



SECRETARIA DE SALUD

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA

**“DETECCIÓN DE TRANSLOCACIONES CRÍPTICAS DE
LOS CROMOSOMAS ACROCÉNTRICOS EN FAMILIAS
CON ABORTOS CON ANEUPLOIDÍAS”**

**TRABAJO DE FIN DE CURSO
QUE PRESENTA
Q.F.B. MARTA NORMA ÁNGELES AVILA
PARA OBTENER EL DIPLOMA DEL
CURSO AVANZADO DE CITOGENÉTICA**

TUTORA DE TESIS: M. en C. SANDRA ELEINA RAMOS ANGELES

I N P
CENTRO DE INFORMACION
Y DOCUMENTACIÓN

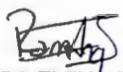
C I D
NO CIRCULA

**"DETECCION DE TRANSLOCACIONES CRIPTICAS DE LOS
CROMOSOMAS ACROCENTRICOS EN FAMILIAS CON
ABORTOS CON ANEUPLOIDIAS"**


DRA. ROSAURA ROSAS VARGAS
DIRECTORA DE ENSEÑANZA


DR. LUIS MARTIN GARRIDO GARCIA
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PRE Y POSGRADO


DRA. SARA FRIAS VAZQUEZ
PROFESOR TITULAR DEL CURSO AVANZADO DE
CITOGENETICA


M. en C. SANDRA ELENA RAMOS ANGELES
TUTOR DE TESIS



AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Citogenética, Depto. De Investigación en Genética Humana, del Instituto Nacional de Pediatría

Proyecto parcialmente financiado por CONACYT-FOSSIS 87583

Agradezco a la Dra. Sara Frías Vázquez por las oportunidades que me ha brindado, en el estudio de la Citogenética. Gracias.

A la Dra. Patricia Grether González por sus enseñanzas, por la confianza y la oportunidad de seguir practicando mis conocimientos en citogenética. Gracias.

A Sandra Ramos Angeles, por brindarme todo su apoyo, su gran asesoría, enorme comprensión y tolerancia para la realización de este trabajo. Gracias.

Al personal del laboratorio de Citogenética Bertha, Silvia, Luz, Angélica, Alfredo, Carlitos, y del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Paty, Vero, Chelo, Oreh, Roberto, Juan Carlos, por compartir sus conocimientos, amistad, cariño y apoyo que me brindaron en el momento preciso. Gracias.

Al personal del laboratorio DIAGEN, Dra. Bárbara, Vicky, Bere, Taty, Carito, por sus enseñanzas, comentarios, amistad, apoyo. Gracias

A mi Esposo Arturo, mis hijas Mariana, Victoria y Andrea que son el motor en mi vida, por su amor, por su tiempo, comprensión y confianza. Gracias.

INDICE

ANTECEDENTES	1
1. Aneuploidias. Definición y Mecanismos de formación	1
1.1 Definición	1
1.2 Mecanismos de formación de aneuploidias	1
1.3 Factores de riesgo de aneuploidias	3
1.3.1. Edad materna	3
1.3.2 Recombinación meiótica	5
1.3.3. Efecto intercromosómico	7
1.3.4. Translocaciones Críticas de Acrocéntricos	7
1.3.4.1. Definición de TCA	7
1.3.4.2. Asociación con no disyunción	8
II. OBJETIVOS	10
Objetivo General	10
Objetivos específicos	10
III. JUSTIFICACION	11
IV. Tipo de estudio	11
V. Ubicación del estudio	11
MATERIAL Y METODOS	12
Población de estudio	12
Criterios de inclusión	12
Criterios de exclusión	12

Consideraciones éticas	12
VII. METODOLOGIA	13
Diseño experimental	13
Técnicas de Laboratorio	15
1. Cultivos celulares	15
1.1. Tejidos de aborto	15
2. Cosecha de tejido de aborto	16
3. Cultivo de sangre periférica	16
4. Elaboración de laminillas para FISH	17
5. Bando	18
6. FISH con sondas centroméricas	19
6.1. Pretratamiento	19
6.2. Digestión con pepsina y fijación	19
6.3. Codesnaturalización e hibridación	20
6.4. Lavados posthibridación	20
6.5. Contratación	21
6.6. Captura de imágenes	21
6.7. Análisis celular	21
VIII. RESULTADOS	22
IX. DISCUSION	25
X. CONCLUSIONES	28
XI. BIBLIOGRAFIA	30
XII. ANEXO 1	35
Carta de consentimiento informado	35
Carta de consentimiento de uso de muestras de tejido	37

XIII . ANEXO 2. Material

39

XIV. ANEXO 3. Soluciones

41

I. ANTECEDENTES

1. ANEUPLOIDIA.

1.1 Definición. Es la alteración cromosómica más frecuente en seres humanos que consiste en la ganancia o en la pérdida de uno o más cromosomas en un individuo. Es la principal causa de aborto espontáneo, incluso se reporta que hasta el 60% o 70% de ellos son aneuploides^{1,2} y en nacidos vivos es la principal causa de malformaciones congénitas asociadas a deficiencia mental, por lo general, producidas por trisomías o sea tres cromosomas en lugar del par normal, o monosomías un solo representante de un cromosoma en lugar del par normal¹. En general, las aneuploidías no son compatibles con la vida y se calcula que el 90% de las concepciones aneuploides perecen *in utero*¹.

Aproximadamente el 15% de los embarazos clínicamente reconocidos se pierden en las primeras 20 semanas de gestación^{1,2}. Entre las aneuploidías que causan aborto, las más frecuentes son las trisomías de los cromosomas 13, 14, 15, 16, 21, y 22, la monosomía X y las poliploidías (cambios en el juego cromosómico completo)^{2,3}. Llama la atención que dentro de las trisomías mas comunes en abortos y en nacidos vivos, se encuentran las trisomías de los cromosomas acrocéntricos (13, 14,15, 21 y 22), por lo que representan un grupo particular de interés.

1.2 Mecanismos de formación de las aneuploidías

A pesar de la importancia en la morbi-mortalidad de la especie humana, se conoce muy poco acerca de la etiología de la aneuploidía, aunque está

establecido que el principal mecanismo celular que la genera es la no disyunción meiótica⁴.

La no disyunción meiótica se refiere a la falta de separación de los cromosomas bivalentes homólogos durante la anafase en meiosis I, o de las cromátidas hermanas durante meiosis II. De esta manera pueden generarse gametos aneuploidies y por lo tanto productos con desbalances cromosómicos. Si la no disyunción ocurre en meiosis I, se pueden generar dos gametos disómicos y dos gametos nulisómicos, por otro lado si la no disyunción ocurre en meiosis II se pueden generar dos gametos normales, un gameto disómico y un gameto nulisómico. Después de la fertilización, un gameto nulisómico dará origen a un producto con monosomía y un gameto disómico a un producto con trisomía^{5,6}.

Otro mecanismo que provoca aneuploidias es el rezago anafásico, por lo general, este error se lleva a cabo en las primeras divisiones mitóticas, en el cual uno de los cromosomas se pierde, originando una célula hija con monosomía y la otra célula con un complemento cromosómico normal. El rezago anafásico también puede "rescatar" un cigoto trisómico cuando, debido a este error, una de las células hijas recupera el complemento normal.

En cualquier caso, ya sea no disyunción o rezago anafásico, si se presenta en la mitosis de las células de un organismo, se genera un mosaico, que implica la presencia de al menos dos líneas celulares con diferente complemento cromosómico⁶.

1.3 Factores de riesgo de aneuploidía.

1.3.1 Edad materna.

El origen más común de las aneuploidías es la no disyunción materna en meiosis I y el riesgo de no disyunción está relacionado significativamente con la edad materna, un incremento leve para madres muy jóvenes y un gran incremento a partir de los 35 años^{3,5,6,7}.

Hace más de 70 años atrás, Penrose⁸ describió una correlación entre la trisomía 21 (síndrome de Down) y edad materna avanzada. Actualmente se tiene bien establecido que el riesgo de tener descendencia con aneuploide aumenta dramáticamente con edad de la mujer: la incidencia de la trisomía en clínicamente embarazos reconocidos es bajo en una mujer de 20 años, alrededor del 2%-3%, pero aumenta dramáticamente a aproximadamente 35% en una mujer de 40 años³.

Desde entonces, diferentes estudios se han enfocado a analizar la aneuploidía en ovocitos humanos⁹ y biopsias de cuerpo polar¹⁰, y en la revisión de la frecuencia de aberraciones cromosómicas en embriones, abortos espontáneos, mortinatos y nacidos vivos³, en todos los reportes se ha confirmado que el riesgo de errores en la segregación cromosómica aumenta con la edad materna avanzada.

Actualmente existe controversia si lo que determinan los riesgos de no disyunción en la ovogénesis son consecuencias propias a la edad materna como la edad cronológica del ovario femenino y del ovocito, o debido al agotamiento de folículos primordiales del ovario y de los ovocitos primarios por envejecimiento fisiológico¹¹⁻¹³. Además, se desconoce en qué medida la

constitución cromosómica definida por la longitud, distribución de genes y el contenido, así como la presencia y el patrón de intercambios en cada cromosoma, puede contribuir a la alta susceptibilidad a errores meióticos en un ovocito añoso.

Por último, existen diferentes hipótesis sobre alteraciones constitutivas y alteraciones relacionadas con la edad en la homeostasis hormonal, en ovocitos y en folículos, que se sugiere correlacionan con el aumento de errores en la segregación normal y secuencial de homólogos y de cromátidas hermanas en la meiosis I y II ¹⁴.

Parece que varios eventos durante la maduración de los ovocitos contribuyen a la predisposición diferencial de los cromosomas individuales en los errores de la segregación cromosómica que implican cromosomas enteros o de cromátidas hermanas en la meiosis I o II en el contexto de una "ooplasma envejecido". La presencia, la localización y número de intercambios, como resultado de los primeros eventos meióticos predisponen a los cromosomas a diferentes errores de segregación, dependiendo de la edad ¹⁵.

El arresto meiótico prolongado afecta posiblemente: a) La cohesión y la integridad cromosómica; b) La funcionalidad de componentes celulares en el ovocito, y en ambiente folicular. La reserva del pool folicular tiene un gran efecto sobre la homeostasis hormonal. Dentro del "contexto de envejecimiento", una expresión anormal durante el crecimiento y maduración de ovocitos, por ejemplo, de los componentes en los puntos de control del ciclo celular y los procesos del huso, y el reclutamiento desregulado y/o la degradación de mRNAs y proteínas, en última instancia, pueden actuar conjuntamente para predisponer a los ovocitos a errores en la segregación cromosómica ¹⁵.

Por ejemplo si se altera la expresión de proteínas encargadas en la alineación y la segregación de los cromosomas en ovocitos de añosos se favorece la pérdida de fidelidad de la segregación de cromosomas, particularmente en el contexto de los puntos de control y permisivas condiciones que imiten la situación en ovocitos de edad¹⁵.

1.3.2. Recombinación meiótica

La recombinación meiótica es crucial tanto en la evolución de los genomas como en la segregación cromosómica para garantizar la correcta distribución de pares homólogos durante la gametogénesis¹⁶.

En la mayoría de los mamíferos, incluyendo los seres humanos, existen diferencias importantes en las tasas de la recombinación meiótica y en los patrones de distribución entre hombres y mujeres [2¹⁷]. Entre éstas diferencias se ha reportado: a) La distribución de cruces a lo largo del genoma, la cual tiende a ser menor en los telómeros en las mujeres en relación con los hombres [3¹⁸]; b) El tiempo medio de recombinación en el genoma completo en mujeres es de 1,6 veces más que en los hombres [4,5^{19,20}]; y c) El 15% de los sitios de recombinación son sexo-específicos en mujeres y en hombres [6²¹]. La evidencia indica dimorfismo sexual en la regulación del proceso meiótico [7-9^{3,21,22}], incluso se ha observado una alta heterogeneidad en la tasa de recombinación dentro del mismo sexo¹⁶.

Por otro lado, existe evidencia que la ausencia de recombinación durante meiosis I entre cromosomas homólogos (meiosis aquíasmática) o la recombinación muy distal o telomérica predispone a la no disyunción y este tipo de recombinaciones pueden suceder de manera azarosa e independiente de la

edad. La recombinación muy cercana al centrómero, también se asocia a envejecimiento²³, favorece la no disyunción tanto en meiosis I como en meiosis II, se ha postulado que los quiasmas proximales pueden causar separación prematura de cromátidas hermanas, en el contexto de proteínas del complejo de cohesión centromérica degradadas por edad²⁴.

Cabe mencionar que no se ha reportado efecto de la edad paterna en la recombinación, destacando una las diferencias en los patrones de variación entre sexos¹⁶, seguramente esta asimetría puede ser explicada por las diferencias importantes en el momento de inicio, la duración y el resultado de los procesos meióticos entre sexos [7,8^{3,21}]. Muchos estudios han demostrado variación significativa entre individuos en las tasas de recombinación en todo el genoma, y hay resultados que apuntan a una variación intra-individual de recombinación¹⁶.

Es importante mencionar que algunos cromosomas presentan una asociación significativa con la recombinación y edad avanzada [7,43^{3,26}]. Por lo tanto no todas las trisomías se ven afectadas por aumento de la edad materna por igual y no parece probable que los mismos mecanismos se aplican a todas las concepciones aneuploides [44²⁷]. Está bien establecido que el número de cromosomas en la descendencia que produce anomalías más frecuentemente como avanza la edad materna, pero los mecanismos meióticos implicados siguen sin estar claros¹⁶.

Se ha documentado que parejas jóvenes con un producto aneuploide, tienen un riesgo de recurrencia más elevado que el esperado para un fenómeno accidental y el riesgo se incrementa para la alteración original y para

otras aneuploidías, lo que sugiere la existencia de otros factores independientes de la edad, que incrementan riesgo para no disyunción.⁶

1.3.3. Efecto intercromosómico

Se ha sugerido que en pacientes que presentan rearrreglos estructurales como translocaciones (intercambio de material cromosómico entre dos cromosomas no homólogos), adicionalmente a los efectos directos en la segregación de los cromosomas involucrados, se ha observado que puede existir un efecto en la segregación meiótica de cromosomas diferentes a los involucrados en el rearrreglo y estructuralmente normales. Entre las posibles consecuencias se encuentran: la interrupción de la alineación cromosómica en el huso meiótico o mitótico y la interferencia en diferentes procesos clave de la segregación; cualquiera que fuera el caso se incrementaría el riesgo de producir gametos aneuploides. Este fenómeno se conoce como efecto intercromosómico²⁵.

1.3.4 Translocaciones crípticas de acrocéntricos (TCA).

1.3.4.1 Definición de TCA.

En el 2003 el grupo de Cockwell²⁶, detectó un tipo de rearrreglo cromosómico estructural que podría generar aneuploidías: las translocaciones crípticas de cromosomas acrocéntricos (TCA), el estudio incluyó 50 parejas con aborto recurrente, en donde encontraron sólo una translocación críptica del tipo subteloamérica y cinco TCA. Una translocación críptica se define como una alteración cromosómica no detectable por un cariotipo rutinario con bandas G,

específicamente las TCA son translocaciones de los brazos cortos y parte del centrómero de los cromosomas acrocéntricos 13, 14, 15, 21 y 22 con regiones similares de otro cromosoma acrocéntrico pertenecientes a los grupos D y/o G²⁶. Los portadores no pueden ser detectados por citogenética convencional y no tienen efectos deletéreos en el fenotipo aún con desbalances de las de regiones heterocromáticas o de brazo p.

1.3.4.2 Asociación de TCA con no disyunción.

La importancia de estos rearrreglos es que pueden no ser inocuos en cuanto a la formación de gametos, estos autores sugieren que la presencia de TCA puede condicionar apareamientos anormales en la meiosis y dar lugar a no disyunción que genera concepciones aneuploides²⁶; no pudieron comprobarlo porque no estudiaron cromosómicamente los productos de aborto.

Por otro lado, Gair *et al.* reportaron una familia con trisomía 21 recurrente en la que proponían como hipótesis la presencia de una TCA que involucra la región 21q11, sin embargo no pudieron comprobar el rearrreglo²⁴. Posteriormente, derivado de un estudio para detección de mosaicismo en padres de pacientes con síndrome de Down²⁷, Ramos *et al.*²⁸ reportaron un caso de síndrome de Down cuyo padre era portador de una TCA que involucraba a un cromosoma 22 dicéntrico, mediante marcadores moleculares se determinó que el cromosoma extra provenía del padre y por primera vez se reportó la asociación de éstas alteraciones con la generación de un producto aneuploide.

A este respecto, no existe un estudio diseñado específicamente para buscar la asociación entre individuos con TCA y la generación de aneuploidía,

la evidencia de la TCA se ha presentado como casos aislados^{26,27,28,29} y no todos han sido concluyentes. Es de esperar que una translocación a nivel pericentromérica, altere la segregación cromosómica, porque se podrían producir configuraciones meióticas complejas, que eventualmente podrían modificar la frecuencia y distribución de los entrecruzamientos⁷, lo cual, está directamente relacionado con la segregación cromosómica. La falta de quiasmas está relacionada con no disyunción en meiosis I, mientras que los entrecruzamientos en la región pericentromérica están relacionados con no disyunción en meiosis II^{4, 30}.

Como se ha mencionado anteriormente, el principal mecanismo de formación de aneuploidías reconocido es la no disyunción y en este trabajo se sugiere que la presencia de TCA puede favorecer la disyunción anormal debido a un entrecruzamiento anormal de los cromosomas involucrados en la translocación, o bien también podrían generarse gametos aneuploides involucrando cromosomas ajenos a la translocación por medio de efecto intercromosómico. Por lo anterior, en este trabajo se buscó la presencia de TCA en los productos de abortos con aneuploidía de cromosomas acrocéntricos (ACA).

I N P
CENTRO DE INFORMACION
Y DOCUMENTACIÓN

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL. Determinar si las TCA son un factor etiológico que da lugar a aneuploidías de cromosomas acrocéntricos.

Objetivos específicos

- Realizar el cariotipo por bandeado GTG de los padres de abortos y de los productos con aneuploidías de cromosomas acrocéntricos.
- Estimar la frecuencia de TCA en abortos causados por aneuploidías de cromosomas acrocéntricos.

III. JUSTIFICACIÓN

La alta frecuencia de los desbalances cromosómicos es una de las causas más importantes de las malformaciones congénitas, además son responsables de una gran cantidad de síndromes que en conjunto son más frecuentes que todos los trastornos monogénicos mendelianos.

Las aneuploidías se identifican en el: 10% de nacidos muertos, 10% de muertes neonatales, 3-6% de parejas con infertilidad, cerca del 1% en recién nacidos vivos, 2% en las gestaciones de mujeres de 35 años o mayores y 50% de todos los abortos espontáneos del primer trimestre³⁰.

A pesar de la importancia de las aneuploidías se sabe muy poco sobre cómo se originan. Es necesario investigar las causas de este tipo de alteraciones, no sólo por la generación de conocimiento nuevo, sino también porque la identificación de los factores etiológicos permitirá hacer medicina preventiva en este campo.

IV. Tipo de estudio. Se estudia una cohorte de pacientes, es de tipo transversal, observacional y descriptivo.

V. Ubicación del estudio

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Citogenética del Instituto Nacional de Pediatría y las muestras se obtuvieron en colaboración con el Laboratorio Diagen del Hospital ABC.

MATERIAL Y METODOS

VI. POBLACIÓN DE ESTUDIO.

Se incluyeron las muestras de aborto referidas del Laboratorio Diagen (ABC), en el periodo comprendido de enero 2008 hasta junio 2009, que por cariotipo presentaron aneuploidía de alguno o más de un cromosoma acrocéntrico.

Criterios de inclusión.- Se incluyeron en el estudio muestras de abortos con aneuplodías de cromosomas acrocéntricos (ACA), identificadas por cariotipo. Se incluyeron solo aquellas en las que los padres aceptaron participar en el estudio y firmaron carta de consentimiento informado (ver anexo).

Criterios de exclusión.- Se excluyeron aquellas muestras en las que el material biológico no fue suficiente para realizar el análisis de FISH.

Consideraciones éticas

Las parejas que tuvieron abortos con aneuploidía para los cromosomas acrocéntricos se les invitó a participar en el proyecto. Se les planteó el estudio y a aquellas que aceptaron colaborar se les solicitó que firmaran una carta de consentimiento informado y una carta de consentimiento de uso de muestras. Ver cartas anexas.

VII. METODOLOGÍA

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se estudiaron los abortos de muestras de aborto referidas del Laboratorio Diagen (ABC), en el periodo comprendido de enero 2008 hasta junio 2009. De todos los abortos recibidos en este periodo, 22 cumplieron los criterios de inclusión. A cada muestra se les realizó:

1. Cultivo de cada muestra de tejido de aborto.

2. Cariotipo en tejido de aborto por bandas G. De cada muestra se analizaron al menos una metafase por colonia y se cubrió un total de 20 metafases.

3. Cariotipo por bandas G en linfocitos de sangre periférica de los padres de los abortos con aneuploidía de alguno de los cromosomas acrocéntricos. Se analizaron 20 metafases con nivel de resolución de 450-500 bandas por set haploide.

3. A las muestras de abortos se les realizó estudio de citogenética molecular hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH). El FISH se realizó con sondas para los centrómeros de los cromosomas acrocéntricos (13/21, 14/22 y 15). Se analizaron al menos 10 metafases por muestra, en un microscopio de fluorescencia.

4. El análisis de cada muestra se realizó con la ayuda del software ISIS con el cual fue posible la captura de cada fluorocromo utilizado (green, orange, aqua) y la integración de cada fluorocromo en la metafase (bandas DAPI invertidas) y de esta manera determinar la presencia de una posible TCA.

5. Los resultados se consignaron en una tabla con el código de la muestra y con el resultado de la fórmula cromosómica de acuerdo al ISCN 2009 ³¹.

TÉCNICAS DE LABORATORIO

1. CULTIVOS CELULARES.

1.1. Tejido de aborto.

En condiciones de esterilidad y en una caja Petri, los restos embrionarios se seleccionaron y separaron de la decidua (tejido exclusivamente materno), posteriormente se enjuagaron con una solución salina, y con un bisturí se maceró el tejido de forma que las células quedaran lo más separadas posibles, se pasó a frascos de cultivo (falcon), se adicionó medio de cultivo específico a cada cultivo primario correspondiente, e incubaron durante cinco días a 37°C con CO₂. El crecimiento del cultivo se revisó, se cambió el medio de cultivo a las 24 o 72 horas, se observó el desarrollo celular utilizando un microscopio invertido, el material se incubó hasta que se observaron de 8 a 12 colonias grandes con figuras mitóticas (células en división), en éste momento el cultivo fue adecuado para subcultivar. Al subcultivo, se le retiró el medio de cultivo de las cajas falcon, se enjuagó con solución salina, se adicionó 1 ml de solución salina y 1 ml de solución de trabajo de tripsina, se confirmó si hubo desprendimiento celular y se golpeó suavemente la caja falcon cuando fue necesario, se adicionó 6 ml de solución salina y ésta suspensión se pasó a un tubo de centrifuga estéril, se centrifugó 10 min a 1500 rpm, en condiciones de esterilidad se retiró el sobrenadante, se resuspendió con medio de cultivo y se sembró en

cubeobjetos 22x22 mm estériles (como superficie de adherencia celular facilita el levantamiento y lectura) dentro de cajas Petri, a las 24 horas se adicionó medio de cultivo, se incubó aproximadamente cinco días a 37°C con CO₂, el material se incubó hasta que se observaron figuras mitóticas (células en división), en ese momento el cultivo fue adecuado para la cosecha y se detuvo el proceso de mitosis.

2. Cosecha de tejido de aborto.

Se agregó colchicina 0.02mg/ml durante 20 min para detener las células en metafase, se retiró el medio y se agregaron cuidadosamente 3ml de solución hipotónica de citrato de sodio (0.075N) precalentada a 37°C durante 20 min, se prefijaron con siete gotas de solución carnoy (metanol: ácido acético 3:1) durante 2 min, en los tres lavados posteriores se retiró completamente la solución y se agregaron 3ml de fijador carnoy (2 min). Se retiró todo el fijador, se secaron con aire y se rotularon los cubreobjetos en la parte contraria al material. El material obtenido fue distribuido para ser procesado de cariotipo por bandas G y de FISH.

3. Cultivos de sangre periférica.

Las muestras de sangre periférica de los padres de muestras de abortos con aneuploidías para los cromosomas acrocéntricos se procesaron de la siguiente manera.

Cada muestra fue tomada con una jeringa de 3ml con aguja de 22x32 estéril con 0.1ml de heparina de 5,000 u y se sembraron 4 cultivos primarios de la siguiente manera: en un tubo de centrifuga se sembraron 0.5ml de sangre

periférica con 5ml de medio de cultivo McCoy's, 0.005ml de antibiótico y 0.1ml de fitohemaglutinina para promover la proliferación de linfocitos T.

Los cultivos se incubaron a 37° C y a las 48 horas se les agregó 0.02ml de colchicina (0.1mg/ml) para detener a las células en metafase, transcurridas tres horas los tubos se centrifugaron a 1500rpm durante 10min, se retiró el sobrenadante, se resuspendió y se agregaron 10ml de solución hipotónica (KCl 0.075M) precalentada a 37° y se incubaron durante 25 min. Se realizó la fijación agregando 1ml de fijador Carnoy (Metanol/Ácido acético 3:1) y se centrifugó a 1500rpm durante 10min, se retiró el sobrenadante y se agregó fijador Carnoy (8ml aproximadamente). Se hicieron mínimo tres lavados con el fijador.

4. Elaboración de laminillas. Se resuspendió el paquete celular en 0.5 - 1.0 ml de fijador. Se agregaron de dos a tres gotas de fijador carnoy en el centro de un portaobjetos previamente limpio y desengrasado, inmediatamente después, se agregó una gota del paquete celular resuspendido.

a) Para bandas G.- se colocó en una placa aproximadamente a 37-40°C hasta que se seco.

b) Para FISH_- La laminilla se expuso a vapor de agua estéril por pocos segundos para obtener metafases de buena calidad. Se monitorearon al microscopio (10x) y se delimitó la zona con mayor densidad de metafases. Las laminillas fueron elaboradas de uno a tres días antes a la hibridación.

5. BANDEO.

Bandas G. En la técnica de bandas G, el patrón de bandeo se obtiene por digestión proteolítica de los cromosomas al ser tratados con Tripsina y ser teñidos con Giemsa (bandas GTG) esta técnica se utiliza de rutina en los laboratorios de citogenética para el análisis de los cromosomas; el patrón de bandeo se obtiene de acuerdo a la topología propia de cada par cromosómico, las regiones ricas en A-T se observan como bandas oscuras, mientras que las regiones ricas en C-G se observan claras al microscopio, el número de bandas está relacionado con el nivel de condensación del ADN en el cromosoma, así los cromosomas en profase tienen mucho más bandas que los cromosomas en metafase.

El tren de bandeo utilizado estuvo constituido por solución de tripsina al 0.02% solución de buffer gür, colorantes: wright y giemsa y agua corriente para eliminar el exceso de colorante. El tiempo de exposición a la tripsina es variable dependiendo del tipo de muestra, generalmente es necesario de 30seg a 1 min y en los colorantes 1 y 2 min (wright y giemsa).

5.1. El análisis los diferentes cultivos primarios se analizó al menos una metafase por colonia para cubrir un total de 20 metafases por muestra.

5.2. El análisis en linfocitos de sangre periférica se realizó en al menos 20 metafases en cada una de las muestras.

6. FISH CON SONDAS CENTROMÉRICA

Las muestras de abortos fueron procesadas para FISH:

6.1. Pretratamiento

Para la maduración de los cubreobjetos, se introdujeron en solución salina de citratos (2xSSC) a 37°C durante 30 minutos. Se deshidrataron con etanoles graduales de 70, 80 y 100% durante dos minutos en cada solución.

6.2. Digestión con pepsina y fijación.

En 20ml de solución de pepsina precalentada a 37°C, se agregó una alícuota de 50µl de pepsina (Anexo SOLUCIONES).

Los cubreobjetos se sumergieron en la solución de pepsina y se incubaron durante 2-5 minutos dependiendo de la cantidad de citoplasma de cada muestra a 37°C.

Se realizó un lavado en solución salina de fosfatos (PBS 1X) a temperatura ambiente durante 3min. Las muestras se monitorearon y si presentaban restos de citoplasma se sumergían nuevamente en la solución con pepsina al menos dos minutos más.

Se aplicaron 50µl de solución de postfijación (formaldehído/PBS 1X) a cada cubreobjetos en un portaobjetos para facilitar el manejo de las muestras, durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Se retiraron cuidadosamente los cubreobjetos y nuevamente se lavaron con PBS 1x a temperatura ambiente durante 3 minutos. Se deshidrataron con etanoles de concentración creciente (70, 80, 100%) durante dos minutos en cada uno. Posteriormente se dejaron secar a temperatura ambiente durante 5-10 min.

6.3. Codesnaturalización e Hibridación.

Este procedimiento se realizó en la obscuridad debido a que las sondas son directas (fluorocromos conjugados directamente con la sonda).

Se realizó una mezcla de las sondas centroméricas previamente descongeladas y resuspendidas: 1ul de sonda CEP 13/21 conjugada con fluorocromo green (Kreatech), 1ul de sonda CEP 14/22 conjugada con fluorocromo orange (Kreatech) y 0.5ul de sonda CEP 15 conjugada con fluorocromo aqua (Vysis), 1ul de DNA herring y 6.5ul de buffer de hibridación. A cada muestra se le aplicaron 10 µl de mezcla de hibridación, posteriormente se colocó en un portaobjetos.

La codesnaturalización se realizó en el Hybrite a 73°C durante 1.5 minutos, se colocó sellador (cemento iris) en el borde de los cubreobjetos para mantener las condiciones adecuadas de hibridación y se incubaron a 37°C en cámara húmeda y oscura durante 24 horas.

6.4. Lavados Post Hibridación

Se retiró el sellador de los cubreobjetos y se introdujeron en una solución de lavado (0.4xSSC/0.3% Igepal) precalentada en baño maría a 73°C durante dos minutos. Posteriormente se introdujeron en una segunda solución (2xSSC/0.1% Igepal) a temperatura ambiente durante 1 min y se dejaron secar en posición vertical.

6.5. Contratación.

Se realizó con 10 μ l de DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol) (0.125mg/ml) diluido en medio de montaje para fluorescencia Vectashield (Vector, Labs. Inc.), y se colocaron en cubreobjetos.

6.6. Captura de imágenes.

Cada muestra se observó al microscopio (Axiolmager Z1, ZEISS) con el filtro para contratación DAPI, y se tomaron imágenes con los filtros sencillos para cada uno de los fluorocromos (DAPI, FITC, Orange, Aqua). Mediante el software ISIS se integraron las imágenes de cada fluorocromo y se integraron en una sola imagen. Se capturaron al menos 10 metafases por muestra y de cada metafase se construyó el cariotipo por medio de software ISIS (Zeiss). La identificación de las alteraciones se basó en el espectro de hibridación de los centrómeros de cada cromosoma.

6.7. Análisis celular.

Las metafases normales (sin TCA) fueron aquellas que presentaron cuatro señales verdes (sobre los centrómeros de los cromosomas 13/21), cuatro señales rojas (sobre los cromosomas 14/22) y dos señales aqua (sobre los cromosomas 15). Las metafases anormales, es decir, las que presentaron TCA fueron aquellas que al realizar el cariotipo con el programa ISIS presentaron una señal extra de cualquiera de las señales mencionadas sobre alguno de los centrómeros de los cromosomas acrocéntricos, debido a que el programa permite realizar el análisis por bandeo (bandas inversas DAPI) y las

señales de FISH, fue posible confirmar el cromosoma involucrado en la translocación.

VIII. RESULTADOS

Se analizaron 22 muestras de abortos de los siguientes productos: una trisomías 13, dos trisomías 14, seis trisomías 15* cinco trisomías 21*, ocho trisomías 22.

*Un caso fue una trisomía doble, que involucró una trisomía 15 y una 21.

En la tabla 1 se muestra el resultado del cariotipo y de FISH de las muestras analizadas, como puede observarse 20 de las 21 muestras analizadas por FISH con sondas centroméricas para los cromosomas 13/21, 14/22 y 15 se observaron las señales en los centrómeros de los cromosomas correspondientes.

Tabla 1. RESULTADOS DE FISH DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS

Código muestra	Cariotipo	Resultado de FISH
CT1059	47,XX,+13	ish cep13/21(D13Z1x3/D21Z1x2),cep14/22(D14Z1x2/D22Z1x2),cep15(D15Z1x2)
CT 1023	47,XX,+14	ish cep13/21(D13Z1x2/D21Z1x2),cep14/22(D14Z1x3/D22Z1x2),cep15(D15Z1x2)
CT1079	47,XY,+14	ish cep13/21(D13Z1x2/D21Z1x2),cep14/22(D14Z1x3/D22Z1x2),cep15(D15Z1x2)
CT 968	47,XX,+15	ish cep13/21(D13Z1x2/D21Z1x2),cep14/22(D14Z1x2/D22Z1x2),cep15(D15Z1x3)
CT 1035	47,XX,+15	ish cep13/21(D13Z1x2/D21Z1x2),cep14/22(D14Z1x2/D22Z1x2),cep15(D15Z1x3)
CT1086	47,XX,+15	ish cep13/21(D13Z1x2/D21Z1x2),cep14/22(D14Z1x2/D22Z1x2),cep15(D15Z1x3)
CT1089	47,XY,+15	ish cep13/21(D13Z1x2/D21Z1x2),cep14/22(D14Z1x2/D22Z1x2),cep15(D15Z1x3)
CT1101	47,XY,+15	ish cep13/21(D13Z1x2/D21Z1x2),cep14/22(D14Z1x2/D22Z1x2),cep15(D15Z1x3)

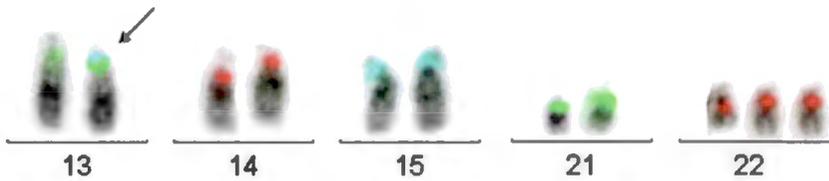
CT 1017	48,XY,+15,+21	ish cep13/21(D13Z1x2/D21Z1x3),cep14/22(D14Z1x2/D22Z1x2),cep15(D15Z1x3)
CT 949	47,XY,+21	ish cep13/21(D13Z1x2/D21Z1x3),cep14/22(D14Z1x2/D22Z1x2),cep15(D15Z1x2)
CT 966	47,XX,+21	ish cep13/21(D13Z1x2/D21Z1x3),cep14/22(D14Z1x2/D22Z1x2),cep15(D15Z1x2)
CT 1539	47,XY,+21	ish cep13/21(D13Z1x2/D21Z1x3),cep14/22(D14Z1x2/D22Z1x2),cep15(D15Z1x2)
CT1091	47,XY,+21	ish cep13/21(D13Z1x2/D21Z1x3),cep14/22(D14Z1x2/D22Z1x2),cep15(D15Z1x2)
CT 1016	47,XY,+22	ish cep13/21(D13Z1x2/D21Z1x2),cep14/22(D14Z1x2/D22Z1x3),cep15(D15Z1x2)
CT 1039	47,XX,+22	ish cep13/21(D13Z1x2/D21Z1x2),cep14/22(D14Z1x2/D22Z1x3),cep15(D15Z1x2)
CT1063	47,XX,+22	ish cep13/21(D13Z1x2/D21Z1x2),cep14/22(D14Z1x2/D22Z1x3),cep15(D15Z1x2)
CT1074	47,XY,+22	ish cep13/21(D13Z1x2/D21Z1x2),cep14/22(D14Z1x2/D22Z1x3),cep15(D15Z1x2)
CT1077	47,XY,+22	ish cep13/21(D13Z1x2/D21Z1x2),cep14/22(D14Z1x2/D22Z1x3),cep15(D15Z1x2)
CT1083	47,XY,+22	ish cep13/21(D13Z1x2/D21Z1x2),cep14/22(D14Z1x2/D22Z1x3),cep15(D15Z1x2)
CT1087	47,XY,+22	ish cep13/21(D13Z1x2/D21Z1x2),cep14/22(D14Z1x2/D22Z1x3),cep15(D15Z1x2)
CT1090	47,XX,+22	ish dic(13;15)cep13/21(D13Z1x2/D21Z1x2),cep14/22(D14Z1x2/D22Z1x3),cep15(D15Z1x2)

Sólo en una de las muestras analizadas se observó una translocación críptica de cromosomas acrocéntricos (figura 1), una muestra de aborto con trisomía 22, sin embargo la translocación detectada no se relacionó con la trisomía del producto, ya que los cromosomas involucrados fueron: 13 y 15, la fórmula cromosómica fue:

47,XX,+22.ish dic(13;15)cep13/21(D13Z1x2/D21Z1x2),cep14/22(D14Z1x2/D22Z1x3), cep15(D15Z1x2).

Figura 1.- TCA identificada en la muestra CT1090, fórmula cromosómica 47,XX,+22 ish dic(13;15)cep13/21(D13Z1x2/D21Z1x2),cep14/22(D14Z1x2/D22Z1x3),cep15 (D15Z1x2).

En la imagen se señala el cromosoma 13 (verde) con señal del cromosoma 15 (aqua).



IX. DISCUSIÓN.

El estudio citogenético de abortos espontáneos es útil en el consejo genético de las parejas involucradas. Se sabe que hasta el 15% de los embarazos clínicamente reconocidos terminan en pérdidas gestacionales, la mayoría de los casos durante el primer trimestre. Las causas están relacionadas con anormalidades: genéticas, anatómicas, endocrinológicas e inmunológicas. Sin embargo más del 50% de los abortos no se asocian con alguna de éstas, considerándose como idiopáticos¹.

Como se ha mencionado antes, las aneuploidías son la principal causa de aborto espontáneo y de anomalías congénitas en nacidos vivos^{1,2,3}, Específicamente, la causa más frecuente es la trisomía de los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22, las aneuploidías de cromosomas sexuales y las poliploidías².

Las trisomías de acrocéntricos representan un grupo de interés particular, no sólo por su relación con las pérdidas fetales, sino porque una parte de los productos son compatibles con la vida, con consecuencias clínicas importantes³.

Por otro lado, los rearrreglos cromosómicos también juegan un papel importante en la generación de gametos aneuploides, el intercambio de material cromosómico entre dos cromosomas dificultan el proceso meiótico produciendo con frecuencia gametos aneuploides. Incluso se ha sugerido que interfieren en la segregación anormal de cromosomas estructuralmente normales, conocido como efecto intercromosómico²⁵.

Las TCA se describieron recientemente como alteraciones estructurales que pueden estar involucradas directamente en la formación de aneuploidías,

específicamente por gametos desbalanceados. Es decir el portador de una TCA podría generar productos anormales con ganancia o pérdida de un cromosoma involucrado en la translocación ²⁹.

Por esta razón en el presente trabajo se propuso la búsqueda de TCA en productos de aborto con aneuploidías de cromosomas acrocéntricos. Se analizaron 22 muestras de tejido de aborto. Todas las muestras incluidas tuvieron un cariotipo con aneuploidía de cromosomas acrocéntricos, una vez confirmado el tipo de alteración se realizó FISH con sondas centroméricas para los cromosomas acrocéntricos 13/21, 14/22 y 15.

De las 22 muestras analizadas de abortos sólo en una se detectó TCA, una trisomía 22 portador de una translocación, es decir, un dicéntrico: dic(13;15). Las 21 muestras restantes no presentaron TCA y con el FISH se confirmó la aneuploidía reportada por cariotipo.

Hasta el momento sólo existe un reporte de una TCA que correlaciona con el origen de la aneuploidía del producto ²⁹, sin embargo no se ha realizado la búsqueda intencionada de éstas alteraciones estructurales. La TCA identificada en nuestro trabajo no coincide con el origen de la aneuploidía, sin embargo, es posible que la aneuploidía provenga del portador de la TCA, de tal manera que podría ser consecuencia de un efecto intercromosómico²⁵.

Por lo mencionado anteriormente, es necesario realizar el FISH para la búsqueda de TCA en los padres y correlacionar tanto el origen parental del cromosoma extra del producto aneuploide mediante técnicas de biología molecular, específicamente con el análisis de microsatélites STR.

La confirmación de que el progenitor de donde surge la aneuploidía es también el portador de la TCA, daría evidencia de que este tipo de rearrreglos

no sólo influyen en los cromosomas involucrados en la TCA, sino también en otros cromosomas como los otros acrocéntricos. Este tipo de cromosomas comparten las secuencias de genes para el RNA ribosomal en la región llamada NOR (por sus siglas en inglés Nucleolar Organization Region), la cual se encuentra inmediatamente por arriba del centrómero y porta cientos de genes de RNAs ribosomales organizados en tandem; estas secuencias son idénticas entre ellas y se asocian en las interfases previas a la división celular, por lo que es probable que la cercanía física de los cromosomas acrocéntricos en el núcleo de la célula meiótica que generará gametos, esté relacionada con el mecanismo por el cual se generan las TCA, ya que cualquier tipo de daño cromosómico que genere ruptura de doble hebra podría resultar en una translocación entre los brazos cortos de los acrocéntricos, lo que puede resultar en cromosomas dicéntricos como los que se encuentran en TCA.

Una vez formada la TCA, el hecho de tener dos regiones centroméricas en un solo cromosoma, podría resultar en un "entanglement" en el momento del apareamiento de regiones homólogas en la profase 1 de meiosis y generar alteraciones en la segregación de los acrocéntricos, esta alteración del orden en el apareamiento podría por mecanismos aún no identificados, influir no sólo en la segregación de los cromosomas involucrados en la translocación, sino también en otros acrocéntricos.

Finalmente, además de determinar la frecuencia de TCA en abortos espontáneos es importante determinar si los padres son portadores de TCA, cabe la posibilidad que los productos no presentaran o heredaran el

cromosoma involucrado en la translocación críptica y que los padres siendo portadores generen productos anormales y se identifiquen como parejas con problemas de fertilidad, o bien con abortos recurrentes.

Determinar la frecuencia de TCA en productos de abortos es importante para correlacionar la presencia de esta alteración y la posible interacción con la formación de aneuploidías, a pesar de que en este trabajo sólo se detectó un caso con TCA no podemos establecer la frecuencia de esta alteración y es recomendable incrementar el tamaño de muestra, así como incluir el estudio de los padres para obtener mayor información sobre el posible efecto de asociación de las TCA con la no disyunción.

El hacer la búsqueda de TCA en parejas con este tipo de productos, es importante para investigar si las TCA's pueden generar en meiosis, figuras meióticas anormales que favorezcan la no disyunción de los cromosomas involucrados o de otros cromosomas y por lo tanto generar gametos desbalanceados y productos anormales ⁸ y de ser así, aunque los padres, posibles portadores de TCA, no tendrían consecuencias fenotípicas, su descendencia podría tener desbalances cromosómicos, con las consecuencias fenotípicas propias de la alteración.

X. CONCLUSIONES.

En este trabajo sólo se detectó una TCA en las 22 muestras analizadas, no podríamos asociar ésta entidad con la no disyunción, sin embargo es importante aumentar la población de estudio para determinar la asociación de TCA con la presencia de aneuploidías de los cromosomas acrocéntricos, así

como realizar la búsqueda de TCA en los padres de las muestras de abortos estudiadas y determinar la frecuencia de los portadores de éstos rearrreglos crípticos en la población con descendencia normal y aneuploide.

I N P
CENTRO DE INFORMACION
Y DOCUMENTACIÓN

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Hodes-Wertz B., Grifo J., Ghadir S., Kaplan B., Laskin C.A, Glassner M., Munne S. 2012. Idiopathic recurrent miscarriage is caused mostly by aneuploid embryos. *Fertil Steril Sep*;98(3):675-80
2. Vorsanova SG., Kolotii A.D., Iourov IY., Monakhov VV., Kirillova EA., Soloviev IV., Yurov YB. 2005. Evidence for High Frequency of Chromosomal Mosaicism in Spontaneous abortions Revealed by Interphase FISH Analysis. *J Histochem Cytochem* 53(3): 375–380.
3. Hassold T, Hunt P. 2001. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2: 280-291.
4. Simpson JL. 2007. Causes of fetal wastage. *Clin Obstet Gynecol* 50:10-30.
5. Gersen S.L., Keagle M. B, 2005. The principles of Clinical Cytogenetics. Human Press. Totowa New Jersey. 2nd Ed. 611p
6. Frias S, Molina B, Rodríguez A, Ramos S, Sánchez S, Villarroel C. 2012. Patología Cromosómica. Ciclo celular, mitosis y meiosis *Genética Clínica*. Ed. Victoria del Castillo, Rafael Uranga y Gildardo Zafra. Manual Moderno

7. Jones KT. 2008. Meiosis in oocytes: predisposition to aneuploidy and its increased incidence with age. *Hum Reprod*, 14:143-158.
8. Penrose, L.S. (1933) The relative effects of paternal and maternal age in mongolism. *J. Genet.* **27**, 219–224
9. Pellestor, F., Andre´ o, B., Arnal, F., Humeau, C. and Demaille, J. (2003) Maternal aging and chromosomal abnormalities: new data drawn from *in vitro* unfertilized human oocytes. *Hum. Genet.* **112**, 195–203
10. Kuliev, A., Cieslak, J. and Verlinsky, Y. (2005) Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human oocytes. *Cytogenet. Genome Res.* **111**, 193–198
11. Henderson, S.A. and Edwards, R.G. (1968) Chiasma frequency and maternal age in mammals. *Nature* **218**, 22–28
12. Brook, J.D., Gosden, R.G. and Chandley, A.C. (1984) Maternal ageing and aneuploid embryos—evidence from the mouse that biological and not chronological age is the important influence. *Hum. Genet.* **66**, 41–45
13. Haadsma, M.L., Mooij, T.M., Groen, H., Burger, C.W., Lambalk, C.B., Broekmans, F.J., van Leeuwen, F.E., Bouman, K. and Hoek, A. (2010) A reduced size of the ovarian follicle pool is associated with an increased risk of a trisomic pregnancy in IVF-treated women. *Hum. Reprod.* **25**, 552–558

14. Eichenlaub-Ritter, U. (1998) Genetics of oocyte ageing. *Maturitas* **30**, 143–169

15. Eichenlaub-Ritter U., Staubach N., Trapphoff T. (2010). Chromosomal and cytoplasmic context determines predisposition to maternal age-related aneuploidy: brief overview and update on MCAK in mammalian oocytes *Biochem. Soc. Trans.* **38**, 1681–1686

16. Hussin J., Roy-Gagnon MH., Gendron R., Andelfinger G., Awadalla P (2011) Age-Dependent Recombination Rates in Human Pedigrees. *PLoS Genetics* www.plosgenetics.org Sep 7(9): 1-9

17. Broman KW, Murray JC, Sheffield VC, White RL, Weber JL (1998) Comprehensive human genetic maps: individual and sex-specific variation in recombination. *Am J Hum Genet* **63**: 861–869.

18. Kong A, Gudbjartsson DF, Sainz J, Jonsdottir GM, Gudjonsson SA, et al. (2002) A high-resolution recombination map of the human genome. *Nat Genet* **31**: 241–247.

19. Donis-Keller H, Green P, Helms C, Cartinhour S, Weiffenbach B, et al. (1987) A genetic linkage map of the human genome. *Cell* **51**: 319–337.

20. Kong A, Thorleifsson G, Gudbjartsson DF, Masson G, Sigurdsson A, et al. (2010) Fine-scale recombination rate differences between sexes, populations and

individuals. *Nature* 467: 1099–1103.

21. Cohen PE, Pollack SE, Pollard JW (2006) Genetic analysis of chromosome pairing, recombination, and cell cycle control during first meiotic prophase in mammals. *Endocr Rev* 27: 398–426.

22. Chowdhury R, Bois PR, Feingold E, Sherman SL, Cheung VG (2009) Genetic analysis of variation in human meiotic recombination. *PLoS Genet* 5: e1000648.doi:10.1371/journal.pgen.1000648.

23. Lamb, N.E., Feingold, E., Savage, A., et al. (1997). Characterization of susceptible chiasma configurations that increase the risk for maternal nondisjunction of chromosome 21. *Hum. Mol. Genet.* 6, 1391–1399.

24. Jones K., Lane. S. (2012). Chromosomal, metabolic, environmental, and hormonal origins of aneuploidy in mammalian oocytes. *Exp Cell Res* 318, 1394–1399.

25. Alfarawati S., Fragouli E., Colls P., Wells D. (2012). Embryos of Robertsonian Translocation Carriers Exhibit a Mitotic Interchromosomal Effect That Enhances Genetic Instability during Early Development. *Plos Genet* Oct 8 (10): 1-9

26. Cockwell AE, Jacobs PA, Beal SJ, Crolla JA. 2003. A study of cryptic terminal chromosome rearrangements in recurrent miscarriage couples detects

unsuspected acrocentric pericentromeric abnormalities. *Hum Genet* 112: 298-302.

27. Gair JL, Arbour L, Rupps R, Jiang R, Bruyère H, Robinson WP. 2005. Recurrent trisomy 21: four cases in three generations. *Clin Genet* 68: 430-435.

28. Frias S, Ramos S, Molina B, Del Castillo V, Mayén DG. 2002. Detection of mosaicism in lymphocytes of parents of free trisomy 21 offspring. *Mutat Res*, 520:25-37.

29. Ramos S, Alcántara MA, Molina B, Del Castillo V, Sánchez S y Frias S. 2008. Acrocentric cryptic translocation associated with nondisjunction of chromosome 21. *Am J Med Genet*, 146A: 97-102.

30. Koochek M, Harvard C, Hildebrand MJ, Van Allen M, Wingert H, Mickelson E, Holden JJ, Rajcan-separovic E, Lewis ME. 2006. 15q duplication associated with autism in a multiplex family with a familial cryptic translocation t(14;15)(q11.2;q13.3) detected using array-CGH. *Clin Genet* 69:124-134.

31. ISCN (2005): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature 2005. Shaffer LG., Tommerup N. (eds.); S Karger, Basel 2005. Recommendations of International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. Karger & Cytogenetic and Genome Research.

XII. ANEXO 1

Carta de consentimiento informado.

Proyecto: Detección de translocaciones crípticas de los cromosomas acrocéntricos en abortos con aneuploidías.

Está usted invitado a participar en el proyecto de investigación cuyo responsable es la Dra. Sara Frias Vázquez. El propósito de la investigación es la búsqueda de un tipo de alteraciones cromosómicas llamadas "translocaciones crípticas de cromosomas acrocéntricos" o TCA, en abortos con alteraciones cromosómicas del tipo ganancia o pérdida de cromosomas. Este estudio servirá para determinar si la presencia de TCA se asocia con las alteraciones encontradas en el producto perdido, esta información es importante para entender las razones por las cuales se pueden tener abortos similares en ustedes en particular y en general en muchas otras parejas.

Es probable que el único beneficio directo por su participación sea el que se pueda recibir un asesoramiento genético sobre el pronóstico reproductivo de la pareja, o que el beneficio sea para otros pacientes con el mismo problema.

En todo momento se guardará la confidencialidad de la procedencia de las muestras, ya que en todos los procedimientos no se manejarán nombres sino códigos de pacientes. Todos los resultados obtenidos de este estudio

serán absolutamente confidenciales y sólo le serán proporcionados a quien usted decida.

Su participación es completamente voluntaria pueden decidir no participar sin que esto repercuta en su relación con el grupo médico ni en la atención que se les brinde. No habrá un costo extra por los estudios y consultas derivadas de este protocolo de investigación.

Cualquier duda podrá resolverla con la Médico Tratante, Dra. Patricia Grether al teléfono 52722521, Laboratorio Diagen, Centro Médico ABC o con la investigadora responsable Dra. SaraFrias al teléfono 10845533, Instituto Nacional de Pediatría.

Consentimiento:

He leído este documento, se me han resuelto las dudas que he tenido y acepto participar en el estudio y recibo copia de este documento.

Lugar y fecha: _____

Nombre y firma del padre: _____

Nombre y firma de la madre: _____

Nombre y firma de un testigo: _____

Carta de consentimiento de uso de las muestras de tejido.

Cada muestra de tejido contiene información genética, esta información puede servir para realizar estudios en los cuales se buscará la presencia de translocaciones crípticas de cromosomas acrocéntricos en la muestra de tejido de su producto abortado.

Si usted está de acuerdo en que se realicen estos estudios, se guardará absoluta confidencialidad y sólo le serán informados los resultados a quien usted decida.

Por favor, circule lo que considere apropiado

Autorizo / No autorizo que se realicen las pruebas genéticas que me han explicado

Autorizo / No autorizo que los resultados de esta prueba se utilicen para hacer la prueba a otros familiares.

Autorizo / No autorizo que el DNA de esta muestra sea almacenado y usado de manera anónima para investigaciones futuras relevantes.

Solicito La destrucción de las muestras utilizadas al finalizar este estudio

Nombre del padre: _____

Nombre de la madre: _____

Firma: _____

Fecha: _____

Médico tratante o Responsable del proyecto

Nombre y firma: _____

Lugar y Fecha: _____

XIII. ANEXO 2.

MATERIAL

REACTIVOS	MATERIAL	EQUIPO
Pepsina (Sigma)	Vasos coplin	Microscopio ZEISS
PBS 1X GIBCO BRL	Tubos eppendorf (1.5-0.5ml)	Hybrite
Formaldehído 37%	Cubreobjetos 22x22mm ² , 24x50mm ²	Equipo Axioscop ZEIS Programa ISIS
Etanol Absoluto (Merck)	Portaobjetos	Potenciómetro
Sonda centromérica 13/21; 14/22 (Kreatech)	Frascos estériles	Baño termostático
Sonda centrmérica 15 (Vysis)	Pinzas	Parrilla eléctrica
20XSSC (Vysis)		
Igepal (Sigma)	Tubos Falcon 50ml	Centrífuga
Agua destilada	Probeta 100ml	Campana de flujo laminar
DAPI	Cronómetro	Incubadora

HCl 37% (Merck)	Pipetas Pasteur	Vortex
NaOH (Merck)	Micropipetas de 10, 100 y 1000 μ l	Refrigerador
Fijador (Metanol/Ác. Acético)	Vaso de precipitados	Congelador
Cemento Iris	Lápiz diamante	
	Termómetro	
Vectashield (Vector)	Puntas para micropipeta	
	Gasas	

XIV. ANEXO 3.

SOLUCIONES

FIJADOR CARNOY

Preparar la cantidad necesaria de Metanol:Ácido acético en proporción 3:1

SOLUCIÓN 20XSSC

Disolver 66g de 20XSSC en 200ml de agua destilada.

Ajustar pH a 5.3 con HCl 1N y aforar hasta 250 ml con agua destilada.

SOLUCIÓN 2XSSC

360 ml de agua estéril

40 ml de solución 20XSSC

Ajustar pH a 7.0

HCl 1N

Diluir 8ml de HCl 37% en

92 ml de agua destilada.

NaOH 1N

Disolver 4g de NaOH en

100 ml de agua destilada

PEPSINA

Disolver 50mg de pepsina en

2.5 ml de agua destilada

Almacenar en alícuotas de 50 μ l

SERIES DE ETANOL

1.- Etanol 100%: 50ml de etanol 100%

2.- Etanol 80%: 40ml de etanol y 10ml de agua destilada

3.- Etanol 70%: 35ml de etanol y 10ml de agua destilada

SOLUCIÓN POST FIJACIÓN

60 μ l de formaldehído 37% en 2ml de PBS 1X

SOLUCIÓN 0.4XSSC 0.3% IGEPAL

2ml 20XSSC

0.3ml Igepal

95ml agua destilada.

Colocar en vaso de precipitado de 100 ml. Ajustar pH entre 7-7.5. Aforar a 100 ml. Precalear a 74°C media hora antes de su utilización.

SOLUCIÓN 2XSSC 0.1% IGEPAL

10ml 20XSSC

0.1ml Igepal

80 ml de agua destilada.

Colocar en vaso de precipitado de 100 ml. Ajustar pH entre 7-7.5. Aforar a 100 ml.

MEDIO DE CULTIVO PARA LINFOCITOS.

100 ml de medio McCoy's /RPMI 1640

2 ml de fitohemaglutinina

1 ml de estreptomycin-penicilina

10 ml de suero fetal bovino (10%) (Opcional)

En condiciones de esterilidad preparar el medio de cultivo y mantenerlo en refrigeración. Para cada cultivo, tomar 4.5 o 5 ml de medio y agregar 0.5 ml de sangre heparinizada. El medio se puede alicuotar en los tubos de centrifuga y congelarlos hasta unas horas de ser utilizados.

SOLUCIÓN HIPOTÓNICA (0.075 M)

2.796 gr. KCl.

500 ml agua destilada.

En un matraz aforado, colocar el agua y añadir el KCl mezclar hasta disolver. Tomar solo lo necesario cada cosecha y mantener a 37°C hasta su uso más tarde, se puede alicuotar en frascos de vidrio y almacenar a temperatura ambiente hasta unas horas antes de su uso.

SOLUCIÓN DE COLCHICINA

Solución de colchicina stock de 1 mg/ml.

Solución de trabajo de colchicina. Hacer una dilución 1:10 (colchicina: isotónica). Tomar 0.1 ml y diluir en 1 ml con solución isotónica.

BUFFER SORENSEN

6.63 gr. KH_2PO_4

2.56 gr. Na_2HPO_4

1000 ml de agua destilada

Se mezclan todos los reactivos y se mantiene a temperatura ambiente.

BUFFER GURR

1000 ml de solución fisiológica.

1 pastilla de buffer GURR

Se coloca la pastilla dentro de la solución fisiológica y se disuelve, ajustar a pH 7.2.

TRIPSINA

0.015 gr. de tripsina

0.01 gr. de EDTA

50 ml de buffer GURR

Disolver la tripsina y el EDTA en el buffer GURR, ajustar pH a 7 (con bicarbonato de sodio al 7.5%) y mantener a temperatura ambiente. Utilizar la solución fresca.

COLORANTE GIEMSA

Solución stock

1 gr de giemsa

66 gr. de glicerol

132 ml de metanol

Calentar el glicerol a 60°C, colocar en un mortero, agregar el colorante, para disolverse, después de un tiempo colocar en una estufa a 60°C durante 30 minutos, retirar y seguir moviendo hasta disolver completamente (en general se mete 2 o 3 veces en la estufa para disolverse bien) dejar enfriar y añadir 132 ml de metanol, finalmente se mantiene en agitación durante 2-3 hrs. Conservar a temperatura ambiente en un frasco ámbar.

Solución de trabajo

10 ml de Giemsa (solución stock)

40 ml de buffer Sorensen

COLORANTE WRIGHT

Solución stock

0.8 gr. de wright

480 ml de metanol

Coloca el colorante en un mortero y disolver poco a poco con alícuotas de metanol, una vez que esté disuelto, se afora al volumen final y se mantiene en agitación continua (48h), conservar en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

Solución de trabajo

20 ml. de Wright (solución stock)

30 ml de buffer sorensen.

MEDIO DE CULTIVO PARA LÍQUIDO AMNIOTICO Y CULTIVO DE TEJIDOS.

100 ml de medio AMNIOMAX

2 ml de fitohemaglutinina

1 ml de antifun

Preparar el medio de cultivo en condiciones de esterilidad y mantenerlo en refrigeración hasta tomar lo necesario 4.5 o 5 ml de medio para 0.5 ml de líquido amniótico, se puede alicuotar en tubos de centrifuga y congelarlos hasta unas horas de ser utilizados.

I N P
CENTRO DE INFORMACION
Y DOCUMENTACIÓN