**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**SECCIÓN A: DATOS GENERALES**

**1.- TÍTULO O NOMBRE DEL PROYECTO**

Caracterización citogenética de niños con Síndrome de Down del Centro de Educación Básica Especial de Acción Conjunta “Sagrada Familia.”, del Distrito La Esperanza – Trujillo, 2017.

**2.- Línea de investigación:**

Citogenética

**3.- Unidad Académica la que pertenece el proyecto**.

 Servicio de Biología Molecular, Citogenética y Reproducción Asistida

**4.-** **Equipo Investigador:**

**Investigador principal:**

Dra. Katherine Lozano Peralta

Docente Ordinaria de la Facultad Medicina Humana

Jefa de Centros de Salud

Co-Investigador:

Dra. Patricia Contreras Vera

Directora del Servicio de Biología Molecular, Citogenética y Reproducción Asistida - UPAO

**5.-** **Institución o lugar donde se ejecutará el proyecto**

Servicio de Biología Molecular, Citogenética y Reproducción Asistida – J 607 - Universidad Privada Antenor Orrego

**6.- Duración de la Ejecución del proyecto**

**Fecha de Inicio:** 02 de Noviembre del 2017

**Fecha de término:** 30 de Marzo del 2018

**SECCIÓN B: PLAN DE INVESTIGACIÓN**

**1.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

Cuáles son las fórmulas cariotípicas que caracterizan a los niños con Síndrome de Down del Centro de Educación Básica Especial de Acción Conjunta “Sagrada Familia”, Trujillo 2017?

**2.- ANTECEDENTES DEL PROBLEMA**

El síndrome de Down (DS) se origina en la mayoría de los casos (95%) por una trisomía libre del cromosoma 21. Los casos restantes se deben al mosaicismo del cromosoma 21 o a la herencia de un reordenamiento estructural que conduce a una trisomía parcial de la mayoría de su contenido. Se presenta con una frecuencia de 1 en 800.000 habitantes, incrementándose con la edad materna1,2.

Asimismo, estudios realizados en Chile, reportaron que al analizar una población de 257 pacientes, 56,4% varones, con diagnóstico clínico de síndrome de Down, a los que se les realizó estudio citogenético 14 (5,4%) tenían cariotipo normal y 243 (94,6%) trisomía 21. De estos últimos, 225 (92,6%) correspondían a trisomía 21 libre, 10 (4,1%) a mosaicos, 8 (3,3%) a translocaciones3.

Por otro lado, en Cuba, realizaron un análisis citogenético a 142 pacientes con síndrome de Down, resultando el 89,2 % con trisomía libre y el 7,8 % translocaciones4.

En México, de 510 pacientes confirmados con síndrome de Down, 445 (87.3%) presentaron trisomía libre; 22 (6.3%), translocación robertsoniana; y 43 (8.4%), mosaico5.

Por tanto, la caracterización citogenética del Síndrome de Down tiene gran relevancia para establecer el consejo genético apropiado para la mejora de la calidad de vida y la integración social de los pacientes con esta afección.

**3. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO**

El presente proyecto pretende complementar el diagnóstico integral de los niños con síndrome de Down con la finalidad de brindar consejería genética y reproductiva mejorar la calidad de vida y prevenir la aparición de nuevos casos.

**4. OBJETIVOS**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Objetivo General****(Propósito del proyecto )** | **Resultados Finales** | **Medios de Verificación** |
| Caracterizar citogenéticamente a los niños con Síndrome de Down del Centro de Educación Básica Especial de Acción Conjunta “Sagrada Familia”, Trujillo 2017. | **R1:** Cariotipo y diagnóstico citogenético.  | **MV1:** Elaboración de cariotipo mediante el uso del software Case Data Maneger. |
| Objetivos Específicos(Componentes) | Resultados Intermedios: | Medios de Verificación |
| 1 | 1. Establecer la frecuencia de los diversos tipos de trisomía.
2. Realizar consejería genética y reproductiva a los padres de los niños con Síndrome de Down del Centro de Educación Básica Especial de Acción Conjunta “Sagrada Familia”.
 | **P1**: * Determinar la frecuencia de niños Down con trisomía 21 libre.
* Determinar la frecuencia de niños Down con mosaicismo.
* Determinar la frecuencia de niños Down portadores de translocación robertsoniana.
 | **MV1:**  - Mediante bandeo G y análisis estadístico. |
| **P2:**. Evaluar cada caso para determinar qué tipo de asesoría necesita cada familia. | **MV2:**- Participación activa de los padres de familia en las charlas educativas donde firmarán carta de consentimiento informado para realizar el estudio citogenético propuesto. |

**5. MARCO TEÓRICO**

El Síndrome de Down es una enfermedad genética que constituye la primera causa de retraso mental2.

Desde el punto de vista citogenético, el SD puede producirse por: 1) trisomía 21 libre (95%), 2) mosaicismos (2-4%), 3) traslocación robertsoniana (2-4%) y 4) otros reordenamientos estructurales (<1%)6.

**1. Trisomía 21 libre**: Esta constitución se observa en el 95% de los SD. Existen tres copias libres del cromosoma 21, en vez de las dos normales y su ocurrencia está en función de la edad materna. El cariotipo se informa como 47, XY +21 si es varón o 47, XX +21 si es mujer (puede figurar entre corchetes la cantidad de metafases analizadas).

En alrededor del 95% de los casos, a través de estudios del ADN, se ha determinado que el cromosoma 21 extra es de origen materno por no disyunción (separación) cromosómica durante la meiosis materna (75% durante el primer ciclo de la meiosis o meiosis I) 7,8. De esta forma, el óvulo contendría dos copias del cromosoma 21 (en vez de lo normal que sería una copia única). La tercera copia es aportada por el espermatozoide.

Esta anomalía ocurre con más frecuencia en las edades maternas avanzadas (35 años o más).

La causa cierta de este fenómeno aún se ignora y existen diferentes teorías al respecto. Una de las más aceptadas refiere que la no disyunción estaría relacionada con un menor intercambio de cromátides (o recombinación) durante la meiosis8.

Este hecho se observa con mayor frecuencia a medida que avanza la edad de la madre.

Mediante estudios del ADN ha podido establecerse que, en sólo alrededor del 5% de los casos, el cromosoma 21 extra es de origen paterno9,10.

**2. Mosaicismos:** Es la presencia de 2 o más líneas celulares con diferente constitución cromosómica en un mismo individuo.

En alrededor del 2- 4% de los casos clínicamente detectados como SD, se observan dos líneas celulares: una normal y otra con T21 libre. Los mosaicismos no son privativos de la T21: pueden ocurrir con cualquiera de los diferentes tipos de anomalías cromosómicas7, 9.

El cariotipo por mosaicismo de T21 se informa como 47, XY +21/46, XX (cariotipo femenino) o 47, XY+21/ 46, XY (cariotipo masculino).

Se ha establecido que los mosaicismos de T21 pueden originarse de dos formas:

Meióticos: la concepción fue trisómica, pero durante los ciclos de división celular posteriores se origina una línea celular que pierde la copia extra del cromosoma 21. Se estima que la mayoría de los casos de SD en mosaico responden a este origen, que estaría vinculado con la edad materna.

Mitóticos: aquí la concepción es cromosómicamente normal, pero en algún momento de las sucesivas divisiones celulares ocurre la no disyunción, durante la mitosis, y se origina la línea trisómica7,9.

El fenotipo que presentan los mosaicismos de T21 puede ser muy variable; depende del porcentaje y distribución tisular de las células trisómicas.

Se asume que, en los casos de mosaicismo, puede haber un espectro fenotípico continuo que abarca desde la persona con rasgos normales (en estos casos puede detectarse por el antecedente de tener más de un hijo afectado por T21 o durante un estudio cromosómico efectuado por otros motivos) hasta aquellos que presentan la expresión casi completa del síndrome.

**3. Translocación robertsoniana (Trb):** Se denomina translocación robertsoniana a la fusión de dos cromosomas acrocéntricos por su centrómero, con pérdida del material satélite de sus brazos cortos (esta pérdida no implica repercusiones clínicas ya que los brazos cortos están compuestos por ADN redundante). Se forma así un cromosoma compuesto por los brazos largos de los cromosomas fusionados.

En estos casos, una copia del cromosoma 21 está adosada a un cromosoma del grupo D (13-14-15) o bien a uno del grupo G (21-22).

Este tipo de alteración estructural se observa en alrededor del 2-4% de los casos de SD y la más frecuente es la Trb (14; 21)11.

No se ha encontrado vinculación entre estas anomalías y la edad materna2.

Las translocaciones pueden ser de origen familiar (alguno de los padres la porta en forma balanceada) en alrededor del 50% de los casos, o de “novo”, es decir no heredadas. En este último caso, los cariotipos parentales son normales.

La translocación 21 con un cromosoma del grupo D responde a un origen familiar en el 45% de los casos, mientras que la que involucra al grupo G se observa en el 4% 2.

Cuando se menciona a una Trb de tipo familiar, significa que uno de los progenitores presenta una de las dos copias del cromosoma 21 adosado por su centrómero a otro cromosoma de los grupos mencionados.

Como se trata de un reordenamiento balanceado, pues no falta ni sobra material cromosómico (la pérdida de los brazos cortos por la fusión de centrómeros no implica un desbalance), esta persona es fenotípicamente normal y se denomina “portador sano”, pero posee un riesgo elevado para su descendencia con respecto a un individuo sin translocación, ya que puede generar gametas desbalanceadas.

**6. HIPÓTESIS:**

La fórmula cariotípica de trisomía en el par 21 libre es la más frecuente.

**7. METODOLOGÍA**

**7.1.- Charla Motivacional a docentes y padres:**

Se realizará charlas informativas para poder despertar el interés inicialmente a los docentes y luego a los padres para que una vez motivados participen activamente en el proyecto pues estarán convencidos que será en beneficio de sus hijos y de su familia el método a utilizarse será exposición diálogo.

**7.2.- Elaboración de Cariotipo12:**

**7.2.1.- Toma de muestra de sangre:**

Se obtendrá sangre venosa (aproximadamente 5mL) de 100 donantes en un tubo de extracción al vacío Vacuette® con heparina sódica; dichos donantes firmarán una carta de Consentimiento Informado, así mismo se le entregará de manera confidencial el resultado de su análisis.

 **7.2.2.- Siembra de las muestras de sangre.**

Las muestras de sangre obtenidas se sembrarán en frascos para cultivo con 10 ml de medio de cultivo RPMI 1640 (GIBCO). Se colocarán 0.8 ml de sangre (13 gotas) en condiciones de esterilidad. Los tubos se etiquetarán con el nombre del donante y se incubarán, en posición horizontal, por 72 horas a 37°C en una incubadora.

 **7.2.3.- Cosecha de linfocitos.**

Pasadas las 72 horas, se sacarán los tubos de la incubadora y a cada uno se le adicionará 200ul de colchicina; las muestras se volverán a incubar por 30 minutos a 37°C para detener las células en metafase.

Transcurridos los 30 minutos, se centrifugará a 10000 rpm por 10 minutos. Se eliminará el sobrenadante y se agregará lentamente y con agitación 10 ml de una solución de Cloruro de Potasio (0.075M) y se incubará por 20 minutos a 37°C.

Pasados los 20 minutos, a cada tubo se le agregará 1 ml del fijador Carnoy (metanol-ácido acético 3:1). Se resuspenderán las muestras con pipetas Pasteur; se incubará por 20 minutos a 4ºC.

Después se centrifugará por 10 minutos a 10000rpm para eliminar todos lo eritrocitos. Este procedimiento se realizará las veces necesarias hasta que el botón celular sea blanco.

**7.2.4.- Elaboración de las laminillas de linfocitos.**

Se elaborarán las preparaciones tomando una pequeña cantidad de material del tubo, previamente resuspendido con la pipeta. Se dejarán caer tres o cuatro gotas del material celular sobre la superficie de un portaobjetos limpio. Las preparaciones se dejarán secar a temperatura ambiente en posición inclinada.

**7.2.5.- Tinción de las laminillas.**

Las laminillas se colorearán por 20 minutos en un vaso coplin con colorante Giemsa. Posteriormente se lavarán con agua destilada y se dejarán secar a temperatura ambiente.

**7.2.6.- Tren de bandeo para Bandas G.**

Se preparará:

I. Un vaso coplin con 50 ml de solución salina (NaCl, 0.9%).

II. Un vaso coplin con 50 ml de solución salina y 2ml de tripsina (pH=8). Para ajustar el pH se utilizará una solución de bicarbonato de sodio (7.5%).

III. Un vaso coplin con agua destilada.

IV. Un vaso colplin con colorante Giemsa preparado.

V. Un vaso coplin con agua destilada.

Las laminillas que serán sometidas al tren de bandeo se madurarán previamente dejándolas deshidratar por 24 horas a 60oC. Se colocarán en el vaso coplin con solución salina por 1 minuto; después, se introducirán al vaso que contenía tripsina por 1:30 minutos; posteriormente, se enjuagarán en agua destila y después se teñirán en el colorante (Giemsa) por 20 minutos; finalmente se enjuagarán con agua destilada y se dejarán secar.

**7.2.7.- Elaboración de Cariotipo:**

Se elegirán seis metafases por muestra y se hará el cariotipo con ayuda del software del Cariotipador Olympus.

**8.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Pérez Chávez Diego Alberto. Síndrome de Down. Rev. Act. Clin. Med. Accedido: 2017 Oct 02. Disponible en:

http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S2304-37682014000600001&lng=es.

1. Girirajan S. Parental-age effects in Down syndrome. J Genet. 2009;88:1-7.
2. Astete A. Carmen, Youlton R. Ronald, Castillo T. Silvia, Be R. Cecilia, Daher N. Vera. Clinical and cytogenetic aspects in 257 cases of Down's syndrome. Rev. Chil. Pediatr. 62 (2); 99-102, 1991
3. Pimentel Benítez Héctor Ignacio, García Borrego Aniorland, Cuesta Nelson Martín, Alonso Barba Yanelis, Torres Palacios Milagros, Suárez Mayedo Ursulina. Cytogenetic Prenatal Diagnosis in Camagüey. Results of 20 years of work. Rev Cubana Genet Comunit 2008;2(3) 34-38
4. Garduño-Zarazúa Luz María, Giammatteo Alois Lucila, Kofman-Epstein Susana, Cervantes Peredo Alicia. Prevalence of mosaicism for trisomy 21 and cytogenetic variant analysis in patients with clinical diagnosis of Down syndrome: a 24-year review (1986-2010) at the Servicio de Genética, Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”. Bol Med Hosp Infant Mex 2013;70(1):31-36
5. Kaminker Patricia, Armando Romina. Síndrome de Down. Primera parte: enfoque clínico-genético. Arch Argent Pediatr 2008; 106(3):249-259
6. Epstein CJ. Down syndrome (trisomy 21). En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Chills B, Kinzler KW and Vogelstein B, eds. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8th ed. Nueva York: McGraw-Hill; 2001. Págs. 1223-1256.
7. Fernández, M, P. Síndrome de Down. Alteraciones anatómicas y fisiologías que repercuten en la comunicación, lenguaje y el habla. Programa de intervención logopedia. 2011. URL disponible en: http://www.csi-csif.es/andalucia/modules/mod\_ense/revista/pdf/Numero\_43/PILAR\_FERN ANDEZ\_MARTINEZ\_1.pdf. Accedido: 29 de setiembre 2017
8. Antonarakis SE, Petersen MB, McInnis MG, et al. The meiotic stage of nondisjunction in trisomy 21: Determination using DNA polymorphisms. Am J Hum Genet 1992; 50:544-550.
9. Morichon-Delvallez N. Citogenética prenatal. 2006. Elsevier Masson SAS. E – 5-031-A-15
10. Azevedo Moreira L.M., Damasceno Espirito Santo L. y Fernandes Lacerda Carvalho A. Síndrome de Down hereditario poco común debido a la translocación robertsoniana 15/21: asesoramiento genético y reproductivo. Rev Med Int Sindr Down. 2013;17(3):36-38
11. Rodríguez AR. (2005). “Manual de prácticas de genética y cuaderno de trabajo”. 1ª Edición. UNAM. México. pp. 80,155

**ANEXOS**

**Cronograma de trabajo**.

|  |  |
| --- | --- |
| **ACTIVIDAD** | **MESES** |
| **NOVIEMBRE** | **DICIEMBRE** | **ENERO** | **FEBRERO** | **MARZO** |
| REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA |  |  |  |  |  |
|  |
| ELABORACIÓN DEL PROYECTO |  |  |  |  |  |
|  |
| CAPTACIÓN DE DATOS |  |  |  |  |  |
| PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS |  |  |  |  |  |
|
| ELABORACIÓN DEL INFORME FINAL |  |  |  |  |  |

**CUADRO Nº 1: Recursos Humanos - Valorización del equipo Técnico**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Nombre** | **Escuela o Unidad a la que pertenece** | **% de dedicación** | **Honorario mensual** | **Nº de meses** | **Costo total S/.** |
| **Especialista Externo:** Especialista en Citogenética cuyas funciones consistirán en:* Validación de protocolo de Toma de Muestra.
* Validación de protocolo de Cultivo de Linfocitos.
* Validación de protocolo de Cosecha de Linfocitos.
* Validación de protocolo de Bandeo G.
* Validación de resultados citogenéticos.
* Emisión de resultados citogenéticos.
* Charlas motivacionales e informativas al personal administrativo y docente del Centro de Educación Básica Especial de Acción Conjunta “Sagrada Familia.”
* Charlas motivacionales e informativas los padres de familia del Centro de Educación Básica Especial de Acción Conjunta “Sagrada Familia.”
* Consejería genética y asesoría familiar.
* Asesoría en elaboración de material informativo, trípticos y periódico mural.
* Revisión del informe final del proyecto de investigación.
 |  | 30% (10 horas semanales) | 4.000 | 5 | 20,000 |
| **TOTAL:** | **20,000** |

 **CUADRO Nº 2: Material e insumos**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Descripción** | **Costo unitario** | **Cantidad** | **Costo total S/.** |
| Metanol absoluto. Frasco x 4L | 140.00 | 1 | 140,00 |
| Tubo de extracción al vacío con heparina sódica. Paquete x 100 unid | 65.00 | 2 | 130,00 |
| Aguja para tubos de extracción al vacío | 46.00 | 2 | 92,00 |
| Pipetas Pasteur descartables | 0.50 | 200 | 100,00 |
| RPMI 1640. Frasco x 1L | 344.00 | 2 | 688,00 |
| Fitohemaglutinina. Frasco x 10ml | 240.95 | 3 | 722,85 |
| Colcemid. Frasco x 20ml | 283.00 | 3 | 849,00 |
| Tips Estéril Sin Filtro 100- 1000 Ul | 32.00 | 5 | 160,00 |
| Tips Estéril Sin Filtro 20 - 50 Ul | 32.00 | 5 | 160,00 |
| Adaptador para sistema al vacío VACUTAINER (Standard holder) - BRAND | 5.00 | 3 | 15,00 |
| Tubo Centrífuga de Polipropileno, Fondo cónico tapa rosca Graduado no estéril x 15 ml. Pack x 50 und | 40.00 | 4 | 160,00 |
|  **TOTAL:** | 3,216.85 |

**CUADRO Nº 3: Insumos para material didáctico e informativo**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Descripción** | **Costo unitario** | **Cantidad** | **Costo total S/.** |
| Papel bond A4 75g Atlas  | 15.00 | 4 | 60,00 |
| Bolígrafos Faber Castell | 2.50 | 6 | 15,00 |
| Corrector Artesco  | 2.50 | 2 |  5,00 |
| Plumón indeleble azul Faber Castell | 2.50 | 4 | 10,00 |
| Impresión b/n papel A4 | 1.00 | 100 | 100,00 |
| Impresión color papel A4 | 0.20 | 100 | 200,00 |
| Anillado de informes. | 10.00 | 10 | 100,00 |
| Cartulinas de colores | 1.00 | 36 | 36,00 |
| Corrospún de colores | 1.00 | 36 | 36,00 |
| Tijeras | 5.00 | 2 | 10,00 |
| Plumones de colores para papel  | 2.00 | 6 | 12,00 |
| Plumones para pizarra | 3.50 | 6 | 21,00 |
| Goma | 1.00 | 5 | 5,00 |
| Impresión de Trípticos a colores | 0.20 | 150 | 30,00 |
| Periódico mural | 100.00 | 1 | 100.00 |
|  |  |  |  |
| **TOTAL:** | **650,00** |

**CUADRO Nº 4: Refrigerio**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Descripción** | **Costo unitario** | **Cantidad** | **Costo total S/.** |
| Empanadas y bebidas (gaseosa, café), que serán repartidos durante las charlas motivacionales e informativas al personal administrativo, docente, padres de familia y niños del Centro de Educación Básica Especial de Acción Conjunta “Sagrada Familia.” | 2.333 | 150 | 349.95 |
|  **TOTAL:** | 349.95 |

**CUADRO Nº 5: RESUMEN DEL PRESUPUESTO**

|  |  |
| --- | --- |
| **Descripción** | **Costo total S/.** |
| Recursos Humanos - Valorización del equipo Técnico: Asesoría y Consejería | 20,000.00 |
| Material e insumos | 3,216.85 |
| Insumos para material didáctico e informativo | 650,00 |
| Refrigerio | 349.95 |
| TOTAL: | **24,216.80** |

|  |
| --- |
|  |