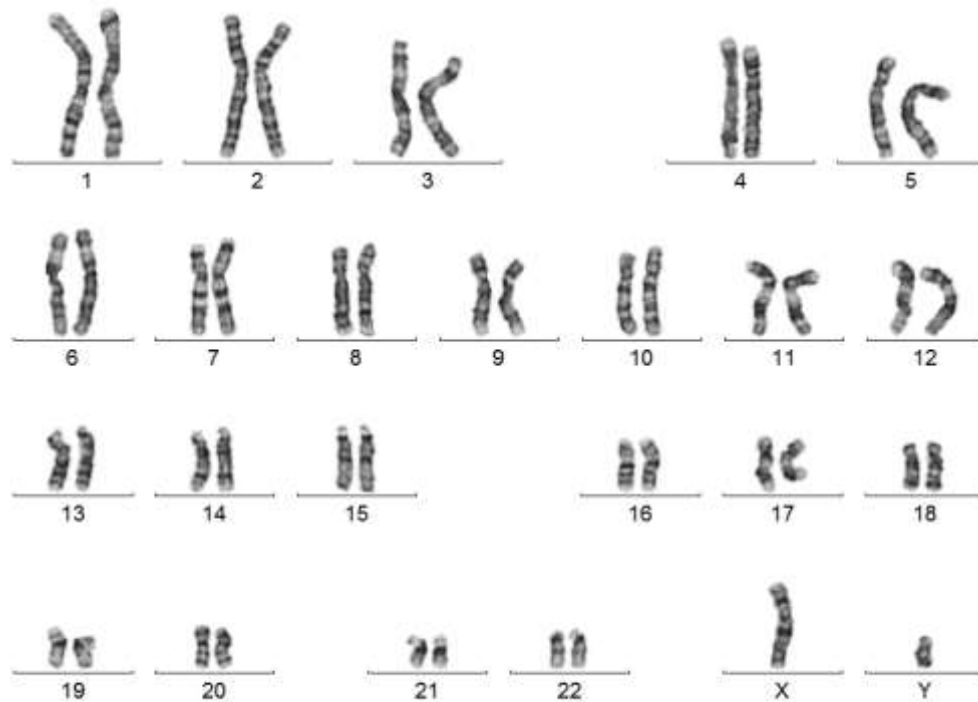


Figura 9. Cariograma 46,XY con técnica de bandas GTG (Biol. Ariadna Berenice Morales Jiménez. Laboratorio de Citogenética, Depto. de Genética, HIMFG).

Existen otras técnicas de bandeo como las bandas Q en las cuales se usa una tinción con mostaza de Quinacrina y microscopía de fluorescencia. Las bandas que fluorescen intensamente corresponden a las regiones ricas en AT mientras que las que lo hacen de forma menos intensa son regiones ricas en (Bickmore WA, 2001).

Las bandas R crean un patrón opuesto a las bandas G y se denominan así por bandas reversa. Se utilizan sustancias con afinidad para las regiones ricas en GC. La técnica de bandas C tiñe selectivamente las regiones de heterocromatina constitutiva compuestas de secuencias altamente repetitivas ordenadas en tándem. Consisten en el tratamiento de la cromatina con soluciones ácidas y posteriormente básicas, para después ser teñidas con Giemsa. Los brazos cortos y los satélites de los cromosomas acrocéntricos, la heterocromatina pericentromérica, y gran parte del brazo largo del cromosoma Y son positivos para las bandas C, debido a que están constituidas por DNA satélite y muestran variaciones de tamaño o polimorfismos en individuos normales como por ejemplo 21ps+ (Moore CM y Best RC, 2001).

Las bandas NOR consisten en una tinción con nitrato de plata que tiñe las regiones organizadoras nucleolares ubicadas en los tallos de los satélites de cromosomas acrocéntricos, identificando la actividad nucleolar. En las bandas T se utiliza la naranja de acridina permitiendo la coloración de los telómeros, facilita la interpretación de rearrreglos cromosómicos en combinación con otras técnicas de bandeado (Moore CM & Best RG, 2001; Hsieh C, 2011).

1.6.2 ANÁLISIS POR HIBRIDACIÓN *IN SITU* CON FLUORESCENCIA

La técnica de FISH o hibridación *in situ* con fluorescencia (del inglés: *fluorescence in situ hybridization*) involucra el uso de sondas de DNA marcadas con fluorescencia que son capaces de hibridar con regiones cromosómicas complementarias (Speicher MR y Carter NP, 2005). Las secuencias de DNA en las sondas son conocidas y se utilizan para marcar una región específica en cromosoma de interés. Esta técnica da un nivel de resolución más alto que el cariotipo con bandas GTG ya que dependiendo del tipo de sonda que se utilice se pueden detectar regiones mucho más pequeñas en un cromosoma. Ha sido muy útil en la caracterización y diagnóstico de enfermedades ya que puede detectar ganancias o pérdidas de material, además de otras alteraciones cromosómicas estructurales (Gole L, 2001).

Los elementos básicos del procedimiento de FISH incluyen (Tsuchiya KD, 2011) (Figura 10):

1. Selección de la(s) sonda(s) complementarias para la secuencia de interés.
2. Marcaje de la sonda.
3. Desnaturalización de la sonda y la secuencia de interés.
4. Hibridación.
5. Análisis e interpretación.

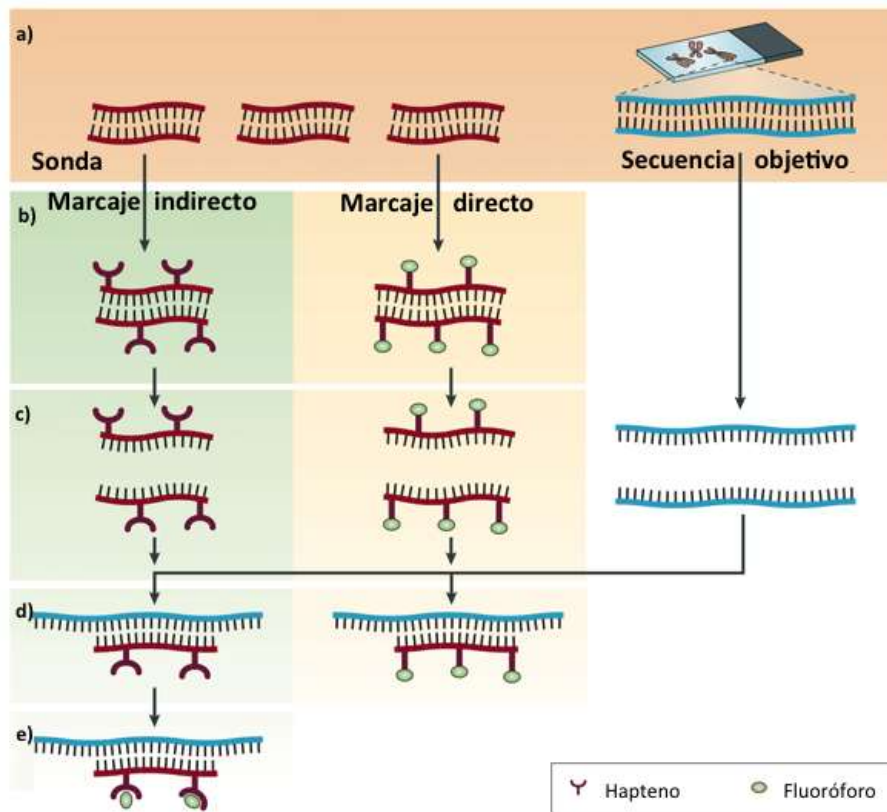


Figura 10. Esquema de un ensayo FISH. a) Se muestra la sonda y secuencia objetivo en doble cadena. b) Marcaje directo e indirecto de la sonda. c) Desnaturalización de la sonda y de la secuencia objetivo. d) Hibridación entre la secuencia de interés y la sonda marcada. e) Acoplamiento del fluoróforo al hapteno en la sondas marcadas indirectamente (Imagen modificada de Speicher MR & Carter NP, 2005).

Existen diferentes tipos de sondas para esta técnica: 1. Centrómero específicas, 2. Cromosoma completo, 3. Secuencia única o locus-específica (Figura 11) (Speicher MR & Carter NP, 2005).



Figura 11. Ejemplo de análisis por FISH con sonda DiGeorge/Velocardiofacial secuencia específica *TUPLE1* Spect Orange/*ARSA* Spect Green (Vysis® Abbott Laboratories. Abbott Park, Illinois, USA). Se observa una señal naranja y dos verdes demostrando una microdelección positiva de la región 22q11.2 (Biol. Ariadna Berenice Morales Jiménez. Laboratorio de Citogenética, Depto. de Genética, HIMFG).

1.6.3 CARIOTIPO MOLECULAR O HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARATIVA SOBRE MICROARREGLOS (aCGH)

Existen otras técnicas para el análisis cromosómico entre ellas el estudio de hibridación genómica comparativa sobre microarreglos (o aCGH por sus siglas en inglés) para la cual se usan plataformas donde se encuentran unidas pequeñas secuencias de DNA o sondas marcadas y sobre ésta se coloca el DNA de estudio y de referencia permitiendo identificar deleciones y amplificaciones de regiones genómicas completas con lo que se mejoró la resolución del estudio siendo posible detectar alteraciones hasta de menos de 1Mb (Shaffer LG y Bejjani BA, 2004).

Las sondas colocadas en el microarreglo están diseñadas para representar áreas de interés y pueden ser de tamaños variables que van desde 80 a 300 kb hasta 20 a 85 pb. La resolución de un microarreglo está determinada por el tamaño, número y distancia del DNA genómico entre las sondas (Walker LC y Waddell N, 2010).

Una de las ventajas de aCGH es su capacidad para detectar de manera simultánea aneuploidías, deleciones, duplicaciones o amplificaciones de cualquier segmento de DNA representado en el microarreglo, así mismo, puede detectar tanto alteraciones submicroscópicas como alteraciones numéricas y estructurales identificadas por citogenética convencional. Con esta técnica se puede estudiar las variaciones en el número de copias (CNV) de aproximadamente 100 kb (Walker LC y Waddell N, 2010).

Sin embargo, también presenta desventajas, el aCGH no detecta rearrreglos en el que no hay desequilibrio en la dosis de DNA, como translocaciones balanceadas e inversiones y aunque detecta cambios de número de copias de DNA no puede diferenciar porqué este producido este cambio, si se debe a un cromosoma marcador, duplicación, inserción o translocación desbalanceada, por lo que en ocasiones es necesario hacer estudios adicionales (Walker LC y Waddell N, 2010).

1.7 INDICACIONES PARA ESTUDIOS CITOGENÉTICOS

De acuerdo a la edad del paciente, el análisis cromosómico está indicado en las siguientes situaciones (Sharkey H, et al., 2005; Warburton D, 2005):

1) Período prenatal:

- Edad mayor de 35 años
- Ansiedad materna
- Triple marcador alterado
- Oligohidramnios-polihidramnios
- Retraso de crecimiento intrauterino
- Arteria umbilical única
- Sospecha ecográfica de cromosomopatía
- Antecedentes de cromosomopatía balanceada en uno de los padres

2) Período neonatal:

- 2 o más malformaciones mayores aisladas
- Presencia de 3 o más malformaciones menores
- Recién nacido con genitales ambiguos
- Parto con producto finado de causa inexplicable
- Muerte neonatal de causa inexplicable

3) Período de lactancia

- Niños con dificultades para el aprendizaje
- Niños con rasgos dismórficos
- Niños con retraso psicomotor

4) Período Preescolar-Escolar

- Trastornos del crecimiento
- Retraso psicomotor
- Rasgos dismórficos

5) Período de adolescencia

- Ginecomastia
- Falta del desarrollo puberal
- Amenorrea primaria o secundaria
- Retraso mental
- Rasgos dismórficos

6) Período del adulto

- Padres de niños con anomalías cromosómicas estructurales
- Abortos de repetición (2 o más abortos)

- Infertilidad
 - Diagnóstico prenatal
- 7) En todas las edades
- Procesos malignos
 - Control de trasplantes de médula ósea

1.8 CARACTERÍSTICAS DEL CROMOSOMA 4 HUMANO

El cromosoma 4 es submetacéntrico y es el cuarto cromosoma más grande en el ser humano. Contiene aproximadamente 191 megabases de DNA lo cual es aproximadamente 6% del genoma humano con 747 genes codificantes para proteínas, 1,130 genes no codificantes y 722 pseudogenes (Cunningham F, et al., 2015).

Existen aproximadamente 155 enfermedades asociadas a alteraciones en el cromosoma 4; los genes en este cromosoma se han visto involucrados en una gran cantidad de enfermedades desde mieloma múltiple hasta distrofia facio-escapulo-humeral (MIM #158900) y el síndrome de Wolf-Hirschhorn. Por poner un ejemplo, si consideramos sólo la región 4p16.3 se encuentran genes involucrados en una gama muy amplia de enfermedades como mucopolisacaridosis tipo 1 (MIM #607014), acondroplasia (MIM #100800) y de esta última sus enfermedades alélicas como hipocondroplasia (MIM #146000), displasia tanatofórica tipo I (MIM #187600), síndrome de Crouzon con acantosis nigricans (#612247), enfermedad de Huntington (#143100) y retinitis pigmentosa (#613801), entre otras (NCBI Map Viewer) (Figura 12).

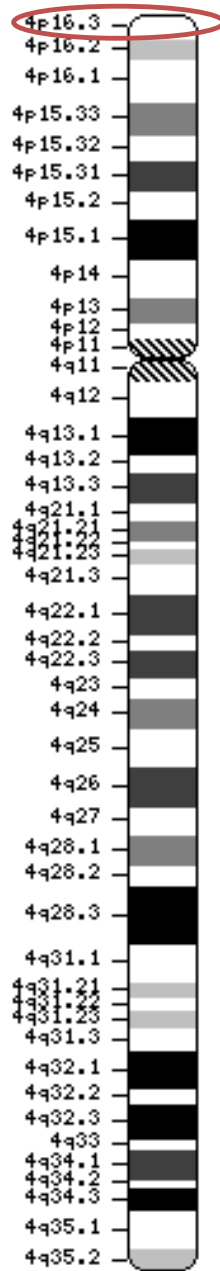


Figura 12. Ideograma del cromosoma 4 donde se delimitan las regiones, bandas y sub-bandas cómo se verían con tinción GTG. Se resalta la región 1, banda 6, sub-banda 3. (Imagen modificada de NCBI MapViewer).

1.9 SÍNDROME DE WOLF-HIRSCHHORN

El síndrome de Wolf-Hirschhorn (SWH) es un síndrome caracterizado por múltiples anomalías congénitas y déficit intelectual. Se define como un síndrome de genes contiguos causado por una deleción de material en la porción distal del cromosoma 4 (4p16.3). Fue descrito por primera vez por Cooper y Hirschhorn en 1961 en un paciente masculino de 7 meses de edad con hipotonía, peso bajo para edad gestacional, crisis convulsivas de difícil control, defectos de línea media y dismorfias (Figura 13) y con pérdida de material en el brazo corto de uno de los cromosomas del grupo B (cromosomas 4 y 5) (Figura 14).

En 1963 Lejeune J, et al. describieron por primera vez el síndrome de cri-du-chat y convencidos de que se trataba del cromosoma más pequeño del grupo B, se designó a este como el 5 y al caso de Cooper y Hirschhorn se le designó deleción del cromosoma 4 (Hirschhorn K, 2008).

En 1965, Wolf U, et al. describieron un segundo caso con características faciales casi idénticas al caso publicado en 1961 (Figura 15). Al editor de la revista *Humangenetik* le llamó la atención la similitud en el fenotipo facial ya que ambos pacientes presentaban hipertelorismo, glabella prominente y el puente nasal ancho. En 1965, Hirschhorn y Cooper publicaron el mismo caso en extenso en la revista *Humangenetik* seguido del caso de Wolf U, et al. (Hirschhorn K, 2008).



Figura 13. Fotografías del paciente descrito por Cooper y Hirschhorn donde se puede observar aparente hipertelorismo, el puente nasal ancho, la punta nasal descendente, filtrum corto, y el pabellón auricular izquierdo de baja implantación y en retroposición (Imagen tomada de Hirschhorn K & Cooper HL, 1961).

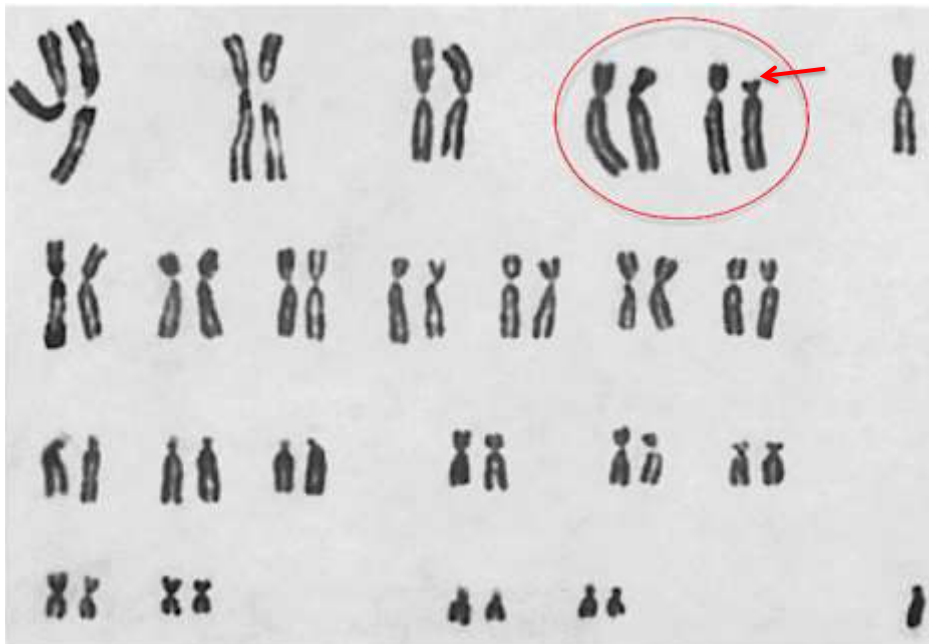


Figura 14. Cariotipo del paciente descrito por Cooper y Hirschhorn en el cual detectaron una deleción (flecha roja) en uno de los cromosomas del grupo 4-5 (círculo rojo) (Imagen modificada de Hirschhorn K & Cooper HL, 1961).



Figura 15. Paciente descrito por Wolf y colaboradores en quien se observa la glabella prominente, el puente nasal ancho, labio hendido bilateral y los pabellones auriculares antevertidos (Imagen tomada de Wolf U, et al., 1965).

La incidencia del SWH se reporta en 1/50,000 recién nacidos vivos con una relación mujer: varón de 2:1 (Debost-Legrand A, et al., 2013). En un estudio epidemiológico en el Reino Unido se reportó una incidencia mínima de 1/96,000 recién nacidos vivos; sin embargo, se consideró que era una cifra muy baja ya que es un síndrome subdiagnosticado probablemente al solo poderse detectar por cariotipo convencional en el 50-60% de los casos (Shannon NL, et al., 2001; Battaglia A et al., 2008).

1.9.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Las características clínicas que clásicamente definen el síndrome son dismorfias faciales, retraso en el crecimiento, déficit intelectual, y crisis convulsivas (Zollino M, et al, 2008). Las alteraciones faciales incluyen: microcefalia, facies de yelmo de guerrero griego, frente alta, glabella prominente, hipertelorismo, epicanto, puente nasal ancho, puntal nasal descendida, filtrum corto, oligodontia, micrognatia, comisuras labiales descendidas, labio y/o paladar hendido, pabellones auriculares displásicos y hoyuelos o “pits” o apéndices preauriculares (Maas NMC, et al. 2008) (Figura 16).



Figura 16. Imágenes faciales de cuatro pacientes con el SWH, nótese el hipertelorismo aparente, el puente nasal ancho, el filtrum corto y las comisuras labiales descendentes en los cuatro casos (Imagen modificada de Battaglia A, et al., 2008).

Las malformaciones congénitas sistémicas y sus complicaciones forman una parte fundamental del diagnóstico de SWH. Entre otras se han reportado las siguientes presentadas en relación a sus frecuencias respectivas: malformaciones del sistema nervioso central (80%), alteraciones oculares (75-100%), inmunodeficiencias (69%), malformaciones esqueléticas (60-70%), alteraciones dentarias (50%), cardiopatías congénitas (50%), hipoacusia (40%), alteraciones del tracto urogenital (30%) (Battaglia A, et al., 2002) (Tabla 2).

Tabla 2. Alteraciones sistémicas reportadas en pacientes con SWH (Battaglia A, et al., 2002; Battaglia A, et al., 2008; Dickmann A, et al., 2009; Prunotto G, et al., 2013; Paradowska-Stolarz AM, 2014; Wu Chen WY, et al., 2004).

Aparato/Sistema	Anomalías reportadas
Ojos	Estrabismo Dacriostenosis Coloboma de iris y/o nervio óptico Catarata Hipoplasia de fovea Glaucoma Microcórnea Ptosis Proptosis Nistagmus
Audición	Hipoacusia conductiva secundaria a otitis media de repetición Hipoacusia neurosensorial
Sistema nervioso central	Adelgazamiento del cuerpo calloso Atrofia cortical/subcortical Ventriculomegalia Hipoplasia/agenesia de lóbulos posteriores Arrinencefalia
Dientes	Dentición retrasada Taurodontismo Dientes en clavija Agenesia de piezas
Corazón	Comunicación interauricular Estenosis pulmonar Comunicación interventricular Persistencia del conducto arterioso Insuficiencia aórtica Tetralogía de Fallot
Tracto urogenital	Agenesia renal Hipoplasia/displasia quística Riñón en herradura Malrotación renal Exotrofia vesical Uropatía obstructiva Hipospadias Criptorquidia Aplasia/hiperplasia de clítoris Estrías gonadales Ausencia de útero/vagina
Esqueleto	Pie equino varo Displasia congénita de cadera Ectrodactilia Clinodactilia Cifosis/escoliosis Costillas accesorias o fusionadas
Otros	Dificultad para la alimentación Hendiduras faciales Inmunodeficiencia Disfunción hematopoyética

Prácticamente todas las cromosopatías se manifiestan a nivel del sistema nervioso central funcional y anatómicamente y la epilepsia y las malformaciones conllevan a retraso en el desarrollo psicomotor y déficit intelectual (Battaglia A & Guerrini R, 2005). Así, la epilepsia o alteraciones en el electroencefalograma se observan en 95% de los pacientes con el SWH, se inician generalmente durante los 3 primeros años de vida con un pico entre los 6 a 12 meses (Battaglia A, et al., 2008). En orden descendente de frecuencia se presentan convulsiones tónico-clónicas generalizadas (74%), crisis de ausencia (33%), espasmos tónicos (18%), parciales complejas (12%) y clónicas (7%) siendo la fiebre el factor desencadenante más importante y pudiéndose presentar más de un patrón en el mismo paciente (Battaglia A, et al., 2009). El tipo de epilepsia y el hecho de que exista o no en un paciente no se relaciona con el tamaño de la delección (Bergemann AD, 2009).

Las características cognitivas y de comportamiento del SWH han sido estudiadas y comparadas con individuos con otras delecciones subteloméricas como 11q25, 2q37 y 8p23 los pacientes con SWH tienen mayor compromiso cognitivo principalmente en las áreas de comunicación y de comportamiento adaptativo. En cuanto a las capacidades de socialización no se encontraron diferencias significativas e interesantemente se encontraron menos casos de autismo o de espectro autista que en los otros síndromes de delección subtelomérica (Fisch GS, et al., 2010).

La mortalidad se estima en 63.9% al primer año de vida y 77.8% al segundo siendo la causa más común infecciones de tracto respiratorio bajo seguida de muerte súbita, cardiopatía congénita, anoxia al nacimiento y alteraciones renales principalmente (Shannon NL, et al., 2001).

1.9.1.1 TABLAS DE CRECIMIENTO

Se han desarrollado tablas de crecimiento específicas para niños y niñas entre 0 y 4 años con SWH basadas en la medición de 101 individuos de Holanda, Reino Unido, EEUU, Alemania y Australia (Figura 17) (Antonius T et al., 2008).

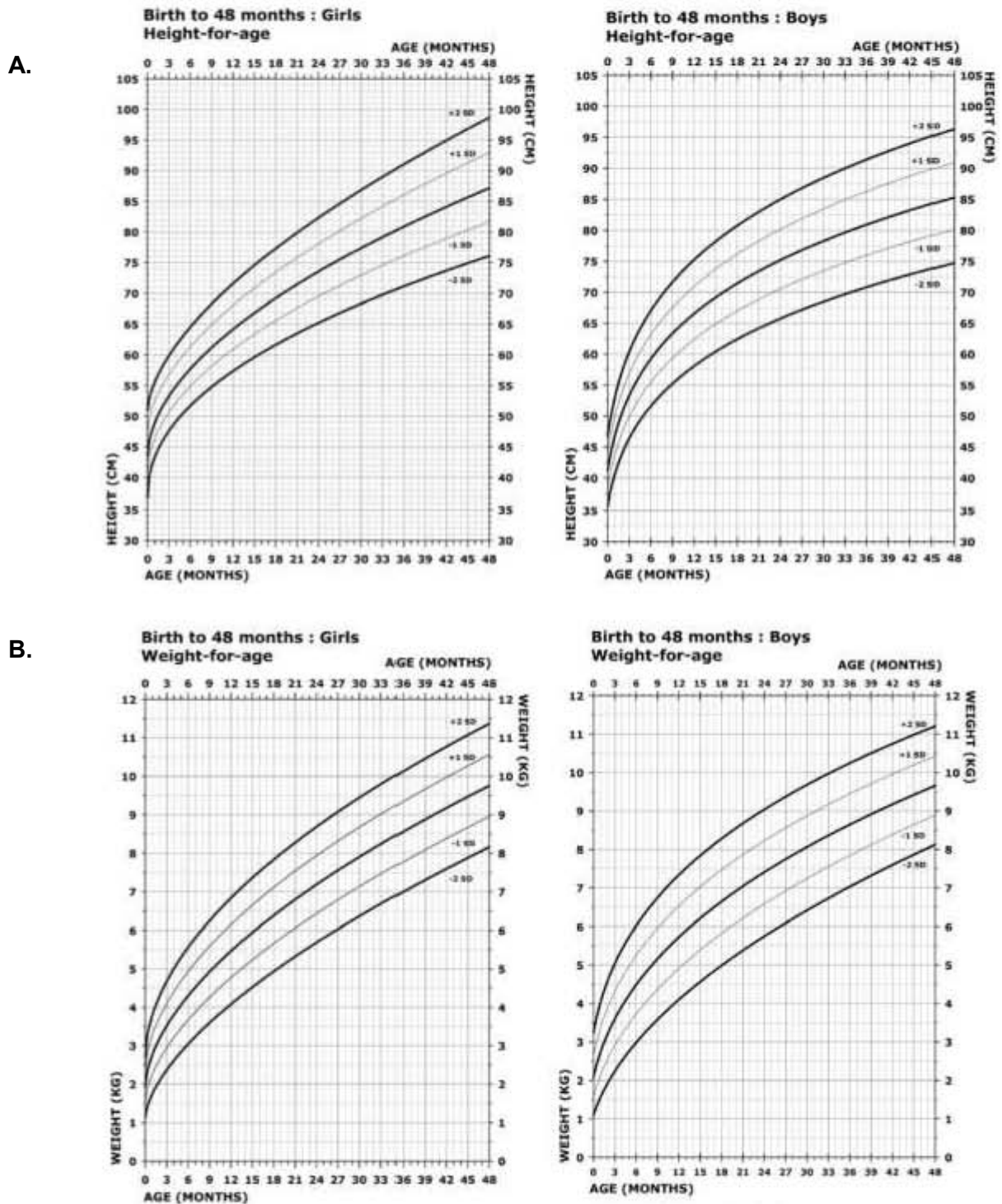


Figura 17. Tablas de crecimiento de A. Talla y B. Peso para niños y niñas entre 0-4 años (Tomado de Antonius T et al., 2008).

1.9.2 BASES CITOGENÉTICAS

El SWH es causado por la delección en la región 4p16.3, del 50 al 60% de los casos son causados por delecciones terminales e intersticiales y son detectables por citogenética convencional. Hasta 45% de los casos se originan por translocaciones no balanceadas y pueden resultar además en una trisomía parcial de otro cromosoma. En el caso de las translocaciones, la mayoría son *de novo* pero hasta un 35% pueden ser heredadas por un progenitor portador balanceado (Battaglia A, et al., 2002; South ST, et al., 2008). Del 25-30% de los casos se deben a microdelecciones *de novo* y se pueden detectar por análisis de FISH para región específica (South ST, et al., 2008).

Varios estudios enfocados en estas translocaciones han reportado puntos de ruptura comunes y sugieren que la arquitectura genómica predispone a estas regiones a delecciones o translocaciones. Los cromosomas involucrados más comúnmente son el 8 y el 11 y esto se debe en parte a la presencia de agrupaciones de genes para receptores olfatorios que se encuentran en los puntos de ruptura de translocaciones recurrentes (Giglio S, et al., 2002). Estas agrupaciones se encuentran también en el cromosoma 4 y de esta forma facilita la NAHR teniendo como resultado translocaciones cromosómicas (Gu W, et al. 2008).

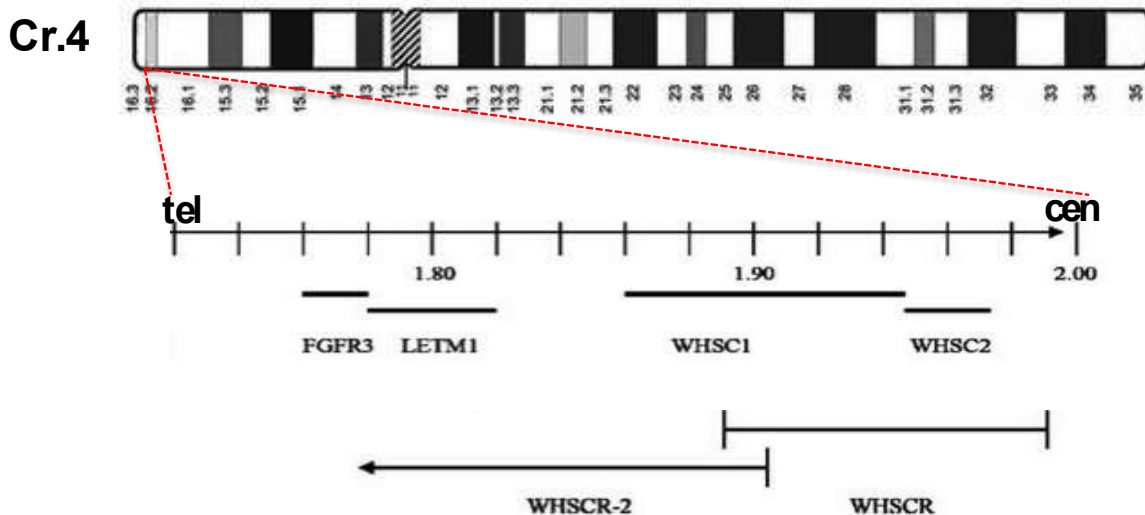
Es importante detectar los casos de translocaciones no sólo para el asesoramiento genético sino también porque la trisomía parcial, dependiendo del tamaño de los segmentos involucrados, puede modificar el fenotipo haciéndolo más grave y con otras complicaciones para el paciente (South ST et al., 2008).

Ha sido posible detectar el tamaño de la delección con técnicas de cariotipo molecular como FISH y CGH microarreglos. Se describen tres categorías de acuerdo a la gravedad del fenotipo y el tamaño de la delección: leve (≤ 3.5 Mb), clásico (de 5 a 18 Mb) y grave (de 22 a 25Mb), lo cual ha permitido clasificar a los pacientes en tres grupos (Zollino M *et al.* 2008):

- En el grupo clasificado como leve, los pacientes pueden tener un déficit intelectual leve que los permite desarrollar lenguaje y deambulaci3n independiente y las malformaciones mayores son raras.
- En el fenotipo clásico, hay presencia de retraso en el desarrollo psicomotor grave con retraso importante o ausencia de lenguaje y malformaciones mayores que involucran la línea media.

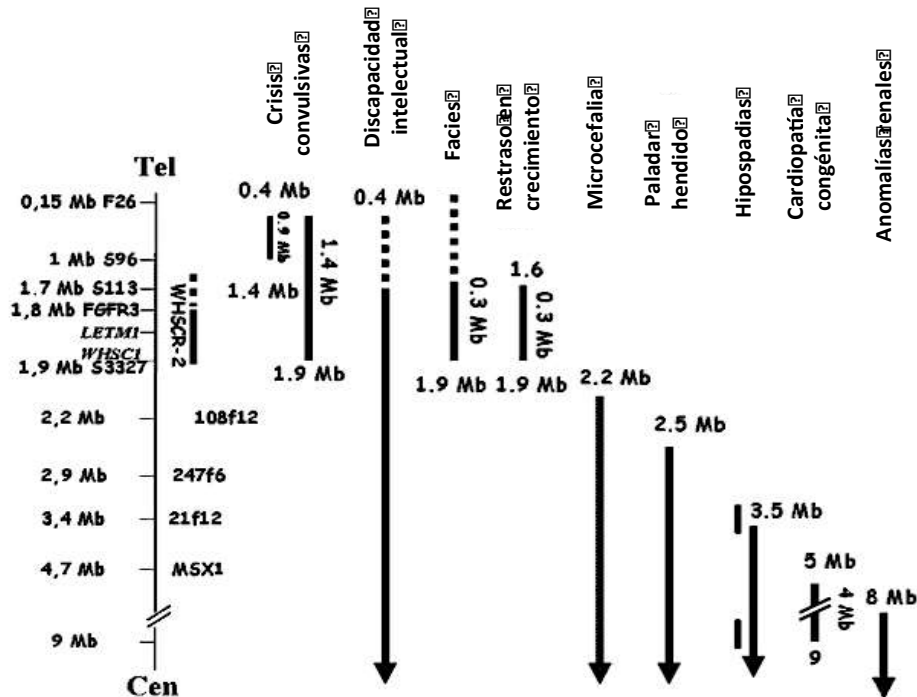
- En el grupo grave los pacientes tienen dismorfias faciales que salen de las típicas para WHS, el retraso psicomotor es muy grave con ausencia de funciones motoras y lenguaje, comportamiento psicótico y malformaciones mayores múltiples.

1.9.3 BASES MOLECULARES DEL SWH



una patogénesis multigénica y que diferentes genes en 4p16.3 son responsables de manifestaciones clínicas distintas (Zollino M et al., 2003, Engbers H et al., 2009). Por ejemplo, la haploinsuficiencia de *WHSC1* está relacionada con las dismorfias faciales características y la hemigiosidad de *LETM1* con crisis convulsivas. Al estar los dos en *WHSCR2*, en 2003 Zollino M et al. propusieron esta región como la principal en WHS ya que

pacientes con deleciones más pequeñas que no involucraban WHSCR tenían las características clínicas mínimas para hacer el diagnóstico (dismorfias faciales clásicas, crisis convulsivas, déficit intelectual y retraso en el crecimiento) (Figura 19)



containing/Multiple mieloma SET domain containing) codifica para una metiltransferasa de histonas con actividad de co-represor transcripcional. Regula la trimetilación del residuo 36 de lisina en la histona H3 asociada a regiones transcripcionalmente activas. *WHSC2* codifica para la proteína NELFA, un componente del complejo NELF que controla el avance de la RNA polimerasa II durante la elongación teniendo la capacidad de controlar la transcripción de sus genes blanco (Kerzendorfer C, et al., 2012).

Se ha sugerido que la haploinsuficiencia de *LETM1* no es suficiente para producir crisis convulsivas. Zollino et al., 2014, reportaron dos casos de deleciones 4p16.3 inusuales en donde *LETM1* es haploinsuficiente y los pacientes no presentan crisis convulsivas así como 4 otros casos de familiares donde el gen está conservado y los pacientes presentan epilepsia, con lo cual concluyen que probablemente haya otros genes en la región implicados en las crisis convulsivas de los pacientes con SWH (Zollino M, et al., 2014).

LETM1 codifica para una proteína homónima que se localiza en la mitocondria. Su función es de antitransportador de iones de calcio e hidrógeno. Haploinsuficiencia de *LETM1* se ha asociado a hiperpolarización de la membrana mitocondrial con elevación del potencial de membrana y producción elevada de superóxido mitocondrial. Ambas situaciones lo hacen un candidato viable para crisis convulsivas aunque la relación no es absoluta (Hart et al, 2014).

Otro gen en la región de 300 kb del *locus* de *LETM1* es *CPLX1*, que codifica para complexina 1 y es otro gen candidato para el fenotipo de crisis convulsivas del SWH. Las complexinas son proteínas presinápticas que tiene una participación importante en la regulación de neurotransmisores. Se ha propuesto, con base en un modelo de comorbilidad, que la haploinsuficiencia de *CPLX1* podría tener participación en este fenotipo, especialmente en casos de pacientes que presentan crisis convulsivas y conservan *LETM1* (Zollino M, et al., 2014).

Otro gen en la región crítica de 165 kb del SWH es *C4ORF48*, el cual codifica para un neuropéptido que se expresa en la neocorteza y el desarrollo cerebelar (Endele S, et al., 2011).

En cuanto al fenotipo facial se ha propuesto a *MSX1* como gen candidato el cual se encuentra en 4p16.2 fuera de WHSCR1 (Sheth F, et al., 2012). Es un gen que se expresa en el mesénquima y sus mutaciones puntuales afectan estructuras del ectodermo y mesodermo como los dientes y pueden causar hendiduras faciales. Además de en el SWH, el gen *MSX1* se ha visto implicado en el Síndrome de Witkop (OMIM 189500) y en la secuencia Pierre-Robin (OMIM 261800) (Paradowska-Stolarz AM, 2014).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El SWH es una cromosomopatía conocida desde hace más de cuarenta años y ha sido descrita en diferentes poblaciones. Se conocen las características clínicas de los pacientes y las variantes citogenéticas que lo originan, sin embargo no hay estudios realizados en población mexicana que describan el perfil fenotípico, citogenético y molecular de estos pacientes, en este trabajo se realizó el análisis de relación de las características clínicas, citogenética y moleculares en niños mexicanos con el SWH que acudieron al HIMFG en el periodo 2002-2012.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son y cuál es la frecuencia de las características clínicas, citogenéticas y moleculares de los pacientes con diagnóstico clínico de SWH que asistieron a la consulta externa de Genética en el Hospital Infantil de México Federico Gómez entre 2002-2012?.

4. JUSTIFICACIÓN

El HIMFG es un hospital de concentración y referencia de pacientes con malformaciones y déficit intelectual, entre ellos pacientes con fenotipo de SWH. El abordaje intergal de estos pacientes es clínico e incluye el estudio citogenético para confirmar el diagnóstico; sin embargo, hasta en 30 al 40% de los pacientes la anomalía cromosómica no es detectada por técnicas citogenética convencionales como el análisis por técnica de bandas GTG y se requiere de estudio citogenético molecular. El estudiar a este grupo de pacientes nos permitirá conocer las características del SWH en nuestra población e identificar aquellos casos que podrían beneficiarse de estudios adicionales para brindar asesoramiento genético con bases moleculares. El describir la frecuencia y las características clínicas, citogenéticas y moleculares de los pacientes con SWH que acudieron al Departamento de Genética del Hospital Infantil Federico Gómez permitirá aportar conocimiento acerca del perfil de nuestra población con SWH y compararlo con la literatura internacional.

5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Describir las características clínicas, citogenéticas y moleculares de los pacientes con SWH atendidos en el Departamento de Genética del Hospital Infantil de México Federico Gómez de 2002 a 2012.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Describir el tipo y la frecuencia de las características clínicas presentes en los pacientes con diagnóstico clínico de SWH.
2. Identificar los tipos de anomalías cromosómicas en estos pacientes y su frecuencia.
3. Analizar la relación fenotipo-genotipo en estos pacientes.
4. Comparar nuestros resultados con lo reportado en la literatura internacional.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Se revisaron los registros de cariotipos con bandas GTG realizados en el Laboratorio de Citogenética del Departamento de Genética del HIMFG de los años 2002 a 2012.

Criterios de inclusión:

Pacientes cuya indicación para cariotipo fue fenotipo de SWH.

Expediente clínico disponible de los casos revisados.

Aceptar participar con consentimiento informado para realización de estudio.

Criterios de exclusión:

Resultados no claros y/o no legibles del estudio citogenético inicial.

Criterios de eliminación:

Información incompleta de los casos identificados.

En casos en donde exista contraindicación para la toma de muestra.

Muestra no analizable, sin crecimiento o insuficiente para realizar el estudio.

Este estudio comprendió dos fases, la primera fue la revisión estadística de los datos registrados en la libreta de estudios citogenéticos y archivos del Laboratorio de Citogenética para identificar los pacientes con diagnóstico clínico de SWH. La segunda parte incluyó la revisión de expedientes clínicos y recolección de datos. Se citaron y reevaluaron clínicamente aquellos pacientes que fue posible localizar, se recabaron los datos de los análisis clínicos y previo consentimiento informado se tomaron fotografías y muestras de sangre periférica para realizar análisis citogenéticos moleculares en los pacientes en que las técnicas citogenéticas convencionales no confirmaron el diagnóstico. Así mismo se realizó el estudio familiar de estar este indicado.

El estudio citogenético molecular incluyó análisis por FISH con sonda para la región crítica 11 del SWH (WHSCR, Vysis® Abbott Laboratories. Abbott Park, Illinois, USA) en los pacientes con cariotipo normal que se localizaron y aceptaron la realización del estudio. Adicionalmente, en aquellos que resultaron negativos para la delección con sonda WHSCR se hizo FISH con sonda subtelomérica para 4p (Vysis® Abbott Laboratories. Abbott Park, Illinois, USA).

Este es un trabajo en colaboración con el Servicio de Genética del Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga (HGMDEL) y la Facultad de Medicina de la UNAM. Los

estudios de citogenética convencional se hicieron en el Laboratorio de Citogenética del HIMFG, al igual que algunos de los estudios de FISH, en los casos restantes que requirieron análisis por FISH las pruebas se realizaron en el Laboratorio de Citogenética del HGMDL.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para ambas fases se realizó un estudio descriptivo, observacional y retrolectivo. Se utilizaron medidas de tendencia central para el análisis de la población y de los resultados obtenidos.

8. DESCRIPCIÓN DE VARIABLES

Las variables consideradas para este trabajo se describen en la Tabla 3.

Tabla 3. Variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Unidad de medición
Edad	Edad a la que se realizó el diagnóstico	Obtenida de la fecha de nacimiento registrada en el expediente	Cuantitativa continua	Años, meses
Sexo	Hombre/mujer	Obtenida del expediente	Cualitativa nominal dicotómica	Masculino/femenino
Facies	Descripción de la cara de los pacientes realizada por un médico genetista o un residente de genética médica	Obtenida por reevaluación clínica o del expediente	Cualitativa nominal dicotómica	Fenotipo compatible/no compatible con el SWH
Crisis convulsivas	Descargas eléctricas neuronales cerebrales anormales	Obtenida del expediente	Cualitativa nominal dicotómica	Presencia/ausencia
RCIU/RCEU	Restricción del crecimiento intrauterino/extrauterino	Obtenida del expediente	Cualitativa nominal dicotómica	Presencia/ausencia
Déficit intelectual	Limitaciones significativas en el funcionamiento intelectual	Obtenida del expediente	Cualitativa nominal dicotómica	Presencia/ausencia
Malformación congénita	Alteración anatómica que ocurre en etapa prenatal	Obtenida por reevaluación clínica o del expediente	Cualitativa nominal dicotómica	Presencia/ausencia

9. RESULTADOS

9.1 RESULTADOS ESTADÍSTICOS

El periodo analizado en este trabajo es de 10 años, de 2002 a 2012, durante este tiempo se realizaron 5126 estudios de cariotipo con técnica de bandas GTG en el Laboratorio de Citogenética del Departamento de Genética del HIMFG. De estos estudios, 16 de ellos fueron indicados por sospecha clínica de SWH lo que correspondió al 0.31% de los casos. Uno de los pacientes fue eliminado del estudio ya que no se contaba con el expediente clínico. Se incluyeron en total a 15 pacientes con sospecha clínica de SWH: 7 pacientes (pacientes número 1 a 7) tuvieron un diagnóstico confirmatorio por cariotipo con técnica de bandas GTG; en 3 pacientes (pacientes 8 a 10) se confirmó el diagnóstico con análisis por FISH; 3 pacientes (pacientes 11 a 13) tuvieron diagnóstico clínico de SWH pero los estudios por cariotipo con bandas GTG y FISH fueron negativos. A 2 pacientes (pacientes 14 y 15), quienes tenían el fenotipo clínico y contaban con cariotipo normal, no se les pudo realizar análisis por FISH u otros análisis y por lo tanto no se incluyeron en el análisis estadístico de las frecuencias de las variables clínicas pero sí fueron descritos en este trabajo.

En cuanto a los hallazgos citogenéticos, en 7 (53.8%) de los pacientes se demostró una alteración en 4p con bandas GTG correspondiente a deleciones aparentemente terminales y puntos de ruptura de 4p15.1 a 4p16, incluyendo un caso con 46,XY,r(4).

En 6 pacientes (46.1%) se encontró un cariotipo normal y en ellos se realizó análisis por FISH, así como en la paciente con fórmula cromosómica 46,XX,add(4)(p16.3). En 3 de los pacientes mencionados y en la paciente con add(4)(p16.3) se confirmó la deleción en 4p16.3 mientras que los otros tres pacientes fueron negativos para la deleción.

En 9 casos (pacientes 1 a 8 y el paciente 10) se realizó cariotipo con bandas GTG a los padres de los pacientes y estos resultaron normales. Del paciente 9 solo fue posible hacer el cariotipo a la madre y este fue normal.

En relación a los resultados de cariotipo, los pacientes se dividieron en tres grupos de acuerdo a la alteración citogenética:

Grupo 1: pacientes con cariotipo anormal con bandas GTG (pacientes 1-7)

Grupo 2: pacientes con cariotipo normal y FISH positivo para la deleción (pacientes 8-10)

Grupo 3: pacientes con cariotipo normal y FISH negativo (11-13).

En la Tabla 4 se muestran los pacientes incluidos en cada grupo de acuerdo a los resultados citogenéticos.

Tabla 4. Clasificación de pacientes de acuerdo al resultado citogenético.

Paciente	Cariotipo GTG	FISH	Grupo
1	46,XX,del(4)(p?)	NR	1
2	46,XY,del(4)(p15.2)	NR	
3	46,XX,del(4)(p15.1)	NR	
4	46,XY,del(4)(p16)	NR	
5	46,XX,del(4)(p16)	NR	
6	46,XX,add(4)(p14)	POSITIVO	
7	46,XY,r(4)	NR	
8	46,XX	POSITIVO	2
9	46,XX	POSITIVO	
10	46,XX	POSITIVO	
11	46,XY	NEGATIVO	3
12	46,XY	NEGATIVO	
13	46,XX	NEGATIVO	
14	46,XY	NR	
15	46,XX	NR	

NR- no se realizó. Pacientes del grupo 1 se presentan con sombra azul claro, pacientes del grupo 2 señalados con sombra rosa y pacientes del grupo 3 con sombra verde. Los pacientes 14 y 15 no se incluyeron en ningún grupo ya que no se realizaron reevaluación clínica ni estudios citogenéticos moleculares.

Al analizar las variables clínicas en relación al género encontramos que 8, de los 13 pacientes analizados clínicamente, fueron femeninos (61.5%) y 5 masculinos (38.5%) con edades entre 1 y 14 años y dos de los pacientes habían fallecido al momento de realizar este estudio (pacientes 3 y 9). La sospecha diagnóstica principal para la indicación del estudio fue por dismorfias faciales típicas del SWH y retraso en el desarrollo psicomotor (RDPM).

En relación al fenotipo y consideradas en orden descendente por frecuencia, en relación a las variables encontramos los siguiente datos:

- 100% de los pacientes tuvieron las dismorfias típicas faciales del SWH, además de restricción del crecimiento intrauterino o extrauterino (RCIU o RCEU, respectivamente), déficit intelectual o RDPM y crisis convulsivas.
- 81.8% Hipotonía.
- 63.6% Microcefalia.
- 54.5 % Cardiopatía congénita.
- 54.5% Malformación renal/urogenital.
- 54.5% Alteración en la alimentación.
- 54.5% Alteración oftalmológica.
- 45.5% Alteraciones esqueléticas.
- 45.5% Hipoacusia.
- 27% Malformación en SNC.

A continuación se presentan los casos clínicos de cada uno de los pacientes de cada grupo de acuerdo a las alteraciones citogenéticas presentes en cada caso.

9.2 PACIENTES CORRESPONDIENTES AL GRUPO 1

En este grupo se incluyeron 7 pacientes cuyo diagnóstico clínico fue corroborado con cariotipo con bandas GTG.

Paciente 1

Los datos clínicos de esta paciente se obtuvieron del expediente. Femenino referida a los 11 meses de edad por síndrome dismórfico y síndrome de niño hipotónico. Hija única de padres jóvenes, sanos, no consanguíneos. Obtenida vía abdominal a las 39 SDG (semanas de gestación), peso 2050 gr (<p3), talla 45 cm (<p3), Apgar 8/8. Exploración física (E.F.): hipotrófica, hipotónica, microcefalia, frente alta, puente nasal alto y punta hacia abajo, hipertelorismo, pabellones auriculares dismórficos, fenotipo compatible con el SWH. Presentó diabetes mellitus tipo 1, hipotiroidismo congénito, glaucoma congénito, epilepsia parcial sintomática y posible rubeola congénita. Se confirmó coloboma de iris, comunicación interauricular e hipoacusia bilateral. Se realizó gastrostomía por alteración en la mecánica de la deglución. El cariotipo con bandas GTG demostró 46,XX,del(4)(p?), los cariotipos de los padres fueron normales.

Paciente 2

Masculino referido a los 2 años de edad por probable SWH. Hijo único de padres jóvenes, sanos, no consanguíneos. Embarazo normoevolutivo de 40 SDG obtenido por vía abdominal por hemorragia y probablemente desprendimiento prematuro de placenta. Pesó 2200 gr (<p3), midió 44 cm (<p3), Apgar de 8 a los 5 minutos. E.F. a los 2 años: Peso 8,975 gr (<p3), talla 86 cm (<p3), hipotónico, microcefalia (<p5 para talla), cejas arqueadas, hipertelorismo aparente, estrabismo, puente nasal ancho con punta hacia abajo, filtrum corto, comisuras labiales descendientes (Figura 20). Presentó crisis febriles, infecciones de vías superiores recurrentes, hipospadias, criptorquidia bilateral y pie equino varo izquierdo.



Figura 20. Fotografías clínicas del paciente 2 a los 2 años de edad. Nótese la facies característica incluyendo el perfil típico en casco de guerrero griego.

El cariotipo con bandas GTG fue 46,XY,del(4)(p15.2) (Figura 21), el cariotipo de los padres fue reportado como normal.

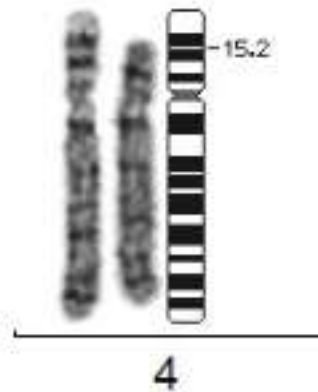


Figura 21. Cariotipo parcial del paciente 2. Se observa delección en 4p15.2 señalado en el idiograma (M en C. Judith Villa Morales, Laboratorio de Citogenética, Depto. de Genética, HIMFG).

Paciente 3

Datos recabados del expediente. Femenino referida a los 5 meses de edad por RDPM y malformaciones múltiples. Hija única de padres jóvenes, sanos, no consanguíneos. Obtenida vía abdominal a las 40 SDG, peso 2200 gr (<p3), talla 45 cm (<p3), Apgar desconocido. E.F.: hipotónica, fenotipo compatible con SWH, puente nasal ancho, hipertelorismo y pabellones auriculares dismórficos. Cursó con insuficiencia pancreática exócrina, microcefalia, epilepsia parcial sintomática, glaucoma, coloboma de iris y nervio óptico, cataratas. Operada por PCA, enfermedad por reflujo gastroesofágico, gastrostomía, hipoacusia moderada izquierda, pie equino varo bilateral. Falleció a los 3 años de edad por sepsis nosocomial y neumotórax. El cariotipo fue 46,XX,del(4)(p15.1) (Figura 22) por lo que se indicó estudio a los padres reportándose cariotipos normales.

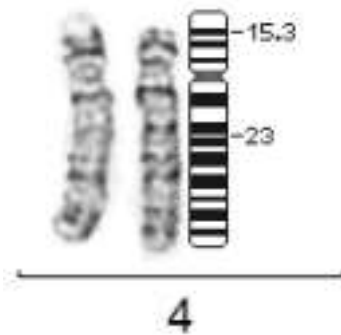
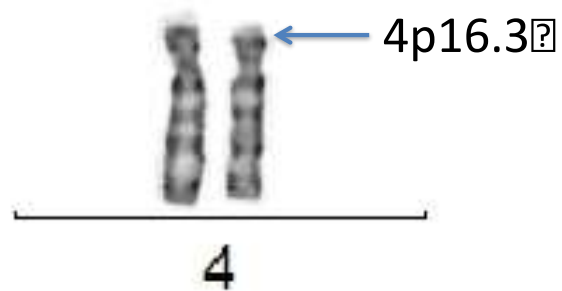


Figura 22. Cariotipo parcial de la paciente 3. Resultado 46,XX,del(4)(p15.1), se observa la deleción en relación con el idiograma (M en C. Judith Villa Morales. Laboratorio de Citogenética, Depto. de Genética, HIMFG).

Paciente 4

Datos recabados del expediente. Masculino conocido a los 15 días de vida por malformaciones múltiples. Hijo único de padres jóvenes, sanos y no consanguíneos. Nació vía vaginal a las 39 SDG, peso 2450 gr (<p3), talla 50 cm (p50), Apgar 8/9. E.F.: hipotónico,



Paciente 5

Datos recabados del expediente. Femenino referida el mes de vida por malformaciones múltiples. Hija única de padres jóvenes, sanos, no consanguíneos. Embarazo normoevolutivo, nació a las 37 SDG, peso 1900 gr (<p3), 46 cm (<p3), Apgar 7/8. E.F.: se hipotónica, frente amplia, hipertelorismo, puente nasal ancho, labio y paladar hendido, pabellones auriculares dismórficos con fenotipo compatible con el SWH. Presentó epilepsia parcial sintomática, hipoacusia profunda bilateral y CIV. El cariotipo con bandas GTG con fue 46,XX,del(4)(p16) (Figura 24), el cariotipo de los padres fue normal.

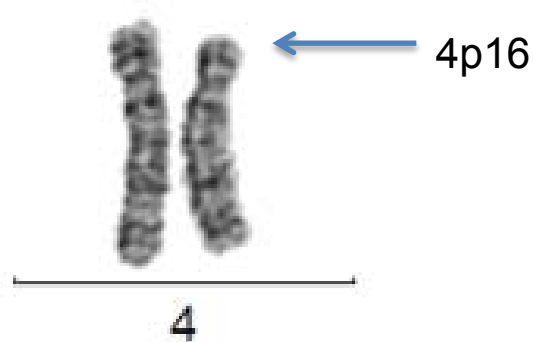


Figura 24. Cariotipo parcial del paciente 5 con resultado 46,XX,del(4)(p16), se señala el cromosoma deletado (Biol. Ariadna Berenice Morales Jiménez. Laboratorio de Citogenética, Depto. de Genética, HIMFG).

Paciente 6

Femenino referida al año de edad con los diagnósticos de pie equino varo y dismorfias faciales. Hija única de padres jóvenes, sanos, no consanguíneos. Embarazo normoevolutivo, nació a las 37 SDG vía abdominal indicada por falta de progreso del trabajo de parto. Peso 1560 gr (<p3), talla 39 cm (<p3), Apgar 8 a los 5 minutos. E.F. a los 7 años: Peso 12 kg (<p3), talla 105 cm (<p3), microcefalia, frente alta, aparente hipertelorismo, epicanto bilateral, puente nasal ancho y alto, comisuras labiales descendentes, pabellones auriculares de baja implantación y antevertidos y con fenotipo compatible con SWH (Figura 25). Presentó epilepsia parcial sintomática, glaucoma, acidosis tubular renal, agenesia renal izquierda y pie equino varo bilateral.

2



car

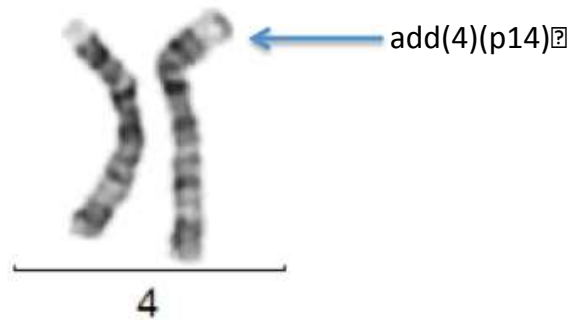


Fig
46,
de

Se realizó análisis por FISH con sonda para WHSCR1 (WHSCR1, Vysis Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, USA) este análisis fue realizado por la M. en C. Laura Gómez Laguna, Depto. de Genética, HGMDEL y la Biol. Karem Nieto Martínez, Facultad de Medicina, UNAM) (Anexo IV), encontrándose la fórmula: ish del(4)(p16.3p16.3)(WHSCR1-),

lo que confirmó la pérdida de material de 4p y el diagnóstico de SWH (Figura 27). Sin embargo, se desconoce el origen del material adicional, el cuál origina una trisomía parcial de origen desconocido.

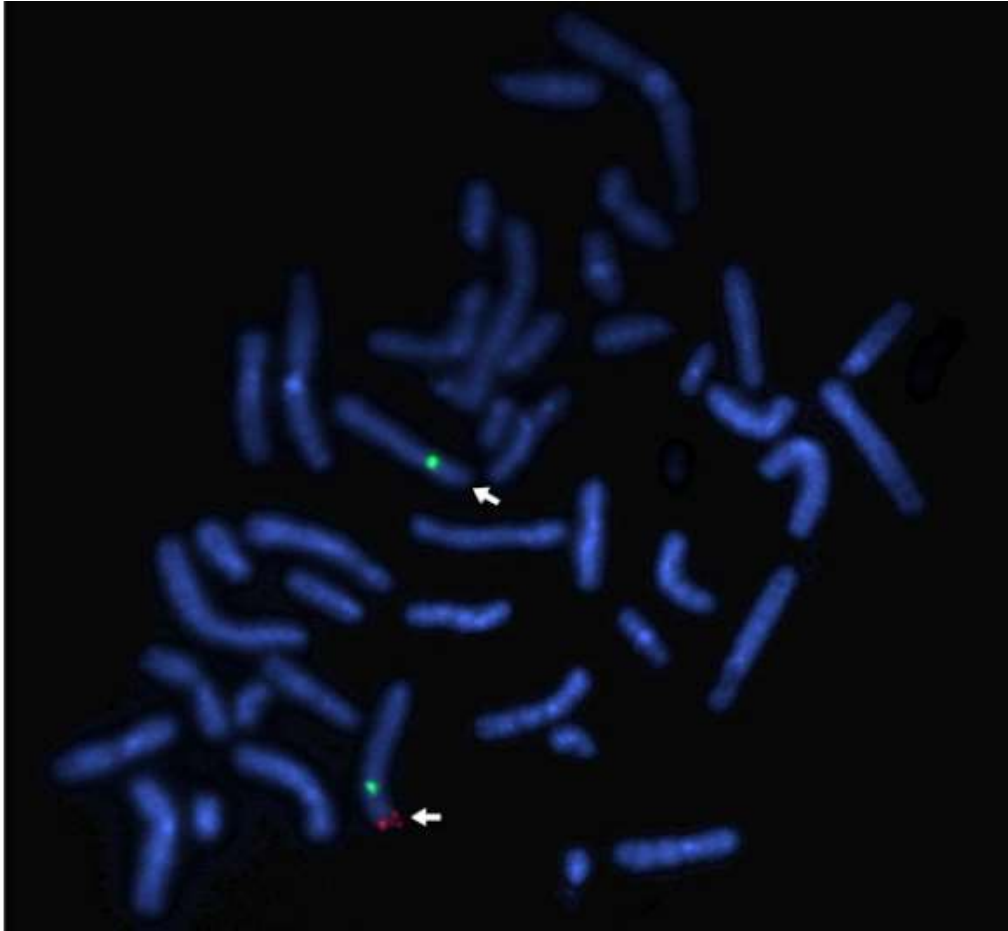


Figura 27. Imagen de una metafase con FISH de la paciente 6, con sonda para WHSCR1 (naranja) y centrómero del cromosoma 4 (verde). Se observa sólo una señal naranja y dos verdes indicando la ausencia de la región 4p16.3 (M. en C. Laura Gómez Laguna, Depto. de Genética, HGMDEL y Biol. Karem Nieto Martínez, Facultad de Medicina, UNAM).

Paciente 7

Masculino referido al año de edad por síndrome dismórfico, RDPM y múltiples malformaciones. Segundo hijo de padres jóvenes, sanos, no consanguíneos (Figura 28). Nació a las 39 SDG, peso 1200 gr (<p3), talla y Apgar desconocidos. E.F a los 11 años de edad: Peso 16 kg (<p3), talla 108 cm (<p3), PC 57 cm, microcefalia, hipertelorismo, estrabismo, puente nasal ancho, pabellones auriculares dismórficos y polidactilia preaxial derecha, fenotipo compatible con SWH (Figura 29). Presentó epilepsia parcial sintomática, hipotiroidismo, CIA, ε ia bilateral.

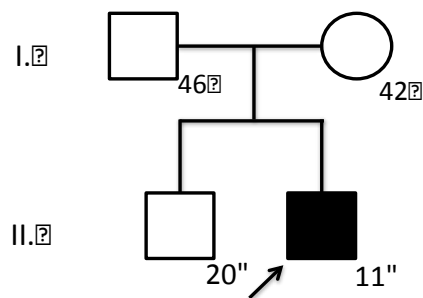


Figura 28. Árbol genealógico del paciente 7 de dos generaciones.



Figura 29. Fotografía clínica frontal del paciente 7 a los 11 años de edad. Se observa fenotipo característico y pabellón auricular derecho acopado.

El cariotipo del paciente fue 46,XY,r(4), el cariotipo de los padres fue normal.

Los datos clínicos del primer grupo de pacientes se resumen a continuación en la Tabla 5.

Tabla 5. Pacientes pertenecientes al Grupo 1.

Características clínicas	Pacientes							Total (%)
	1	2	3	4	5	6	7	
Cariotipo	46,XX,del(4)(p?)	46,XY,del(4)(p15)	46,XX,del(4)(p15.1)	46,XY,del(4)(p16)	46,XX,del(4)(p16)	46,XX,add(4)(p14)	46,XY,r(4)	
FISH WHSCR1	NR	NR	NR	NR	NR	+	NR	
Sexo	F	M	F	M	F	F	M	
Edad al diagnóstico	11m	2a	3a 10m	1m	1m	7a 5m	1a	
Fallecimiento			+					14.3
Dismorfias faciales típicas	+	+	+	+	+	+	+	100.0
RDPM/Déficit intelectual	+	+	+	+	+	+	+	100.0
Crisis convulsivas	+	+	+	+	+	+	+	100.0
RCIU/RCEU	+	+	+	+	+	+	+	100.0
Microcefalia	+	+		+		+	+	71.4
Hipotonía	+	+	+	+	+	+	+	100.0
Alteraciones en alimentación	+		+		+			42.9
Cardiopatía	+		+		+		+	57.1
Hendidura facial				+	+			28.5
Alteraciones oftalmológicas	+	+	+			+		57.1
Alteraciones urogenitales		+		+		+	+	57.1
Alteraciones esqueléticas		+	+	+		+	+	71.4
Hipoacusia	+		+	+	+			57.1
Total de datos positivos	10	9	11	10	9	9	9	

NR- no se realizó

F- femenino

M- masculino

RDPM- retraso en el desarrollo psicomotor

RCIU/RCEU- restricción del crecimiento intrauterino/extrauterino

9.3 PACIENTES CORRESPONDIENTES AL GRUPO 2

A continuación se presentan los pacientes que tuvieron cariotipo con bandas GTG normal y estudio por FISH positivo para delección de la región 4p16.3.

Paciente 8

Femenino conocida al año de edad por síndrome dismórfico y múltiples malformaciones. Es la tercera hija de padres jóvenes, sanos, no consanguíneos, 2 hermanos sanos (Figura 30). Nació por vía vaginal a las 40 SDG con peso de 1900 gr (<p3), talla 44 cm (<p3), se desconoce Apgar y se refiere que se hospitalizó durante tres días por peso bajo e hipotonía. E.F. a los 4 años 1 mes: microcefalia, frente alta, cejas arqueadas, hipertelorismo, puente nasal ancho, punta nasal hacia abajo, filtrum corto y pabellones auriculares dismórficos, fenotipo a los 2 años, c años y riñón e

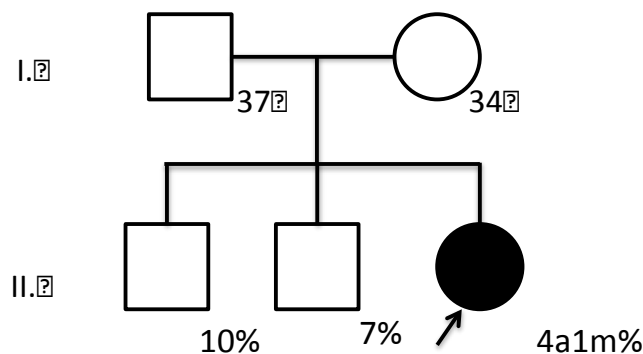


Figura 3

El cariotipo con bandas GTG fue 46,XX. Se indicó estudio FISH con sonda para WHSCR1 a los 4 años 1 mes con el resultado: ish del(4)(p16.3p16.3)(WHSCR1-) (Figura 31) el cual confirma el diagnóstico de SWH. El cariotipo de los padres fue normal.

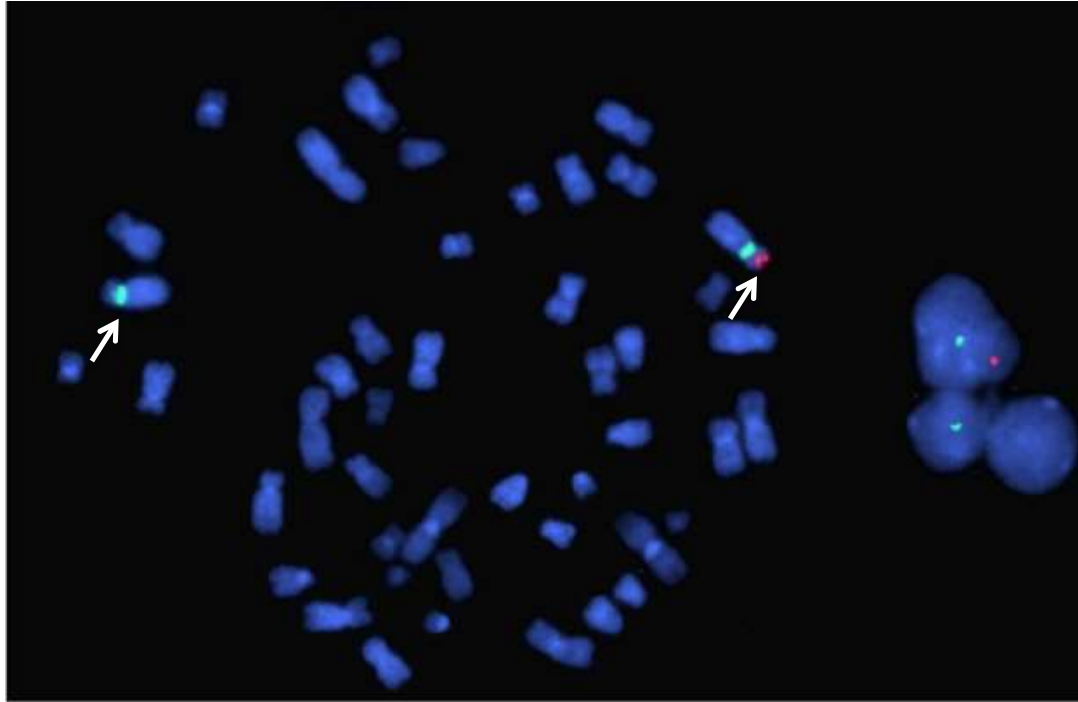


Figura 31. Imagen de una metafase con FISH de la paciente 8, con sonda para WHSCR1 (naranja) y centrómero del cromosoma 4 (verde). Se observa sólo una señal naranja y dos verdes indicando la ausencia de la región 4p16.3 (M. en C. Laura Gómez Laguna, Servicio de Genética, HGMDEL y Biol. Karem Nieto Martínez, Facultad de Medicina, UNAM).

Paciente 9

Los datos clínicos de esta paciente se obtuvieron del expediente. Femenino referida al año de edad por RDPM y síndrome dismórfico. Hija única de padres jóvenes, sanos, no consanguíneos. Nació vía abdominal a las 37 SDG por oligohidramnios, peso 1800 gr (<p3), 43 cm (<p3), Apgar 8/9. E.F.: hipotonía, microcefalia, hipertelorismo, puente nasal ancho con punta descendente, filtrum corto, comisuras labiales descendentes y pabellones auriculares dismórficos. Presentó epilepsia parcial sintomática, displasia renal multiquística, se realizó gastrostomía. Falleció a los 3 años por choque séptico, falla orgánica múltiple, enfermedad renal grado IV con hiperuricemia e hiperfosfatemia.

El cariotipo con bandas GTG al año de edad tuvo un resultado 46,XX. Por la sospecha del SWH se indicó estudio citogenético con FISH con sonda para WHSCR1 a los 3 años el cual se reportó positivo con el siguiente resultado: ish del(4)(p16.3p16.3)(WHSCR1-) (Figura 32). El cariotipo de la madre se reportó normal, el del padre no se realizó por estar fuera del núcleo familiar.

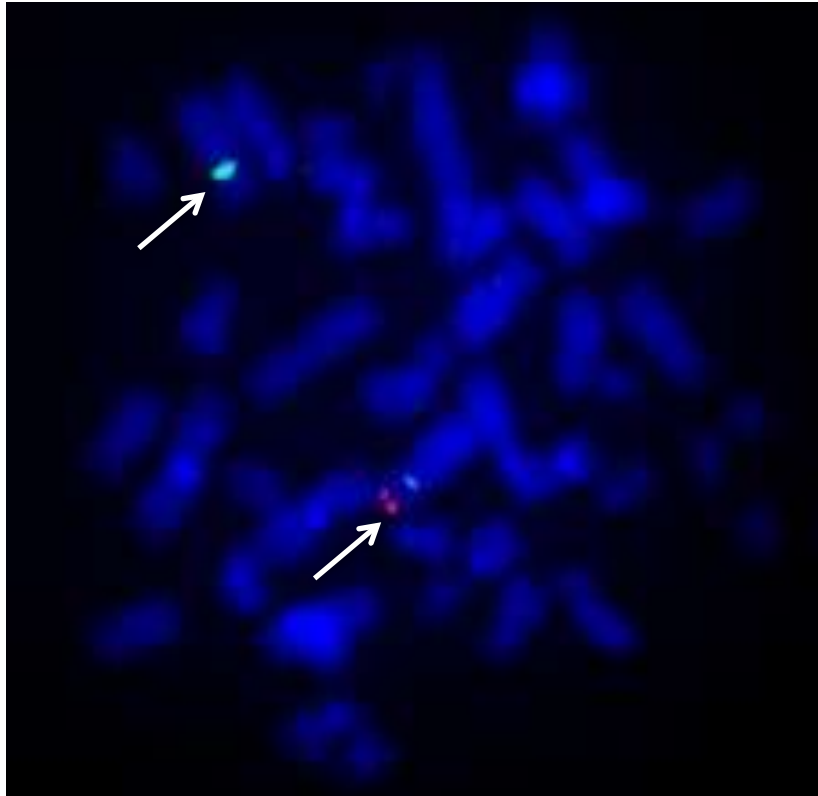


Figura 32. Imagen de una metafase con FISH de la paciente 9, con sonda para WHSCR1 (naranja) y centrómero del cromosoma 4 (verde). Se observa sólo una señal naranja y dos verdes indicando la ausencia de la region 4p16.3 (Biol. Ariadna Berenice Morales Jiménez. Laboratorio de Citogenética, Depto. de Genética, HIMFG).

Paciente 10

Femenino conocida a los 9 meses de edad por RDPM y síndrome dismórfico. Hija única de padres jóvenes, sanos y no consanguíneos. Nació a las 37 SDG vía abdominal por falta de progresión del trabajo de parto, peso 1810 gr (<p3), talla 45 cm (<p3), Apgar 8/9. E.F. a los 2 años de edad: se observó hipotónica, microcefalia, frente alta, cejas arqueadas, hipertelorismo, estrabismo, puente nasal ancho con punta hacia abajo, filtrum corto, comisuras labiales descendentes y pabellones auriculares dismórficos (Figura 33), fenotipo compatible con el SWH. Presentó agenesia de cuerpo caloso, epilepsia parcial sintomática, comunicación interauricular, estenosis pulmonar leve e hipotiroidismo.



Figura 33. Fotografías clínicas de la paciente 10 a los 2 años de edad. Se observan cejas arqueadas, hipertelorismo, exotropía derecha, el puente nasal ancho y alto, filtrum corto, los pabellones auriculares grandes y ligeramente en retroposición.

El cariotipo con bandas GTG fue 46,XX. El estudio de FISH con sonda WHSCR1 fue positivo para la delección: ish del(4)(p16.3p16.3)(WHSCR1-) (Figura 34). El cariotipo de los padres fue normal.

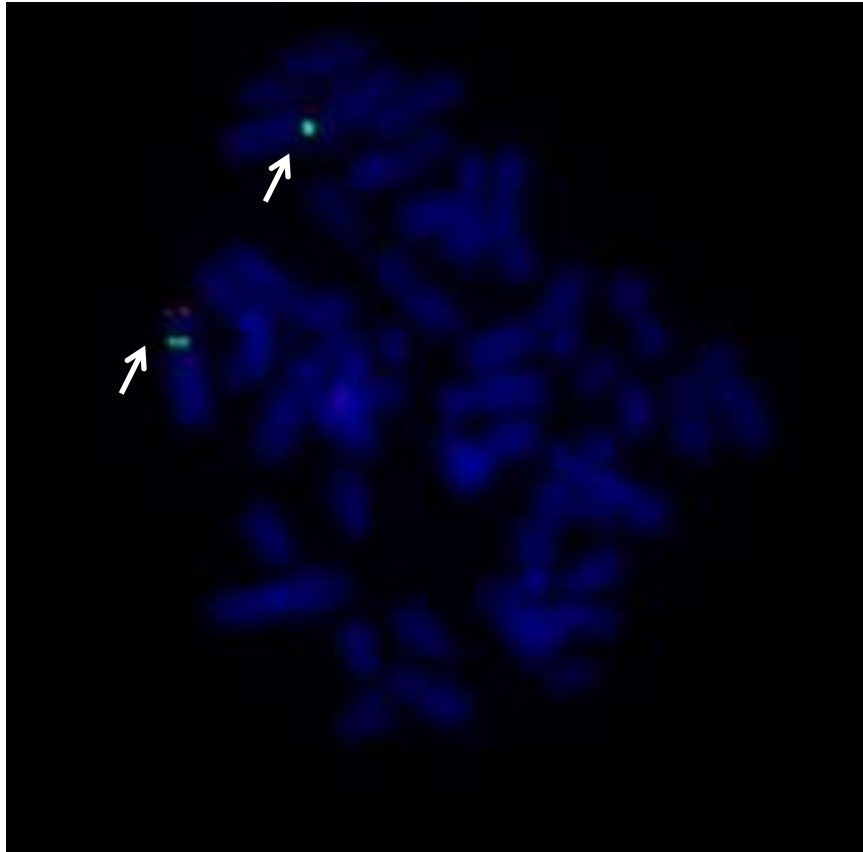


Figura 34. Imagen de una metafase con FISH de la paciente 10, con sonda para WHSCR1 (naranja) y centrómero del cromosoma 4 (verde). Se observa sólo una señal naranja y dos verdes indicando la ausencia de la region 4p16.3 (Biol. Ariadna Berenice Morales Jiménez. Laboratorio de Citogenética, Depto. de Genética, HIMFG).

Los datos clínicos del segundo grupo de pacientes se resumen a continuación en la Tabla 6.

Tabla 6. Pacientes pertenecientes al grupo 2.

Características clínicas	Pacientes			Total (%)
	8	9	10	
Cariotipo	46,XX	46,XX	46,XX	
FISH WHSCR1	+	+	+	
FISH SUBTELOMÉRICA 4	NR	NR	NR	
Sexo	F	F	F	
Edad al diagnóstico	4a 1m	3a 1m	1a	
Fallecimiento		+		33.3
Dismorfias faciales típicas	+	+	+	100.0
RDPM/Déficit intelectual	+	+	+	100.0
Crisis convulsivas	+	+	+	100.0
RCIU/RCEU	+	+	+	100.0
Microcefalia	+	+	+	100.0
Hipotonía	+	+	+	100.0
Alteraciones en alimentación	+	+	+	100.0
Cardiopatía	+		+	66.7
Hendidura facial				0.0
Alteraciones oftalmológicas			+	33.3
Alteraciones renales	+	+		66.7
Alteraciones esqueléticas				0.0
Hipoacusia				0.0
Total de datos positivos	9	9	9	

NR- no se realizó F- femenino M- masculino RDPM- retraso en el desarrollo
psicomotor RCIU/RCEU- restricción del crecimiento intrauterino/extrauterino

9.4 PACIENTES CORRESPONDIENTES AL GRUPO 3

En este grupo se incluyeron a pacientes con cariotipo normal y FISH negativo para delección de WHSCR1 y sonda subtelomérica del cromosoma 4p. Los pacientes 14 y 15 se incluyeron en la tabla de este último grupo sin embargo no se tomaron en cuenta para las frecuencias de datos encontrados ya que no fue posible realizarles FISH ya que dejaron de acudir a la institución.

Paciente 11

Masculino conocido a los 3 años 6 meses de edad por síndrome dismórfico, RDPM y talla baja. Hijo único de padres jóvenes, sanos, no consanguíneos. Nació a las 36 SDG vía abdominal por presentación pélvica, peso 2200 gr (p5), talla 46 cm (p25), se desconoce Apgar pero no lloró ni respiró al nacer, requirió apoyo con oxígeno con casco cefálico durante dos días. E.F. a los 8 años: peso 15.7 kg (<p5) y talla 111 cm (<p5), cejas arqueadas, hipertelorismo aparente, epicanto derecho, estrabismo, puente y base nasal ancha, punta descendente, filtrum corto y comisuras labiales descendentes (Figura 35). Presentó crisis febriles desde los 7 meses, hipoplasia de cuerpo calloso, criptorquidia izquierda y pie equino varo bilateral.



Figura 35. Fotografías clínicas del paciente 11 a los 8 años. Se observa las cejas arqueadas, epicanto derecho, aparente hipertelorismo, exotropía izquierda, el puente nasal ancho y alto y filtrum corto.

Se le realizó cariotipo con bandas GTG en sangre periférica con resultado 46,XY. A los 7 años por la sospecha clínica del SWH se indicó estudio FISH con sonda para WHSCR1 el cual fue negativo para la deleción y se prosiguió a hacer FISH con sonda subtelomérica para 4p con resultado también negativo: ish 4p16.3(GS10K2/T7x2) (Figura 36).

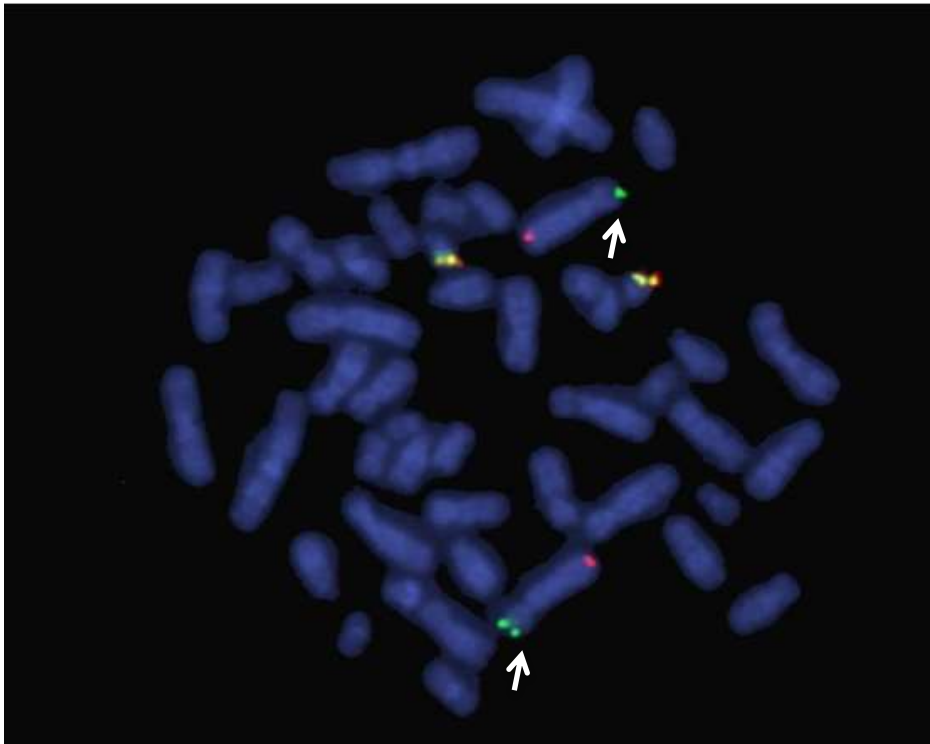


Figura 36. Metafase con FISH con sondas subteloméricas para cromosoma 4p en verde y 4q naranja y controles para 21q (verde/naranja) (M. en C. Laura Gómez Laguna, Servicio de Genética, HGM y Biol. Karem Nieto Martínez, Servicio de Genética, HGMDEL).

Paciente 12

Masculino conocido a los 2 años de edad por RDPM e hipotonía. Padres sanos, jóvenes y no consanguíneos. Medio hermano paterno de 20 años con discapacidad intelectual y una hermana de 12 años aparentemente sana (Figura 37). Nació las 39 SDG vía vaginal, peso 1900 gr (<p3), talla se desconoce, Apgar 6/8. E.F.: microcefalia, puente nasal ancho y alto, punta nasal descendente e hipertelorismo aparente. El paciente también presentó epilepsia generalizada sintomática, retraso en el desarrollo psicomotor, criptorquidia izquierda. Se le realizó cariotipo con bandas GTG en sangre periférica con resultado 46.XY. Por el fenotipo compatible con síndrome de Down.

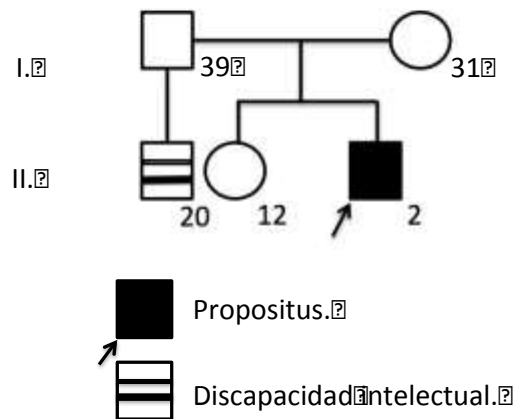


Figura 37
flecha

Paciente 13

Femenino referida a los 3 meses por pie equino varo y cardiopatía congénita. Es hija única de padres jóvenes, sanos, no consanguíneos. Nació vía abdominal por posición pélvica a las 39 SDG, peso 2500 gr (p3), talla y Apgar se desconocen. La paciente presentó microcefalia, dismorfias no específicas, crisis convulsivas y CIA por lo que se realizó cariotipo con bandas GTG en sangre periférica obteniéndose resultado normal 46,XX. La paciente perdió seguimiento y fue referida nuevamente a los 13 años. E.F. a los 13 años: Microcefalia, nariz en yelmo de guerrero griego, frente alta, hipertelorismo, cejas arqueadas, filtrum corto, comisuras labiales descendentes y pabellones auriculares dismórficos. Presentó síndrome de Down.

de Lenox-Gastaut, ventriculomegalia, hipoacusia bilateral, dacriostenosis, coloboma de iris y pie equino varo bilateral.

En esta ocasión se sospechó el SWH por el fenotipo facial, discapacidad intelectual y malformaciones concomitantes. Se realizó estudio FISH con sonda para WHSCR1 con resultado reportado como ish 4p16.3(WHSCR1x2) y subtelomérica para 4p con resultado ish 4p16.3(GS10K2/T7x2), siendo ambos negativos para diagnóstico de SWH.

Paciente 14

Los datos clínicos de este paciente se obtuvieron del expediente. Paciente masculino conocido a los 7 meses. Hijo de padres jóvenes, sanos, no consanguíneos. Nació vía abdominal a las 37 SDG, peso 2300 gr (p5), talla 47 cm (p25), Apgar 4/7. E.F.: dismorfias faciales que recordaban al SWH. Microcefalia, labio y paladar hendido derecho, coloboma de iris izquierdo, hipoacusia severa bilateral, reflujo gastroesofágico grado III y comunicación interventricular. El resultado del cariotipo fue 46,XY, no continuó con su seguimiento.

Paciente 15

Los datos clínicos de esta paciente se obtuvieron del expediente. Paciente femenino conocida al año de edad. Hija de padres jóvenes, sanos, no consanguíneos. Peso al nacimiento de 2100 gr, talla 46 cm, Apgar 8/9, se desconocen semanas de gestación. E.F.: se refirió con fenotipo compatible con el SWH. Además presentó crisis convulsivas, paladar hendido, hipoacusia derecha, displasia congénita de cadera, estenosis valvular pulmonar. El estudio de cariotipo fue 46,XX, no continuó con su seguimiento.

Los datos clínicos de los pacientes del grupo 3 se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7. Pacientes pertenecientes al Grupo 3 y pacientes 14 y 15. Se muestran los datos clínicos de 5 pacientes con cariotipo normal en donde los pacientes 11, 12 y 13 no tuvieron deleción para la región crítica del SWH por FISH. A los pacientes 14 y 15 no fue posible realizarles el estudio FISH.

Características clínicas	Pacientes con FISH				Pacientes sin FISH	
	11	12	13	Total (%)	14	15
Cariotipo	46,XY	46,XY	46,XX		46,XY	46,XX
FISH WHSCR 1	-	-	-		NR	NR
FISH SUBTELOMÉRICA 4	-	-	-		NR	NR
Sexo	M	M	F		M	F
Edad	7a	2a 7m	14a		7m	1a 4m
Fallecimiento						
Dismorfias faciales típicas	+	+	+	100.0	+	+
Déficit intelectual	+	+	+	100.0	+	+
Crisis convulsivas	+	+	+	100.0		+
RCIU/RCEU	+	+	+	100.0	+	+
Microcefalia			+	33.3	+	+
Hipotonía		+		33.3	+	+
Alteraciones en alimentación				0.0	+	
Cardiopatía			+	33.3	+	+
Hendidura facial				0.0	+	+
Alteraciones oftalmológicas	+		+	66.7	+	
Alteraciones renales/urogenitales	+			33.3		
Alteraciones esqueléticas	+		+	66.7		+
Hipoacusia			+	33.3	+	+
Total de datos positivos	6	5	9		10	10

NR- no se realizó F- femenino M- masculino RDPM- retraso en el desarrollo psicomotor RCIU/RCEU- restricción del crecimiento intrauterino/extrauterino

10. DISCUSIÓN

Del total de pacientes a quienes se les indicó estudio citogenético del año 2002 al 2012 1:320 (0.31%) correspondieron a pacientes con sospecha clínica del SWH. En esta tesis se analizaron 15 pacientes con diagnóstico clínico de SWH. Se discutirán en conjunto y posteriormente se discutirán por grupos de acuerdo a la alteración citogenética y molecular encontrada. Los pacientes 14 y 15, en quienes a pesar de presentar el fenotipo clásico de SWH, no se pudo confirmar el diagnóstico por métodos citogenéticos o moleculares, se discutirán posteriormente.

En el 53.8% de los 13 pacientes incluidos en este estudio se confirmó la delección con bandas GTG, lo que concuerda con la literatura en la que se reporta que el 50-60% de los casos se confirman con esta metodología (Battaglia A, et al., 2011). Se ha reportado que 40-45% de los casos de SWH corresponden a monosomías 4p asociadas con una trisomía parcial que enmascara el tamaño del segmento perdido debido a una translocación no balanceada (South ST, et al., 2008). En este estudio sólo se encontró en el caso 6 add(4)(p16.3) por lo que se podría tratar de una translocación no balanceada *de novo*, sin embargo, este dato requiere de estudios moleculares para determinar el origen del material adicional. Es por estas circunstancias que en los casos de SWH se sugiere el considerar el descartar otras alteraciones cromosómicas asociadas empleando técnicas moleculares y/o genómicas de acuerdo a las características del caso. Inclusive en casos detectados por cariotipo con bandas GTG o FISH se debe ampliar el estudio de los pacientes con aCGH ya que se han reportado translocaciones crípticas sólo son detectadas de esta forma (South ST, et al., 2008).

El estudio del SWH se ha centrado en los últimos años en buscar una relación genotipo-fenotipo entre la haploinsuficiencia de genes en la región 4p16.3 y sus características clínicas, entre ellas el grado de afectación cognitiva ya que estas son sumamente variables (Zollino M, et al, 2004). Para realizar esta correlación las revisiones más extensas como las de South ST, et al. (2008) y Shimizu K, et al. (2014) se basan en el estudio de aCGH, ya que los tamaños de las delecciones se pueden precisar con ésta técnica y se pueden detectar además aneusomías parciales de otros cromosomas por translocaciones crípticas no balanceadas. De esta manera, pacientes con delecciones atípicas en la región 4p16.3 han ayudado extensamente a dilucidar los genes responsables de las características clínicas del SWH y a descartar a otros (Andersen E, et al., 2014). También esta es una de las razones para que en este trabajo se clasificara a los pacientes en los tres grupos presentados dependiendo del resultado de los estudios citogenéticos haciendo una correlación con las

categorías clínicas de Zollino M, et al. (2008). En el grupo 1 están los pacientes con deleciones grandes, >5 Mb y la categoría clínica clásica. En el grupo 2 los pacientes con deleciones pequeñas <5 Mb y la categoría clínica leve y en el grupo 3 los pacientes en quienes no se confirmó el diagnóstico por citogenética convencional ni análisis de FISH.

Específicamente en relación al grupo 1, a este grupo pertenecen el 53.8% (7/13) de los pacientes del estudio. Más del 50% de ellos tuvieron microcefalia (5/7), cardiopatía congénita (4/7), malformaciones urogenitales (4/7) y esqueléticas (5/7) e hipoacusia (4/7). Es el único grupo en el que hubo pacientes con hendiduras faciales (pacientes 4 y 5). El labio y/o paladar hendido se ha reportado en pacientes con deleciones de 3 a 35 Mb y si bien es una característica clásica del fenotipo y de hecho presente en el paciente descrito por Wolf, se puede considerar que esta malformación no está asociada al tamaño de material genético perdido (Maas NMC, et al., 2008), además de que puede considerarse dentro de la variabilidad fenotípica del síndrome.

En relación al fenotipo, la paciente 3 fue la más afectada de los pacientes descritos, al presentar la mayor cantidad de datos positivos del SWH como se indica en la Tabla 3, la deleción en este caso se extendió más allá de la región 4p16.3, con punto de ruptura en 4p15.1. Correlacionando el cuadro clínico de la paciente con el punto de ruptura en el cariotipo, se trata de una deleción grande de aproximadamente 28 Mb (Maas NMC, et al., 2008).

En este grupo se considera que el tamaño mínimo de la deleción fue de al menos 5 Mb ya que fue detectada por cariotipo con bandas GTG por lo tanto corresponderían a los grupos de fenotipo moderado (que incluye a pacientes con deleciones de 5 a 18Mb) o grave (deleciones >22-25Mb) descritos por Zollino M, et al. (2008), si bien en nuestros casos no fue posible evaluar el tamaño exacto de la deleción por otros métodos como podría haber sido aCGH, lo que nos daría el tamaño específico de la alteración. Como ejemplo, en el caso de la paciente 3 se puede tener un aproximado del tamaño de la deleción por cariotipo con bandas GTG, sin embargo no se puede descartar que aunque en algunos casos parezca una deleción pequeña, puede haber material extra de otro cromosoma. Por esta razón no se puede descartar la presencia de una translocación no balanceada la cual puede estar presente en hasta el 45% de los pacientes con SWH y de las cuales cerca de la mitad son crípticas o no detectables por cariotipo GTG ni FISH. Dicha situación modificaría el asesoramiento genético ya que 15% de las translocaciones pueden ser heredadas de un padre portador balanceado (South ST, et al., 2008).

Los pacientes 6 y 7 tienen alteraciones cromosómicas adicionales a la pérdida de 4p16.3 y esta situación modifica el fenotipo. La paciente 6 tiene material adicional en el cromosoma 4 y hemicigosidad para WHSCR1. Con el fin de definir clínicamente a qué correspondía el material adicional en el cromosoma 4 de la paciente se revisó nuevamente su fenotipo, sin embargo todas las características clínicas que presenta se pueden atribuir a la delección 4p16.3. Al tener un cuadro clínico compatible con la categoría clásica del SWH y no tener excepciones al fenotipo posiblemente el material adicional no esté alterando la expresión del SWH. Se considera que en estos pacientes se requieren estudios complementarios como CGH sobre microarreglos para determinar a qué región cromosómica corresponde el material adicional y correlacionarlo con los datos clínicos que presenta la paciente para determinar con certeza si este material adicional está modificando su fenotipo.

El paciente 7 se reportó con cariotipo 46,XY,r(4): sin embargo, no contamos con los puntos de ruptura por lo tanto no podemos saber el tamaño del material perdido. Existen por lo menos 21 casos reportados en la literatura de cromosoma 4 en anillo (Chen CP, et al., 2007; South ST, et al., 2007; Yao Q, et al., 2014). El fenotipo que presentan los pacientes descritos, depende del punto de ruptura en 4p, la inclusión de WHSCR ocasiona el fenotipo característico del SWH y en la mayoría de los casos se asocian a RCIU y RCEU, microcefalia, y labio y paladar hendido (Balci S, et al., 2005).

Nuestro paciente tuvo todos los datos anteriores con excepción del labio y paladar hendido. Las deleciones en 4q31, 4q32 y 4q33-4qter se denominan síndrome de delección 4q y se asocian a anillos del 4 con un fenotipo caracterizado por déficit intelectual variable, restricción del crecimiento, paladar hendido, alteraciones en extremidades, malformaciones cardíacas y genitourinarias (Kocks A, et al., 2002). A este respecto, con excepción de las hendiduras faciales, el paciente 7 presentó las alteraciones previamente reportadas en casos de anillos del cromosoma 4, aunque éstas se superponen con lo reportado para el SWH. Es importante recordar que existe un síndrome del anillo autosómico en el cual los pacientes presentan alteraciones independientes del cromosoma implicado e incluyen RCIU/RCEU grave, déficit intelectual moderado y malformaciones menores (Sarri C, et al., 2015). Al no tener un estudio molecular es difícil determinar la extensión de las regiones afectadas del cromosoma 4, adicionalmente los anillos de autosomas producen mosaicismo dinámico por inestabilidad con células aneuploides secundarias, el cual podría contribuir con algunos datos del paciente principalmente en las alteraciones de crecimiento y desarrollo (Sodré CP, et al., 2010). El paciente 7 tuvo restricción muy importante del peso al nacimiento y durante la vida extrauterina de peso y talla. Con esto concluimos que el

paciente 7 presentó alteraciones propias del síndrome del anillo autosómico y de la pérdida de material genético en el cromosoma 4, incluida la región crítica para el SWH.

En relación al grupo 2 (pacientes con cariotipo normal y FISH positivo) en el que se incluyeron 3 pacientes, llama la atención que el 100% de ellos tuvo microcefalia, hipotonía y alteraciones en la alimentación mientras que ninguno tuvo alteraciones esqueléticas, hipoacusia ni hendiduras faciales. En series grandes de pacientes en quienes estudiaron la relación genotipo-fenotipo se reportó que las malformaciones mayores como cardiopatía congénita y malformaciones renales se presentan en 2% de los casos con deleciones de ≤ 3.5 Mb (Zollino M, et al., 2008) lo que contrasta con el 66.7% encontrado en este grupo de nuestros pacientes. Es importante tomar en cuenta que en este grupo sólo hubo 3 pacientes y también considerar la posibilidad de translocaciones crípticas no balanceadas, por lo que el tamaño de la deleción podría ser mayor y estar enmascarado por la presencia de material trisómico de otro cromosoma, que también modificaría el fenotipo, el cual se esperaba que fuera leve para estos pacientes (South ST, et al., 2008).

En relación al grupo 3 de pacientes, estos 3 pacientes tuvieron cariotipo normal y se realizó FISH para WHSCR1 y con sonda subtelomérica para 4p, sin embargo todos resultaron negativos por lo que no se pudo corroborar por métodos citogenéticos el diagnóstico clínico. Sin embargo, las características clínicas son compatibles con el SWH y se podría suponer que las deleciones que presentan estos pacientes probablemente son muy pequeñas y no detectables por la metodología empleada. En este grupo se consideró al paciente 12 el cual fue el menos afectado ya que no tenía ninguna malformación mayor y sólo presentaba las características cardinales de dismorfias faciales, RDPM, RCIU y crisis convulsivas además de hipotonía; su caso podría corresponder a una deleción muy pequeña la cual involucre sólo WHSCR2. Por otro lado, la paciente 13 sí tuvo malformaciones mayores y una cantidad de datos clínicos positivos (9) comparable con los pacientes del grupo 2 incluyendo hipoacusia la cual se relaciona con deleciones mayores a 6 Mb (South ST, et al., 2008); una posible explicación sería una translocación críptica no balanceada la cual enmascare la deleción y esté modificando un fenotipo que se esperaría fuera más leve por los resultados normales de los estudios citogenético convencional y con FISH.

En algunos casos de deleciones muy pequeñas las dismorfias pueden ser muy leves y no ser la indicación principal de abordaje de estudio genético por SWH, esta indicación generalmente se asocia a la presencia de las alteraciones neurológicas. Un ejemplo de lo anterior es el caso reportado por Hannes F, et al., (2012), este paciente sólo presentó hipertelorismo y proptosis de las características típicas del SWH y tuvo una deleción de 600

kb proximal a WHSCR. Se puede considerar entonces que los pacientes del grupo 3 en quienes no se pudo confirmar el diagnóstico de SWH por las técnicas citogenética disponibles en este estudio (incluyendo a los pacientes 14 y 15) posiblemente tengan deleciones muy pequeñas o translocaciones crípticas no balanceadas las cuales se pueden detectar con microarreglos de alta densidad.

Lo anterior también demuestra la relevancia de la evaluación clínica cuidadosa para el diagnóstico, ya que en estos casos el fenotipo fue considerado como característico. En la literatura se menciona que el fenotipo del SWH difícilmente se confunde pero se podrían considerar algunos diagnósticos diferenciales como el síndrome de Williams-Beuren (MIM #194050), el síndrome de Smith-Lemli-Opitz (MIM # 270400) y el síndrome de Angelman (MIM #105830) (Battaglia A, et al., 2002); sin embargo, este no parece ser el caso en nuestros pacientes ya que de acuerdo a la evidencia clínica todos corresponderían a SWH.

Tomando como grupo los 13 pacientes en quienes se confirmó el diagnóstico de SWH por cariotipo y/o por FISH en este trabajo se identificaron 8 individuos femeninos y 5 masculinos, lo que da una relación 1.6:1. La relación mujer:varón en el SWH reportada en la literatura es de 2:1 (Battaglia A, et al., 2008) lo cual es similar a lo encontrado en nuestra serie.

En todos los casos, incluidos aquellos en que el cariotipo convencional fue normal, la sospecha diagnóstica de SWH se estableció por el fenotipo de los pacientes, al presentar todos ellos los datos faciales característicos así como por las malformaciones congénitas concomitantes y alteraciones neurológicas. Esta sospecha diagnóstica fue la indicación de estudio citogenético en todos los casos.

En este sentido es interesante considerar que la referencia al Departamento de Genética para valoración fue en su mayoría indicada porque el paciente presentaba un síndrome dismórfico y malformaciones congénitas. Sólo en un caso, el del paciente 2, la referencia inicial fue por sospecha del SWH, esta situación es relevante por una parte debido a que si bien el SWH es considerado entre los síndromes por cromosopatía estructural mejor conocidos, es cierto también que su frecuencia es de 1/50,000 (Battaglia A, et al., 2002) lo que lo hace poco frecuente. Lo anterior refleja que en la mayoría de los casos si bien no se identificó inicialmente el diagnóstico preciso a pesar del fenotipo característico, sí hay una detección clínica del médico de primer contacto de las alteraciones fenotípicas por lo que se hizo una adecuada referencia para evaluación por un médico genetista, quien con base en los datos clínico estableció la sospecha diagnóstica de SWH e indicó el estudio citogenético.

En cuanto a los hallazgos clínicos generales el 100% de los pacientes incluidos en esta tesis tuvo características faciales compatibles con el SWH, incluyendo RDPM o discapacidad intelectual, crisis convulsivas y RCIU o RCEU. Estos cuatro puntos se consideran la piedra angular en el diagnóstico del SWH (Zollino M, et al., 2008). Estos datos de los pacientes del HIMFG se muestran en la Tabla 7.

Las características fenotípicas faciales principales del SWH son la nariz en casco de guerrero griego (puente nasal ancho que continua hacia la frente), frente alta, hipertelorismo, epicanto, filtrum corto, labios descendentes y pabellones auriculares dismórficos (Battaglia A, et al., 2002).

Tabla 7. Características clínicas de los pacientes comparadas con la literatura.

Grupo citogenético	Pacientes													Total	Shimizu, et al. 2014	Maas, et al. 2008	South, et al. 2008
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13				
	Grupo 1						Grupo 2			Grupo 3							
Hipotonía	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+		11/13	n/a	13/21	n/a
Discapacidad intelectual	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	13/3	22/22	21/21	n/a
Crisis convulsivas/alt en EEG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	13/13	21/22	15/21	31/32
Alteración en alimentación	+		+	+	+	+	+	+	+					8/13	13/22	2/2	n/a
RCIU/RCEU	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+	13/13	22/22	19/21	26/32
Hendidura facial				+	+									2/13	6/22	3/19	4/32
Nariz típica	+	+	+	n/a	+	+	+	+	+	+		+	+	12/12	n/a	17/21	n/a
Microcefalia	+	+	+	n/a		+	+	+	+	+				9/12	n/a	20/21	18/23
Frente alta	+	+	+	n/a	+	+	+	+	+					8/12	n/a	17/18	n/a
Hipertelorismo	+	+	+	n/a	+	+	+	+	+			+	+	12/12	n/a	16/19	n/a
Epicanto		+		n/a		+						+		3/12	n/a	7/17	n/a
Filtrum corto		+		n/a			+	+	+			+		7/12	n/a	16/19	n/a
Labios descendentes		+		n/a		+	+		+	+		+		7/12	n/a	14/19	n/a
Pabellones dismórficos	+	+	+	n/a	+	+	+	+	+					10/12	n/a	17/20	n/a
Cardiopatía	CIA		PCA		CIV		CIA		CIA, EP				CIA	7/13	19/22	5/19	16/32
Ojos	CI,G	EST	G,CI,CN,C			G	EST		EST		EST		CI,D	8/13	13/20	10/21	17/32
Esqueléticas		PEVU	PEVB	DCC		PEVB	POLI				PEVB		PEVU	7/13	9/20	7/19	11/32
Urogenitales		HIP, CRIP		HIP		AR	CRIP,ER	RH	DRM		CRIP	CRIP		8/13	8/19	12/17	14/32
SNC				HCC						ACC	HCC			3/13	8/22	n/a	n/a
Hipoacusia	+		+	+	+								+	5/13	12/22	1/12	13/32

n/a- no analizado AR-agenesia renal C- catarata CI- coloboma de iris CIA- comunicación interauricular CIV- comunicación interventricular CN- coloboma de nervio óptico
 CRIP- criptorquidia D-dacriostenosis DCC- displasia congénita de cadera DRM- displasia renal multiquística EP- estenosis pulmonar ER-ectopia renal EST- estrabismo
 G- glaucoma H/ACC- hipoplasia/agenesia de cuerpo caloso HIP- hipospadias PEVU/B- pie equino varo uni/bilateral POLI-polidactilia RH- riñón en herradura

Una limitación del presente estudio es que no fue posible reevaluar directamente a todos los pacientes, por ejemplo en el caso del paciente 4 los datos se obtuvieron del expediente clínico en el cual sólo se refería fenotipo compatible con el SWH; sin embargo, no se detallaron las dismorfias específicas y por ello se decidió no incluir a este pacientes para la consideración en relación a la frecuencia de las manifestaciones clínicas faciales pero sí fue incluido para el análisis estadístico.

Los dos datos clínicos faciales más frecuentemente encontrados en nuestros pacientes fueron la nariz típica y el hipertelorismo en 10 de los 10 pacientes considerados, seguido de pabellones auriculares dismórficos (8/10), frente alta y filtrum corto (6/10), labios descendentes (5/10) y epicanto (2/10). El estudio de Maas NMC, et al. (2008) en el cual se desglosan las dismorfias faciales por separado, el dato más común fue la frente alta (17/18), seguido de pabellones auriculares dismórficos (17/20), hipertelorismo (16/19) y el filtrum corto (16/19), y presentándose en el menor de los casos las comisuras labiales descendentes (14/19) y el epicanto (7/17) lo cual concuerda con las observaciones en nuestros pacientes.

En relación a las alteraciones neurológicas se consideran el retraso en el desarrollo psicomotor (RDPM)/discapacidad intelectual (DI) y crisis convulsivas o alteraciones en el electroencefalograma (Zollino M, et al., 2008). En cuanto al RDPM o DI en nuestros casos no fue posible clasificar el grado del mismo en leve-moderado-grave en la totalidad de los pacientes al no contarse con esta evaluación, para posteriormente poder relacionarlo con el tamaño de la deleción.

En relación a las crisis convulsivas, estas estuvieron presentes en 100% de los pacientes y es un porcentaje comparable con lo reportado, ya que por ejemplo en un estudio en Japón con 22 pacientes diagnosticados por FISH y aCGH se reportaron crisis convulsivas en el 95% de los casos e iniciaron antes de los tres años de vida en todos ellos (Shimizu K, et al., 2014).

El RCIU/RCEU se presentó en todos los casos, sólo en el paciente 11 la restricción del crecimiento no fue desde el nacimiento ya que el peso y talla estaban por arriba de la percentila 5 para edad de gestación; sin embargo, el paciente sí presentó RCEU con peso y talla <p5 al momento de su última evaluación, la cual fue a los 8 años. Todos los pacientes reportados por Shimizu K, et al., (2014) tuvieron restricción del crecimiento, contrastado con 81% y 90% en los estudios de South ST, et al. (2008) y Maas NMC et al. (2008), en nuestro

caso, se trató de una de las manifestaciones más comunes, presente en todos los pacientes.

La segunda manifestación más común después de los cuatro puntos anteriores fue hipotonía en 84.6% (11/13) de los casos, la cual estuvo presente desde el nacimiento en la mayoría de los casos. En otros estudios se ha presentado en 62% y >75% (Battaglia A, et al., 2002; Maas NMC, et al., 2008), por lo que lo encontrado en nuestros pacientes se considera de acuerdo a lo reportado previamente.

La microcefalia estuvo presente en 7/11 (63.6%) de los pacientes en este estudio y tuvo una frecuencia menor a la reportada. En general, se estima que está presente >75% de las veces (Battaglia A, et al., 2002) y de manera específica se ha reportado hasta en el 95% (Maas NMC, et al., 2008) y 78% de los casos (South ST, et al., 2008).

Las malformaciones mayores más comunes fueron las cardiopatías congénitas, del tracto urogenital y las oftalmológicas, todas con una frecuencia de 54.5%. Las cardiopatías encontradas fueron comunicación interauricular e interventricular (CIA y CIV, respectivamente), persistencia del conducto arterioso (PCA) y estenosis pulmonar. Estas cuatro entidades son las mismas que se refieren en la literatura, a excepción de un paciente con válvula aórtica bicúspide reportado por South ST, et al. (2008). La CIA está reportada como la cardiopatía más común (Battaglia A, et al., 2008) y también fue lo observado en nuestros pacientes, presentándose en 4/6 pacientes con cardiopatía congénita.

Las alteraciones del tracto urogenital estuvieron presentes más frecuentemente de lo esperado en 61.5% (8/13) de los pacientes. Se encontró criptorquidia, hipospadias, riñón en herradura y displasia renal multiquística, lo cual ya se ha reportado previamente. El rango de frecuencia de malformaciones a este nivel en la literatura es de 33-70% (Battaglia A, et al., 2008; Maas NMC, et al., 2008; South ST, et al., 2008; Shimizu K, et al., 2014).

Los hallazgos a nivel ocular fueron catarata, glaucoma, coloboma de nervio óptico, coloboma de iris, estrabismo y dacriostenosis, todos reportados previamente (Dickmann A, et al., 2009). La frecuencia encontrada en nuestros pacientes de alteraciones oftalmológicas fue de 54.5% que corresponde a lo esperado de acuerdo a los estudios previos que reportan frecuencias entre 47-65% (Wu Chen WY, et al., 2004; Dickmann A, et al., 2009).

En 9 pacientes fue posible realizar estudio de cariotipo con bandas GTG a sus padres, los cuales todos fueron normales. Con esta información se dio asesoramiento genético con un

riesgo de recurrencia bajo ($< 1\%$), el cual es el riesgo indicado para una alteración *de novo*. La frecuencia de casos de SWH heredados de un padre portador balanceado es del 15% y por esta razón sería necesario ofrecer el estudio con FISH a los padres de los pacientes 1-5, y 7; en caso de que se detectara una translocación se ofrecería análisis de FISH a los padres y basado en los datos de cada caso según se encuentre alteración citogenética molecular o no dar el asesoramiento genético correspondiente. En los casos 8 y 10 se les realizó cariotipo a los padres y cariotipo y FISH a los pacientes y se encontró que en todos los casos fue normal, aún cabría la posibilidad de una translocación críptica, como las descritas por South ST, et al. (2008). La posibilidad de que sea heredada podría descartarse con FISH con sonda para la región crítica del SWH en los padres. El riesgo teórico para heredar una translocación en un portador balanceado puede ser de hasta el 50%.

Como se describe, el asesoramiento genético en los casos de pacientes con SWH debe individualizarse según las características particulares de cada caso lo que demuestra la importancia de analizar estas series de pacientes desde el punto clínico, citogenético y molecular para conocer las características de la población en estudio y ofrecer asesoramiento genético con bases moleculares.

11. CONCLUSIONES

- La frecuencia del SWH por datos clínicos para la población del HIMFG en que se solicitó estudio citogenético es de 1:320 y como cromosomopatía es del 1%.
- En este trabajo se describe a 15 pacientes con diagnóstico clínico de SWH en relación a sus características fenotípicas, en 13 de ellos fue posible confirmar el diagnóstico por estudio citogenético y/o citogenético molecular.
- En el 53.8% de los pacientes se hizo el diagnóstico por citogenética convencional incluyendo los pacientes 6 y 7 quienes presentaron otra alteración además de la deleción 4p16.3. Este porcentaje es comparable con lo reportado en estudios grandes previos y hace referencia al tamaño de la deleción que se presenta con mayor frecuencia en el SWH en nuestra población, la cual es de $\geq 5\text{Mb}$ y correspondería al grupo 1.
- La frecuencia de los hallazgos clínicos en general también es comparable con lo reportado en la literatura, sin embargo cuando se consideran por grupo, el grupo 2 presentó más malformaciones mayores en comparación con la literatura. En estos casos no se puede descartar la presencia de translocaciones crípticas no balanceadas las cuales modificarían el fenotipo.
- En la mayoría de los pacientes fue posible confirmar el diagnóstico por técnica de bandas GTG y FISH.
- Queda abierta la posibilidad de realizar estudios moleculares tipo aCGH en todos los casos, para poder caracterizar adecuadamente el tamaño de la región 4p implicada y verificar la participación o no de otras regiones cromosómicas.
- Se identificaron las principales manifestaciones clínicas fenotípicas del síndrome y se dio asesoramiento genético.
- Hasta donde sabemos, en México no hay reportes previos de series de pacientes con el SWH.

12. REFERENCIAS

- Akbas H, Cine N, Erdemoglu M, Atay AE, Simsek S, Turkylmaz A, et al. Prenatal Diagnosis of 4p and 4q subtelomeric deletion in de novo ring chromosome 4. *Cas Rep Obs Gyn.* 2013;2013:1-5.
- Andersen E, Carey JC, Earl DL, Corzo D, Suttie M, Hammond P, et al. Deletions involving genes *WHSC1* and *LETM1* may be necessary, but are not sufficient to cause Wolf-Hirschhorn syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2014;22:464-70.
- Antonius T, Draaisma J, Levtschenki E, Knoers N, Renier W, van Ravenswaaij C. Growth charts for Wolf-Hirschhorn syndrome (0-4 years of age). *Eur J Pediatr.* 2008;167:807-810.
- Aviv A & Susser E. Leukocyte Length and the Father's Age Enigma: Implications for Population Health and for Life Course. *Int. J. Epidemiol.* 2013;42: 457-462.
- Balci S, Engiz O, Aktas D, Vergel I, Beksac MS, Mrasek K, Vermeesch J, Liehr T. Ring Chromosome 4 and Wolf-Hirschhorn Syndrome (WHS) in a Child With Multiple Anomalies. *Am J Med Gen.* 2006;140A:628-632.
- Battaglia A, Carey JC, South ST, Wright TJ. Wolf-Hirschhorn Syndrome. 2002 Apr 29 [Updated 2010 Jun 17]. En: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1183/>.
- Battaglia A, Filippi T, Carey JC. Update on the Clinical Features and Natural History of Wolf-Hirschhorn (4p-) Syndrome. *Am J Med Gen.* 2008;148C:246-251.
- Battaglia A, Guerrini R. Chromosomal disorders associated with epilepsy. *Epileptic Disord.* 2005;7:181-92.
- Battaglia A, Filippi T, South ST, Carey JC. Spectrum of epilepsy and electroencephalogram patterns in Wolf-Hirschhorn syndrome: experience with 87 patients. *Dev Med Child Neurol.* 2009;51:373-380.
- Beheshti B, Park PC, Braude I, Squire JA (2002). Microarray CGH. En: *Methods in Molecular Biology*, Vol 204. Molecular Cytogenetics. Yao-Shan (ed). Humana Press, Totowa. 191-207
- Bergemann AD. Distinctive EEG patterns in patients with Wolf-Hirschhorn syndrome. [Comentario de "Spectrum of epilepsy and electroencephalogram patterns in Wolf-Hirschhorn syndrome: experience with 87 patients" por Battaglia A, Filippi T, South ST, Carey JC]. *Dev Med Child Neurol.* 2009; 51:336-339.
- Besson A, Dowdy SF, Roberts JM. CDK Inhibitors: Cell Cycle Regulators and Beyond. *Dev Cell.* 2008;14:159-169.
- Bian Q & Belmont AS. Revisiting higher-order and large-scale chromatin organization. *Curr Opin Cell Bio.* 2012;24:359-366.

- Bickmore WA (2001). Karyotype analysis and chromosome banding. En: *En: Encyclopedia of Life Sciences* (eLS). John Wiley & Sons Ltd, Chichester. DOI: 10.1038/npg.els.0001160.
- Bloom J & Cross FR. Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat Rev Mol Cell Bio.* 2007;8:149-160.
- Chow JC, Ciaudo C, Fazzari MJ, Mise N, Servant N, Glass JL, et al. LINE-1 Activity in Facultative Heterochromatin Formation during X Chromosome Inactivation. *Cell.* 2010; 141;956-969.
- Cremer M, Schermelleh L, Solovei I, Cremer T (2005). Cell Cycle: Chromosomal Organization. En: *En: Encyclopedia of Life Sciences* (eLS). John Wiley and Sons Ltd, Chichester. DOI: 10.1038/npg.els.0005769.
- Cunningham F, Amode MR, Barrell D Beal K, Billis K, Brent S, et al. Ensembl 2015. *Nucleic Acids Res.* 2015;43:D662-D669.
http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/Chromosome?r=4
- Debost-Legrand A, Goumy C, Laurichesse-Delmas H, Déchelotte P, Beaufrere AM, Lemery D, et al. Prenatal Ultrasound Findings Observed in the Wolf-Hirschhorn Syndrome: Data from the Registry of Congenital Malformations in Auvergne. *Birth Defects Res. Part A.* 2013;97:806-811.
- De Lange T (2005). Telomeres: Protection and Maintenance. En: *Encyclopedia of Life Sciences* (eLS). John Wiley & Sons Ltd, Chichester. DOI: 10.1038/npg.els.0005281.
- Del Castillo-Ruiz, V, Uranga-Hernández RD, Zafra-de la Rosa, G (2012). *Genética Clínica.* Manual Moderno, Ciudad de México.
- Delhanty J (2010). Origins of human aneuploidy. En: *Encyclopedia of Life Sciences* (eLS). John Wiley & Sons Ltd, Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0021444.
- Díaz-Martínez LA (2010). Chromosome Condensation and Cohesion. En: *Encyclopedia of Life Sciences*. (eLS). John Wiley & Sons Ltd, Chichester. DOI:10.1002/9780470015902.a0022534.
- Dickmann A, Parrilla R, Salerni A, Savino G, Vasta I, Zollino M, et al. Ocular manifestations in Wolf-Hirschhorn syndrome. *J of AAPOS.* 2009;13: 264-267.
- Doenecke D (2005). Histones: From Gene Organization to Biological Roles. En: *Encyclopedia of Life Sciences* (eLS). John Wiley & Sons Ltd, Chichester. DOI: 10.1038/npg.els.0001154.
- Doenecke D & Albig W (2005). Histones. En: *Encyclopedia of Life Sciences* (eLS). John Wiley and Sons Ltd, Chichester. DOI: 10.1038/npg.els.0005908.
- Endele S, Nelkenbrecher C, Bordlein A, Schlickum S, Winterpacht A. *C4ORF48*, a gene from the Wolf-Hirschhorn syndrome critical region, encodes a putative neuropeptide expressed during neocortex and cerebellar development. *Neurogenetics.* 2011;12:155-163.

- Engbers H, van der Smagt JJ, van 't Slot R, Vermeesch JR, Hochstenbach R, Poot M. Wolf-Hirschhorn syndrome facial dysmorphic features in a patient with a terminal 4p16.3 deletion telomeric to the WHSCR and WHSCR2 regions. *Eur J Hum Genet.* 2009;17:129-132.
- Fisch GS, Grossfield P, Falk R, Battaglia A, Youngblom J, Simensen R. Cognitive-Behavioral Features of Wolf-Hirschhorn Syndrome and Other Subtelomeric Microdeletions. *Am J Med Gen.* 2010;154:417-426.
- Frank-Kamenetskii MD (2002). DNA Structure: Sequence Effects. En: *Encyclopedia of Life Sciences* (eLS). John Wiley and Sons Ltd, Chichester.
- Galati A, Micheli E, Cacchione S. Chromatin structure in telomere dynamics. *Front Oncol.* 2013;3:1-14.
- Giglio S, Calvari V, Gregato G, Gimelli G, Camanini S, Giorda R, et al. Heterozygous Submicroscopic Inversions Involving Olfactory Receptor-Gene Clusters Mediate the Recurrent t(4;8)(p16;p23)Translocation. *Am J Hum Genet.* 2002;71:276-285.
- Gilchrist S & Bickmore WA (2005). Chromosome Structures: Visualization. En: *Encyclopedia of Life Sciences* (eLS). John Wiley and Sons Ltd, Chichester. DOI: 10.1038/npg.els.0005784.
- Gole L (2001). Fluorescence *in situ* Hybridization. En: *Encyclopedia of Life Sciences* (eLS). John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Gollin SM & Skarja SR (2005). Mitosis: Chromosomal Rearrangements. En: *Encyclopedia of Life Sciences* (eLS). John Wiley & Sons Ltd, Chichester. DOI: 10.1038/npg.els.0005773.
- Gomez DE, Armando RG, Farina HG, Lorenzano P, Cerrudo CS, Ghiringhelli PD, et al. Telomere structure and telomerase in health and disease (Review). *Int. J. Oncol.* 2012; 41:1561-1569.
- Grigoryev S, Woodcock CL. Chromatin Structure- The 30 nm fiber. *Exp. Cell. Res.* 2012;318:1448-1455.
- Gu W, Zhang F, Lupski JR. Mechanisms for human genomic rearrangements. *PathoGenetics.* 2008;1:1-17.
- Haaf T (2006). Centromeres. En: *Encyclopedia of Life Sciences* (eLS). John Wiley & Sons Ltd, Chichester. DOI :10.1002/9780470015902. a0005785.
- Haanes F, Hammond P, Quarrell O, Fryns JP, Devriendt K, Vermeesch JR. A microdeletion proximal of the critical deletion region associated with mild Wolf-Hirschhorn syndrome. *Am J Med Gen.* 2012;158:996-1004.
- Hansen, NJ, Poole JC, Andrews LG, Tollefsbol TO (2005). Telomerase: Structure and Function. En: *Encyclopedia of Life Sciences* (eLS). John Wiley & Sons Ltd, Chichester. doi: 10.1038/npg.els.0006167.

- Hart L, Rauch A, Carr AM, Vermeesch JR, O'Driscoll M. *LETM1* haploinsufficiency causes mitochondrial defects in cells from humans with Wolf-Hirschhorn syndrome: implications for dissecting the underlying pathomechanism in this condition. *Dis Model Mech.* 2014;7: 535-545.
- Hirschhorn K, Cooper HL, Firschein IL. Deletion of short arms of chromosome 4–5 in a child with defects of midline fusion. *Humangenetik.* 1965;1:479–482.
- Hirschhorn, K. A Short History of the Initial Discovery of the Wolf-Hirschhorn Syndrome. *Am J Med Gen.* 2008; 148C:244-245.
- Holmquist GP (2005). Chromosomal Bands and Sequence Features. En: *Encyclopedia of Life Sciences.* John Wiley & Sons Ltd, Chichester. DOI: 10.1038/npg.els.0005002.
- Hsieh C (2011). Cytogenetic Techniques. En: *Encyclopedia of Life Sciences (eLS).* John Wiley & Sons Ltd, Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0002650.pub2.
- Hultén MA (2010). Meiosis. En: *Encyclopedia of Life Sciences.* John Wiley & Sons Ltd, Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0005772.pub2.
- Jackson L. Cytogenetics and Molecular Cytogenetics. *Clin Obstet Gynecol.* 2002;45:622-639.
- Kalitsis P (2008). Centromeres. En: *Encyclopedia of Life Sciences (eLS).* John Wiley & Sons Ltd, Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0001166.pub2.
- Kerzendorfer C, Hannes F, Colnaghi R, Abramowicz I, Carpenter G, Vermeesch JR, et al. Characterizing the functional consequences of haloinsufficiency of *NELF-A (WHSC2)* and *SLBP* identifies novel cellular phenotypes in Wolf- Hirschhorn syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 2012; 21: 2181-2193.
- Kitagawa M, Kitagawa K, Kotake Y, Niida H, Ohhata T. Cell cycle regulation by long non-coding RNAs. *Cell. Mol. Life Sci.* 2013;70:4785-4794.
- Kitazono A, Fitz Gerald JN, Kron SJ (2005). Cell Cycle: Regulation by Cyclins. En: *Encyclopedia of Life Sciences (eLS).* John Wiley & Sons Ltd, Chichester. doi: 10.1038/npg.els.0004024.
- Kocks A, Endeles S, Heller R, Schroeder B, Schafer H-J, Stadtler C, Makrigeorgi-Butera M, Winterpacht A. Partial deletion of 4p and 4q in a fetus with ring chromosome 4: phenotype and molecular mapping of the breakpoints. *J Med Genet.* 2002;39:23.
- Kohli J & Hartsuiker E (2008). Meiosis. En: *Encyclopedia of Life Sciences (eLS).* John Wiley & Sons Ltd, Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0001359.pub2.
- Larizza L & Doneda L (2005). Heterochromatin: Constitutive. En: *Encyclopedia of Life Sciences (eLS).* John Wiley & Sons Ltd, Chichester. DOI:10.1038/npg.els.0005786.
- Li Y, Barbash O, Diehl JA (2015). Regulation of the Cell Cycle. En: *The Molecular Basis of Cancer, 4th ed.* Elsevier/Saunders, Philadelphia. 165-178.

- Liu ST, Allison DC, Nestor-Kalinowski AL (2010). Chromosomes during Cell Division. En: *Encyclopedia of Life Sciences* (eLS). John Wiley & Sons Ltd, Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0005770.pub2.
- Luger K, Dechassa ML, Tremethick DJ. New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* 2012;3:436-447.
- Luthardt FW, Keiteges E (2001). Chromosomal syndromes and genetic disease. En: *Encyclopedia of Life Sciences* (eLS). John Wiley & Sons Ltd, Chichester. DOI: 10.1038/npg.els.0001446.
- Maas NMC, Van Buggenhout G, Hannes F, Thienpont B, Sanlaville D, Kok K, Midro A, Andrieux J, Anderlid B-M, Schoumans J, Hordijk R, Devriendt K, Fryns J-P, Vermeesch JR. Genotype-phenotype correlation in 21 patients with Wolf-Hirschhorn syndrome using high resolution array comparative genome hybridisation (CGH). *J Med Genet.* 2008;45:71-80.
- Madian N, Jayanthi KB. Analysis of human chromosome classification using centromere position. *Measurement.* 2014;47:287-295.
- Moore CM & Best RG. (2001) Chromosomal Genetic Disease: Structural Aberrations. En: *Encyclopedia of Life Sciences* (eLS). John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Moore CM & Best RG (2001). Chromosome Preparation and Banding. En: *Encyclopedia of Life Sciences* (eLS). John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Moore CM & Best RG (2007). Chromosome Mechanics. En: *Encyclopedia of Life Sciences* (eLS). John Wiley & Sons Ltd, Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0001441.pub2.
- Morris CA & Moazed D. Centromere assembly and propagation. *Cell.* 2007;128:647-651.
- Olovnikov AM. Telomeres, Telomerase, and Aging: Origin of the Theory. *Exp Gerontol.* 1996;31:443-448.
- Pajalunga D, Mazzola A, Franchitto A, Puggioni E, Crescenzi M. The logic and regulation of cell cycle exit and reentry. *Cell. Mol. Life Sci.* 2008;65:8-15.
- Paradowska-Stolarz AM. Wolf-Hirschhorn Syndrome (WHS)- Literature Review on the Features of the Syndrome. *Adv Clin Exp Med.* 2014;23:485-489.
- Paulson JR, Vagnarelli P (2011). Chromosomes and Chromatin. En: *Encyclopedia of Life Sciences* (eLS). John Wiley & Sons Ltd, Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0005766.pub2.
- Peters JM, Hauf S (2005). Meiosis and Mitosis: Molecular Control of Chromosome Separation. En: *Encyclopedia of Life Sciences* (eLS). John Wiley & Sons Ltd, Chichester. DOI: 10.1038/npg.els.0005917.
- Plohl M, Mestrovic N, Mravinac B. Centromere identity from the DNA point of view. *Chromosoma.* 2014:1-13.

- Prunotto G, Cianci P, Cereda A, Scatigno A, Fossati C, Maitz S, et al. Two cases of hepatic adenomas in patients with Wolf-Hirschhorn Syndrome: A new rare complication. *Am J Med Genet.* 2013;161A:1759-1762.
- Robinson WE & McFadden DE (2002). Chromosomal Genetic Disease: Numerical Aberrations. En: *Encyclopedia of Life Sciences* (eLS). John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Sarri, C, Douzgou S, Kontos H, Anagnostopoulou K, Tümer Z, Grigoriadou M, et al. *Cytogenet Genome Res.* 2015;145:6-13.
- Seitan VC & Merkenschlager M. Cohesin and Chromatin organization. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2012;22:93-100.
- Shaffer LG (2005). Karyotype Interpretation. En: *Encyclopedia of Life Sciences* (eLS). John Wiley & Sons Ltd, Chichester. DOI: 10.1038/npg.els.0005778.
- Shaffer LG & Lupski JR. Molecular Mechanisms for Constitutional Chromosomal Rearrangements in Humans. *Annu Rev Genet.* 2000; 34: 297-329.
- Shannon NL, Maltby EL, Rigby AS, Quarrell OWJ. An epidemiological study of Wolf-Hirschhorn syndrome: life expectancy and cause of mortality. *J Med Genet.* 2001;38:674-679.
- Sharkey FH, Maher E, FitzPatrick DR. Chromosome analysis: what and when to request. *Arch Dis Child.* 2005;90:1264-1269.
- Sheth F, Akinde OR, Datar C, Adeteye OV, Sheth J. Genotype-Phenotype Characterization of Wolf-Hirschhorn Syndrome Confirmed by FISH: Case Reports. *Case Rep Genet.* 2012:1-5.
- Shimizu K, Wakul K, Kosho T, Okamoto N, Mizuno S, Itomi K, et al. Microarray and FISH-Based Genotype-Phenotype Analysis of 22 Japanese Patients With Wolf-Hirschhorn Syndrome. *Am J Med Genet Part A.* 2013;164A:597-609.
- South ST, Whitby H, Battaglia A, Carey JC, Brothman AR. Comprehensive analysis of Wolf-Hirschhorn syndrome using array CGH indicates a high prevalence of translocations. *Eur J Hum Genet.* 2008;16:45-52.
- South ST, Bleyl SB, Carey JC. Two unique patients with novel microdeletions in 4p16.3 that exclude the WHS critical regions: Implications for critical region designation. *Am J Med Gen Part A.* 2007;143A:2137-2142.
- Speicher MR (2005). Chromosome. En: *Encyclopedia of Life Sciences* (eLS). John Wiley & Sons Ltd, Chichester. DOI: 10.1038/npg.els.0005783.
- Stein GS, van Wijnen AJ, Stein JL, Lian JB, Owen TA (2002). Cell Cycle. En: *Encyclopedia of Life Sciences* (eLS). John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Truman AW, Kitazono A, Fitz Gerald JN, Kron SJ (2012). Cell cycle: regulation by cyclins. En: *Encyclopedia of Life Sciences* (eLS). John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Tsuchiya KD. Fluorescence in situ hybridization. *Clin Lab Med.* 2011; 31:525-42.

- Walczak C, Cai S, Khodjakov A. Mechanisms of chromosome behavior during mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11:91-102.
- Warburton D (2006). Chromosome Analysis and Identification. En: *Encyclopedia of Life Sciences* (eLS). John Wiley & Sons Ltd, Chichester. DOI:10.1038/npg.els.0005775.
- Wolf U, Reinwein H, Porsch R, Schroter R, Baitsch H. Defizienz an den kurzen Armeneines Chromosoms Nr. 4. *Humangenetik.* 1965;1:397.
- Wu-Chen WY, Christiansen SP, Berry SA, Engel WK, Fray KJ, Summers CG. Ophthalmologic Manifestations of Wolf-Hirschhorn Syndrome. *J of AAPOS.* 2004;8:345-348.
- Yang N. Cell Cycle. En: *Encyclopedia of Toxicology*, 3rd ed. 2014:753-758.
- Yao Q, Wang L, Yao B, Gao H, Li W, Xia X, Shi Q, Cui Y. Meiotic prophase 1 defects in an oligospermic man with Wolf-Hirschhorn syndrome with ring chromosome 4. *Mol Cytogenet.* 2014;7:1-5.
- Zollino M, Lecce R, Fischetto R, Murdolo M, Faravelli F, Selicroni A, et al. Mapping the Wolf-Hirschhorn Syndrome Phenotype Outside the Currently Accepted WHS Critical Region and Defining a New Critical Region, WHSCR-2. *Am J Hum Genet.* 2003;72:590-597.
- Zollino M, Murdolo M, Marangi G, Pecile V, Galasso C, Mazzanti L, Neri G. On the Nosology and Pathogenesis of Wolf-Hirschhorn Syndrome: Genotype-Phenotype Correlation and Analysis of 80 Patients and Literature Review. *Am J Med Gen.* 2008;148C:257-269.
- Zollino M, Orteschi D, Rutter M, Pfundt R, Steindl K, Cafiero C, et al. Unusual 4p16.2 deletions suggest an additional chromosome region for the Wolf-Hirschhorn syndrome-associated seizures disorder. *Epilepsia.* 2014;55:849-857.

ANEXOS

I. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA FOTOGRAFÍAS



**HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO
FEDERICO GOMEZ**
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
DR. MÁRQUEZ NO. 162 COL. DOCTORES,
DELEGACIÓN CUAUHTÉMOC, C.P. 06730 MÉXICO, D.F.
INSTITUCIÓN DE SERVICIO MÉDICO, ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN
AFILIADO A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

EB 5225-9917

México, D.F. a _____ de _____ de 20__

A QUIEN CORRESPONDA:

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

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

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

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

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

Nombre y firma _____

Paciente/tutor
Parentesco con el paciente _____

Testigo 1 _____

Testigo 2 _____

II. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA TOMA DE MUESTRA DE SANGRE PARA CARIOTIPO

 Hospital Militar Universidad de Chile	FORMATO DE CONSENTIMIENTO BAJO INFORMACION HIM-LC-PR.01-RE.01
CUBICULO No. <input style="width: 30px;" type="text"/>	FECHA <input style="width: 60px;" type="text"/> / <input style="width: 30px;" type="text"/> / <input style="width: 30px;" type="text"/>
ESTADOCIVIL <input style="width: 100px;" type="text"/>	SEXO <input style="width: 30px;" type="checkbox"/> M <input style="width: 30px;" type="checkbox"/> F <input style="width: 30px;" type="checkbox"/> O <input style="width: 30px;" type="checkbox"/> N <input style="width: 30px;" type="checkbox"/> A EDAD <input style="width: 30px;" type="text"/> AÑOS
PROCEDIMIENTO PROPUESTO Y EXPLICACION DEL MISMO:	
Toma de muestra: <input type="checkbox"/> SANGUINEA <input type="checkbox"/> ORINA <input type="checkbox"/> MATERIA FECAL <input type="checkbox"/> OTRO (explique) _____	
Beneficio: DIAGNOSTICO OPORTUNO DE PADECIMIENTO Y/O SEGUIMIENTO AL TRATAMIENTO	
Riesgos y complicaciones: MINIMOS, SI SE PRESENTA ALGUNA CONTAMOS CON PERSONAL CAPACITADO EN ATENDER LA URGENCIA. EL MATERIAL ES NUEVO, ESTERIL Y DESECHABLE.	
Yo, _____ años de edad. Reconozco que se me explico y entendi el procedimiento para realizar los exámenes, estoy enterado de los beneficios, sé de los riesgos y las probables complicaciones que se me pueden presentar. Consciente de que se busca un beneficio, doy mi consentimiento sin obligación y por decisión propia para que los exámenes se efectúen así mismo para realizar la atención de contingencias y urgencias derivadas del acto autorizado, con base al principio de libertad precepta.	
FIRMA DEL PACIENTE O SU REPRESENTANTE LEGAL _____	
TESTIGO FAMILIAR (Nombre y Firma) _____	
TESTIGO SUPERVISOR (Nombre y Firma) _____	
NOMBRE Y FIRMA DEL FLEBOTOMISTA _____	
Este consentimiento deberá firmarse para todo procedimiento de Toma de Muestras en el Laboratorio a realizarse en todo paciente sin excepción alguna. El responsable de recabarlo es quien vaya a realizar el mismo. Esta carta es renovable mientras no se concluya el procedimiento y no obligará al Químico, Técnico o Médico a realizar o omitir un procedimiento cuando esto implique un riesgo hacia el paciente. La muestra podrá ser utilizada para fines de investigación.	
REFERENCIA: LEY GENERAL DE SALUD con IV. Art. 80, 81, 82 y 83. NCM-166-SQA1-1998	

III. CARIOTIPO CON TÉCNICA DE BANDAS GTG

Material:

- Solución Buffer de fosfatos pH 7.4
- Solución Buffer de fosfatos pH 6.8
- Tripsina (solución trabajo)
- Colorante Wrigth
- Colorante Giemsa
- Cubreobjetos
- Gasas
- Guantes
- Jarras coplin
- Vaso de Precipitados
- Pipeta graduada
- Probeta graduada
- Pipeta de transferencia
- Pipeta Pasteur
- Entellán

Equipo:

- Cronómetro
- Microscopio
- Pinzas punta roma
- Método
- Preparar en tren: 4 jarras coplin y 1 vaso de precipitados cada una de las siguientes soluciones:
- 49 ml de la solución buffer pH 7.4 y 1 ml de tripsina
- Solución buffer pH 7.4
- 48 ml solución buffer pH 6.8 y 2 ml de colorante Wrigth
- 48 ml de solución buffer pH 6.8 y 2 ml de colorante Giemsa
- Vaso de precipitados con agua corriente

Procedimiento:

- 1) Se obtienen 1.5ml de sangre periférica por punción directa, en jeringa previamente heparinizada con 0.1ml de heparina sódica de 1,000 UI.
- 2) Se agregan 700µl de muestra en 2 tubos de ensayo Falcon desechables de polipropileno esterilizados.
- 3) Se agregan 5ml de medio de cultivo PB-MAX (contiene RPMI 1640, fitohemaglutinina, suero bovino fetal, antibióticos estreptomycin y penicilina, L-glutamina).
- 4) Se incuba por 72 horas a 37-37.5°C.
- 5) A las 72 hrs se agregan 20µl de colchicina a cada tubo, se agita y se incuban 30min más a 37-37.5°C.
- 6) Se centrifuga por 10 minutos a 2,500rpm.
- 7) Se decanta el sobrenadante y se resuspende agitando en vortex y se agrega solución hipotónica para completar un volumen de 12ml.

- 8) Se incuba 30 minutos a 37-37.5°C.
- 9) Centrifugar 10 minutos a 2,500rpm.
- 10) Con pipeta se retira el sobrenadante y en agitación se agrega fijar frío o solución de Carnoy, gota a gota para completar un volumen de 80ml.
- 11) Se refrigera por 20 minutos.
- 12) Se centrifuga y se retira el sobrenadante, se lleva a un volumen de 8ml para el primer lavado.
- 13) Se centrifuga nuevamente, se retira el sobrenadante y se lleva a un volumen de 6ml para el segundo lavado.
- 14) Se gotea el cultivo en laminillas de vidrio y se revisa el material determinando la calidad y cantidad de metafases presentes.
- 15) Las laminillas obtenidas se incuban en una estufa a 60°C por espacio de 24 horas.
- 16) Sumergir de 10-30 segundos una laminilla en el primer coplin, (digestión)
- 17) Sacar la laminilla al termino del tiempo y enjuagarla en el segundo coplin (parar actividad)
- 18) Sumergir la laminilla en el siguiente coplin 2 minutos (tinción con Wriqth)
- 19) Sumergir la laminilla en el siguiente coplin 2 minutos (tinción con Giemsa)
- 20) Sumergir y enjuagar la laminilla en el vaso de precipitados
- 21) Secar
- 22) Montar inmediatamente con 3 gotas de entellán y cubreobjetos
- 23) Revisar la calidad de las bandas

Dejar secar a temperatura ambiente

IV. TÉCNICA DE FISH (HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE)

- 1) Se realiza la técnica de cariotipo hasta la preparación de laminillas.
- 2) El ambiente de humedad relativa debe de estar en un rango de 50 - 60% y la temperatura entre 24–26°C.
- 3) Se resuspende el botón con la cantidad de solución fijadora para tener la concentración de metafases adecuada.
- 4) Sobre una laminilla prelavada (FISHERbrand™) se gotea el material celular en un área de acuerdo a la cantidad de sonda que se va a hibridar.
- 5) Se verifica la calidad del material celular en un microscopio de contraste de fase, los cromosomas se deben observar de color “gris rata” y libres de citoplasma para obtener una buena hibridación.
- 6) Se procede a la maduración de la muestra.
- 7) Las preparaciones celulares se incuban a 37°C en SSC 2X por 30 min, al término de esta, se deshidratan en series de etanol al 70%, 85% y 100% por 2 minutos en cada uno y se deja secar.
- 8) Se procede a la co-desnaturalización.
- 9) Las sondas previamente mezcladas con el buffer se colocan sobre la laminilla madurada en el área de mejor calidad celular, se coloca un cubreobjetos limpio de 22 x 22 mm, se sella con cemento de goma. La co-desnaturalización se realiza en el HyBryte a 71°C por 2 minutos, se realiza un control estricto de la temperatura y tiempo de desnaturalización.
- 10) Se procede a la hibridación.
- 11) Se colocan las laminillas en una cámara húmeda protegida de la luz a 37°C por 16 a 24 horas.

24 horas después, se remueve con cuidado el sellador y se retira el cubreobjetos, las laminillas son lavadas en 40 ml de SSC 0.4X/NP-40 al 0.3% a 73°C por 2 min y posteriormente en 40 ml de SSC 2X/NP-40 al 0.1% a temperatura ambiente en un tiempo no mayor a un 1 min, se deja secar la laminilla al aire en la oscuridad y se agrega como contra-tinción 8µl de DAPI/Antifade, se coloca un cubreobjetos, se sella con cemento de goma para su análisis en un microscopio de epifluorescencia (Olympus™), con los filtros (Chroma™).