



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA**

HOSPITAL DE PEDIATRIA

CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS.

***DEPARTAMENTO CLINICO DE GENETICA MÉDICA**

****UNIDAD DE INVESTIGACION MÉDICA EN GENÉTICA HUMANA**

**“DETECCION DE REARREGLOS CRIPTICOS EN PACIENTES CON
RETRASO MENTAL Y DEL DESARROLLO MEDIANTE PRUEBAS DE
CITOGENÉTICA MOLECULAR”**

Tesis de Especialidad de Genética Médica

TUTORES

DR. FABIO SALAMANCA GOMEZ**

DRA. MA ANTONIETA DE JESUS ARAUJO SOLIS*

DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA*

PRESENTA

DRA. MARIA DEL CARMEN PALACIOS REYES

MÉDICO RESIDENTE TERCER AÑO GENETICA

DEDICATORIA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A Alejandro
por el concepto, el color y las figuras que vives y me compartes; por estos siete años en
los que has creído en mí y en nosotros, en los que me has acompañado y animado.

A mi padre
que tuvo el acierto y la inteligencia de ver y de actuar en la vida, por heredarnos un
espíritu de crecimiento.

A mi madre,
por lo mucho que nos ha dado, por la enseñanza de lucha por su familia y por el amor
sin condiciones que me ha brindado.

A Jorge
un gran pilar por mucho tiempo y que persiste.

A Victoria
por su fortaleza.

A Guadalupe
por sus momentos de buen humor y por la bondad de su corazón.

A Horacio
por su búsqueda constante.

A Humberto
por su sentido del humor y tenacidad.

A Alma Delia
por su perseverancia que la mayoría de las veces califico de terquedad.

A Sonia
por su valentía y su corazón noble.

A Pedro
por sus sueños y su alegría.

A Emmanuel†
por tu hermoso recuerdo, nunca olvidaré cuando expresaste tu deseo de gritar a la madre
Meche, a lo que ella asintió, y te imagino con la ternura de un niño de 9 años gritando
a la puerta de tu salón de clases; y no se me olvida tu regalo de esa navidad
(se que querías unos tachones).

A Blanca
por tu gran sonrisa y tu chispa.

A toda mi familia
por su compañía, su confianza, su apoyo en las crisis que he vivido, por haber apoyado
mi formación hasta hoy como especialista en Genética Médica.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Diego
por el ser humano que es, la flexibilidad y la paciencia que ha tenido.

A la Dra. Araujo
por su tiempo e interés en este trabajo, por buscar lo mas perfectible, así como por la
confianza que siempre ha depositado en mí.

Al Dr. Salamanca
por su calidad de ser humano, por enriquecernos con su experiencia, por su apoyo en la
residencia para nuestra formación como médicos genetistas y realización de tesis.

Al Dr. Coral
por sus enseñanzas y su entusiasmo que contagia.

A todo el personal del laboratorio
que me orientaron en uno o mas aspectos durante la realización de este proyecto.

Al personal de citogenética
por su paciencia y sus enseñanzas.

A Don Antonio
por su generosa colaboración en este trabajo.

A todos mis maestros
que me brindaron herramientas para terminar este proyecto.

A Saúl
por saber ser equipo durante toda la residencia.

A la vida
que al abrir una puerta descubre otras más.

A los pacientes y sus familias que participaron en este estudio.

ÍNDICE

1. ANTECEDENTES	6
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
3. JUSTIFICACION	12
4. PREGUNTA DE INVESTIGACION	13
5. HIPOTESIS	13
6. OBJETIVO GENERAL	14
7. OBJETIVOS SECUNDARIOS	14
8. SUJETOS MATERIAL Y METODOS	15
9. FACTIBILIDAD Y ASPECTOS ETICOS	29
10. RECURSOS	29
11. RESULTADOS	30
12. DISCUSION	38
13. CONCLUSION	44
14. BIBLIOGRAFIA	45
15. ANEXO 1. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO	48
16. ANEXO 2. HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS	50

RESUMEN

Introducción: El retraso mental (RM) y el retraso en el desarrollo son la causa más frecuente de consulta en genética médica (46% de casos vistos en un año en consulta externa). Con frecuencia se acompañan de anomalías congénitas y el estudio clínico no siempre integra un síndrome conocido. Dentro de las causas de retraso mental se encuentran las anomalías cromosómicas, las entidades monogénicas y aquellos casos de etiología adquirida. Sin embargo en el 40-50% de casos no se identifica una causa dado que el cariotipo convencional es normal. Con el avance en la resolución de las técnicas de citogenética molecular se identifican rearrreglos crípticos en grupos de pacientes con retraso mental hasta en el 16% de los casos, bien sea acompañado o no de malformaciones congénitas, con lo cual es posible asesorar a la familia con mayor precisión en cuanto a la causa y el riesgo de recurrencia.

Objetivo: Búsqueda de rearrreglos crípticos en pacientes del HP CMN S XXI con retraso mental y dismorfias. Estudiar a las familias de los pacientes en los que se identifiquen.

Hipótesis: Los pacientes con RM y defectos congénitos presentan rearrreglos crípticos con una frecuencia mayor al 5%. Estos pueden estar presentes en la familia en aproximadamente el 10% de los casos.

Material y métodos: Utilizando 2 técnicas de citogenética molecular (CGH y CESH) en la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana se identificarán los rearrreglos críptico en niños consecutivos en consulta externa de Mayo del 2005 a Abril del 2006, con RM y más de dos defectos congénitos, (que cuenten con evaluación del RM por parte de psicología, estudio citogenético normal, y en los que no se haya determinado causa secundaria de RM), de 6 meses hasta de 16 años 11 meses. Se contó con consentimiento bajo información por escrito a los padres o tutores y fue aprobado por los Comités de Investigación y Ética del Hospital.

Resultados: De 11 pacientes incluidos, se detectó un rearrreglo críptico, correspondiente a delección de la región terminal del brazo largo del cromosoma 8 (q24.3), que representa el 9%.

Discusión y Conclusión: La región cromosómica involucrada comprende una serie de repetidos que incluyen a los asociados a telómero, sitios que favorecen la recombinación homóloga no alélica o la reparación por unión de extremos no homólogos, mecanismos que favorecen los rearrreglos cromosómicos. Comprende varios

genes que intervienen en desarrollo. Se continua con el mismo proyecto. Se realizará estudio familiar para descartar que algunos de los padres sea portador.

ANTECEDENTES

El Retraso mental (RM) se refiere a la discapacidad humana permanente que inicia antes de los 18 años de edad, caracterizada por déficit en las habilidades adaptativas y cognitivas. La Asociación Americana de Retraso Mental lo define como una “limitación importante en el desempeño actual caracterizada por una función intelectual significativamente por debajo del promedio, coexistiendo con limitación en dos o más áreas de habilidades adaptativas como son: comunicación, autocuidado, vida en casa, habilidades sociales, desenvolvimiento en la comunidad, autodirección, salud y seguridad, desempeño académico, pasatiempo y trabajo”¹.

Se determinan cuatro grados: profundo (0-20 puntos), grave (21-35), moderado (36-50) leve (51-70) y el coeficiente intelectual limítrofe (71-85) según los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Manual Estadístico de Enfermedades mentales (DSM-IV) para coeficiente intelectual¹.

Se considera retraso en el desarrollo a aquel que afecta el dominio de dos o más habilidades (área motora gruesa, lenguaje-discurso, cognición, social-personal y actividades cotidianas) sin ser sinónimo de retraso mental debido a que las pruebas para determinar el coeficiente intelectual (CI) no son confiables en niños menores de cinco años¹⁻³.

Si se toma en cuenta la gravedad del retraso, el porcentaje de la población general afectada por retraso leve se desconoce. La prevalencia del retraso puede variar dependiendo del grupo humano, de las edades biológicas que se estudian y de la presencia o ausencia de malformaciones asociadas⁴. En el servicio de genética médica, el 46% de los pacientes evaluados presentan retraso mental, y en alrededor de 30 pacientes en forma anual, no se detecta la causa (comunicación personal Araujo, Huicochea, Palacios).

La posibilidad de encontrar una explicación de la presencia de RM en un individuo puede asociarse al puntaje de CI que nos refleja el grado de discapacidad. Cuando es

leve, el 30% de casos muestran anomalías cromosómicas o factores ambientales asociados; cuando es moderado a grave,

el 30-40% de ellos tienen anomalía cromosómica o monogénica. Por último, en casi la mitad de los casos con retraso grave y hasta en el 70% de casos leves no se tiene un factor etiológico identificado⁴.

Como puede apreciarse, la causa del retraso es muy variada; puede ser adquirida mediante insultos ocurridos durante el embarazo, parto o después del nacimiento, y por lo regular existe el antecedente, el cual se investiga durante el interrogatorio dirigido. Sin embargo no siempre puede confirmarse y en muchos casos surge la necesidad de descartar las causas primarias, intrínsecas al producto y cuya influencia inicia desde la concepción.

El RM primario se convierte en un reto porque el espectro de posibilidades es muy amplio y la investigación necesaria para conocer la causa es extensa. Para determinar la etiología es útil echar mano de todas las herramientas clínicas y paraclínicas que sean de ayuda:

- La historia clínica, interrogando los antecedentes que puedan orientarnos a una causa adquirida o hereditaria¹⁻⁶.
- La exploración física, en busca de anomalías morfológicas que con mucha frecuencia nos hacen sospechar un síndrome conocido, ya sea cromosómico o mendeliano. El examen dismorfológico es relevante ya que la asociación entre RM y anomalías morfológicas es frecuente. Se informa que un recién nacido con defectos morfológicos tiene 27 veces más riesgo de retraso mental comparado con recién nacidos sin éstos defectos⁵. Por otra parte, entre el 39.4 al 81.9 % de los pacientes con RM, presentan al menos dos dismorfias que orientan al diagnóstico¹.
- El examen neurológico, que proporciona pistas para sospechar una anomalía del desarrollo del sistema nervioso central¹.
- Los estudios neurorradiológicos, que confirman o descartan dichas anomalías¹.
- El tamiz metabólico, que detecta los padecimientos metabólicos hereditarios y que representan el 1% de los casos con retraso. Debido a la baja frecuencia de estos

padecimientos en la población general, este estudio solo está indicado en presencia de datos que apoyen esta etiología¹.

- Los estudios moleculares para X frágil, que representan el 2% de casos con RM.
- El estudio citogenético, que puede reportar anomalías hasta en un 40 % de los casos. Debido a que las alteraciones cromosómicas son frecuentes en los pacientes con malformaciones congénitas, es obligado solicitar un cariotipo convencional como parte de la estrategia de abordaje y estudio de primera elección en los pacientes que acuden a un servicio de genética¹³.

En la figura 1, se muestra un esquema del abordaje diagnóstico en los pacientes con retraso mental.

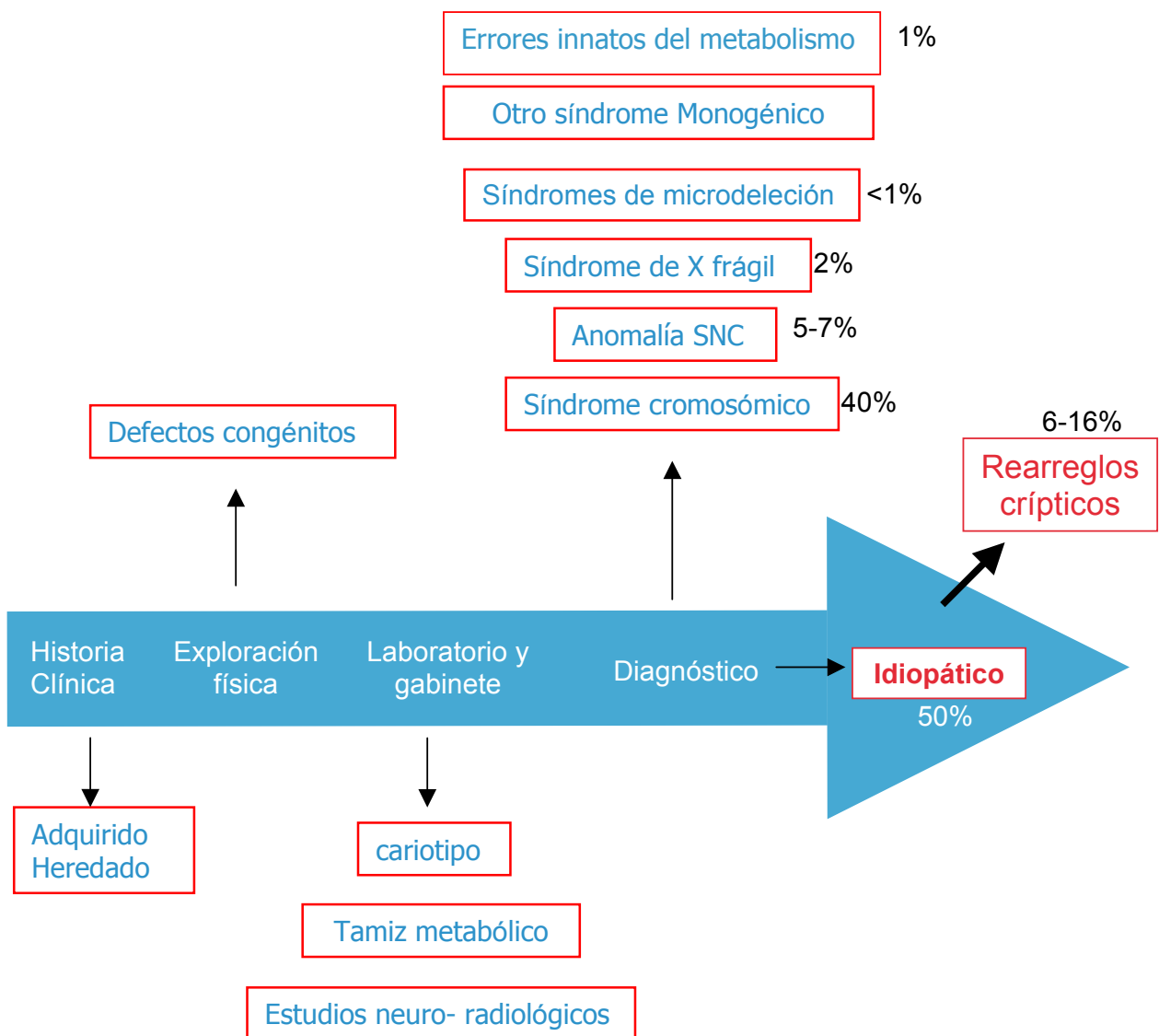


Figura 1. Ruta diagnóstica en los pacientes con Retraso Mental.

La mayoría de anomalías cromosómicas son visibles con un cariotipo convencional (resolución de 550 bandas), o bien, se cuenta con el cariotipo de alta resolución que cuenta con mayor resolución (4-5 Megabases), sin embargo, hay reportes de rearrreglos que no se detectan, por lo que se les ha denominado crípticos (menores de 5 Mb). La proporción de rearrreglos cromosómicos detectados por técnica habitual está en relación con el grado de retraso mental, de tal manera que a mayor grado, mayor es la probabilidad de detectar rearrreglos, y aumenta si se agregan más de dos dismorfias, así como si hay antecedentes familiares¹⁻⁶. Esto quiere decir que el análisis de rearrreglos crípticos en pacientes con RM no seleccionados puede reportar un bajo número de casos, pero incrementa de acuerdo con criterios de selección que incluyan la presencia de dismorfias, y aun más con antecedente familiar de retraso mental¹.

En 1989, por medio de análisis de DNA e hibridación *in situ*, Lamb⁸ informó por primera vez la presencia de rearrreglos crípticos no balanceados en dos hermanos con RM y cuyo cariotipo de alta resolución era normal. Los rearrreglos resultaron estar localizados en las regiones subtelo méricas (justo por debajo de los extremos de los cromosomas). Estas regiones se encuentran en el sitio de transición entre los extremos de los cromosomas llamados telómeros y las secuencias del resto del cromosoma, y tienen una densidad génica alta. Es por ello que las anomalías en estos sitios producen con mayor frecuencia alteraciones fenotípicas en comparación con aquellas localizadas en otras partes del genoma. El mecanismo de origen propone que los rearrreglos (duplicaciones, deleciones, translocaciones) ocurren con cierta frecuencia durante la recombinación (meiosis I), o por recombinación mitótica (en caso de reparación); y se debe a la alta homología que existe entre las secuencias subtelo méricas de varios cromosomas no homólogos y, al hecho de que el apareamiento durante la meiosis se inicia en los telómeros⁹⁻¹². También hay que tomar en cuenta que el rearrreglo puede ser *de novo* en el paciente, o bien ser heredado en el caso de que uno de los padres sea portador de un rearrreglo balanceado.

Con el avance de los métodos de citogenética molecular, hay evidencia que muestra pérdidas submicroscópicas (crípticas) en regiones subteloméricas hasta en el 17% de aquellos casos en los que la etiología del RM se desconoce. La gran mayoría de pacientes con rearrreglos subteloméricos, con o sin malformaciones asociadas, tienen un cariotipo convencional normal, por lo que en los recientes algoritmos para diagnóstico etiológico de RM se ha propuesto la búsqueda de anomalías en estos segmentos. Algunos de los métodos de citogenética molecular que se han utilizado para este fin son la hibridación fluorescente *in situ* (FISH por sus siglas en inglés, *Fluorescent In Situ Hybridization*) y la Hibridación Genómica Comparativa (CGH por sus siglas en inglés, *Comparative Genomic Hybridization*)^{10,23}. De las técnicas utilizadas para el estudio de rearrreglos crípticos, el cariotipo de alta resolución es barato, reproducible y puede detectar anomalías de hasta 4-5Mb pero no siempre es útil para detectarlos^{2,12}.

Un ejemplo es el estudio francés con técnica de FISH en 150 niños con RM idiopático que mostró una proporción de rearrreglos del 10% (14 niños) y en tres de los cuales se observó deleción 1pter¹⁵⁻¹⁸. Además, se han informado casos con rearrreglos que tienen agregada una trisomía o monosomía parcial en otro cromosoma, por lo que hay cada vez más evidencia de la necesidad de estudiar todo el genoma en busca de anomalías asociadas a cualquier tipo de deleción subtelomérica¹⁹⁻²².

Ghaffari y col.²³, demostraron su presencia mediante un análisis con CGH modificado en 5 pacientes de 3 familias con el antecedente de RM.

La CGH es una técnica modificada del FISH que permite el análisis de todo el genoma y la detección de pérdidas y/o ganancias de secuencias de DNA entre un genoma normal y uno anormal, con una resolución de hasta 3 Mb cuando es de alta resolución. El análisis del patrón de hibridación determinado por la intensidad fluorescente, permite definir pérdidas o ganancias de [material hereditario y determinar con gran precisión los genes que se encuentran en el segmento afectado](#)²³⁻²⁸. En el 2001, de Vries y cols. utilizaron esta técnica para estudiar a 29 pacientes con RM y defecto subtelomérico ya confirmado y concluyeron que su sensibilidad y especificidad aumenta en pacientes con anomalías congénitas en número mayor o igual a tres.⁷

Una variante de la CGH es la hibridación comparativa de secuencia expresada (CESH por sus siglas en inglés, *Comparative Expressed Sequence Hybridization*), un método

abordaje de la expresión de genes en donde el principio es emplear como sondas de hibridación el RNA total. El análisis de los resultados se realiza de igual forma a la descrita en el CGH y su ventaja es que discrimina con mayor resolución el segmento anormal.²⁹

Hasta el momento no hay estudios en donde se utilice esta técnica en casos con retraso mental y sospecha de rearrreglos subteloméricos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el trabajo diario del genetista se atiende un alto número de pacientes por retraso mental y psicomotor, muchos de los cuales no se confirma una etiología, esto hace necesario conocer la frecuencia de rearrreglos crípticos en esta población, además del número de casos familiares y el estado de portadores de progenitores en los casos detectados con rearrreglos crípticos.

JUSTIFICACION

En el servicio de genética del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, el retraso mental constituye hasta el 46% de los diagnósticos en los casos vistos en consulta externa (Comunicación personal Palacios, Huicochea y Araujo). Una proporción de estos pacientes tienen asociadas anomalías congénitas que no integran un síndrome conocido y que a menudo hace sospechar de una etiología cromosómica, pero su cariotipo convencional es normal. Dado que el determinar la etiología del retraso mental tiene implicaciones en el individuo afectado, en la familia y en la sociedad y que durante el asesoramiento genético una de las principales preocupaciones de los padres de un niño afectado es conocer el riesgo de recurrencia y la posible causa de la afección, es importante contar con los beneficios de estudios detallados y específicos que ayuden a conocer la etiología del retraso mental del paciente, y como consecuencia orientar el plan de intervenciones médicas de vigilancia de las posibles complicaciones asociadas y la planeación de la educación sin el gasto en pruebas y valoraciones innecesarias. Con el estudio se espera poder proporcionar información precisa y confiable a los padres durante el asesoramiento genético respecto a riesgos de recurrencia. Por otra parte, es de resaltar la trascendencia del estudio en función de la oportunidad que brinda para la identificación de rearrreglos crípticos diferentes de los encontrados en otros grupos humanos, que pudieran contribuir de manera importante en la identificación de nuevas regiones cromosómicas y genes que no han sido asociados a la etiología del retraso mental.

PREGUNTA DE INVESTIGACION

1.- ¿Existen rearrreglos crípticos en pacientes pediátricos con retraso mental y anomalías congénitas atendidos en la consulta externa de genética médica del HP CMN S XXI?

HIPOTESIS

Los pacientes de la consulta externa de Genética Médica del HP CMN S XXI, con RM y defectos congénitos presentan rearrreglos crípticos con una frecuencia mayor al 5%, y el 10% de estos pueden estar asociados a rearrreglos presentes en la familia.

OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Objetivo General

- 1- Determinar la existencia de rearrreglos crípticos en pacientes pediátricos consecutivos con RM y con defectos congénitos mediante las pruebas de citogenética molecular: CGH y CESH.

Objetivos Secundarios

1. Estudiar a las familias de los pacientes en los que se identifiquen rearrreglos.

SUJETOS, MATERIAL Y METODOS

LUGAR

1. Laboratorio de Biología molecular de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana del HP CMN S XXI.
2. Consulta externa del servicio de Genética Médica del HP CMN S XXI.

DISEÑO

Tipo de estudio

1. Por su maniobra: Observacional.
2. Por la medición del fenómeno en el tiempo: Transversal.
3. Por la presencia de un grupo control: Descriptivo

Grupos De Estudio

Criterios de inclusión

1. Niños y niñas de 6 meses a 15 años 11 meses.
2. Con RM idiopático leve a severo.
3. Con defectos congénitos.
4. Evaluación previa del grado de retraso por el servicio de Psicología.
5. Previo estudio citogenético convencional sin alteraciones.
6. Tamiz metabólico normal.
7. Consentimiento bajo información del progenitor o tutor.

Criterios de exclusión

1. Retraso mental secundario.

Criterios de eliminación

1. Muestra inadecuada (coagulada o insuficiente), y que no sea posible obtener una nueva muestra.

Tamaño de la muestra

Se estimó estudiar a los pacientes que acudieran al servicio de genética durante el periodo correspondiente a Mayo del 2005 a Abril del 2006. Se estudió a 11 pacientes.

Muestreo

Pacientes consecutivos de la consulta externa de Genética Médica.

Definición de variables

⊗ Independientes:

1. Rearreglo críptico

⊗ Dependientes:

1. Retraso mental

En la tabla 1, se muestran las variables, la definición conceptual y operacional, así como la clasificación.

DEFINICION Y TIPO DE VARIABLES

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE
REARREGLO	Ganancia o pérdida de material hereditario observado por diferencias en el color de la fluorescencia en cromosomas en metafase.	Ganancia: Proporción de 1.25 o mayor Pérdida: 0.75 o menor Normal: Mayor de 0.75 y menor de 1.25	CUALITATIVA ORDINAL
RETRASO MENTAL O DEL DESARROLLO	Discapacidad humana permanente que inicia antes de los 18 años de edad, caracterizada por déficit en las habilidades adaptativas y cognitivas. Afección del dominio de dos o más habilidades (área motora gruesa, lenguaje-discurso, cognición, social-personal y actividades cotidianas)	LEVE CI 51-70 puntos MODERADO CI 36-50 puntos GRAVE A PROFUNDO CI 0-35 puntos Leve, Moderado y Severo de acuerdo a evaluación por Psicología.	CUALITATIVA ORDINAL

Tabla 1. Definición de variables, tipo y concepto.

DESCRIPCION GENERAL DEL ESTUDIO

PROCEDIMIENTOS CLINICOS

Pacientes

Se informó e invitó a participar en el estudio a los padres de los niños, quienes firmaron la carta de consentimiento informado. Se realizó una historia clínica y exploración física en forma detallada para determinar los defectos morfológicos presentes. Se incluyeron a 11 pacientes.

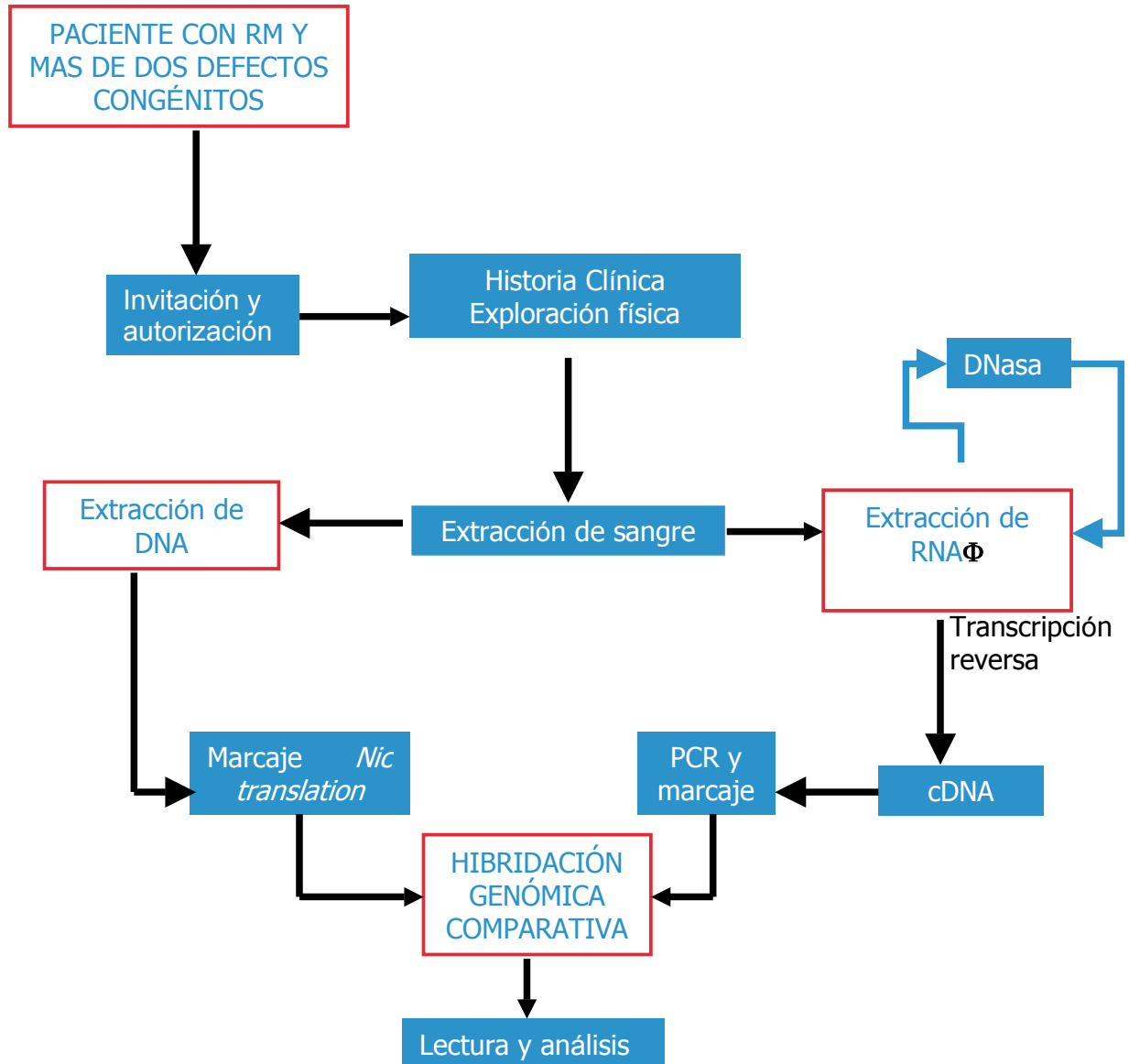


FIGURA 2. Diagrama de flujo de trabajo desde que se capta al paciente hasta el análisis.

ΦEn este trabajo, se obtuvieron las muestras de RNA pero no se procesaron en los siguientes pasos.

PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO

SANGRE PERIFÉRICA

Extracción y colección de sangre periférica

A través de punción en vena periférica se obtienen 8 ml de sangre periférica, y se divide inmediatamente al colocarlo en tubos BD vacutainer TM K3 de etilen diamino tetra acetato al 0.5% (EDTA) de 5 ml, (con 3ml y 5ml respectivamente). Se homogenizó la sangre con el EDTA y se procedió al aislamiento de RNA y de DNA.

EXTRACCIÓN DE DNA

Obtención del DNA

A partir de 1 a 3 ml de sangre periférica colocados en tubos de 5ml que contenían 500µl de etilen diamino tetra acetato al 0.5%(EDTA) como anticoagulante, la mezcla se centrifugó por 20 minutos a 3.5 Krpm. por minuto . Se recuperó la capa de glóbulos blancos de la fase intermedia mediante succión, se colocaron en un tubo Eppendorf y se agregaron 500 ul de RCLB (XX) para lisar los eritrocitos mezclados con los glóbulos blancos. La muestra se agitó y centrifugó 5 minutos a 4 Krpm. y se desechó el sobrenadante; este proceso se realizó en total dos o tres veces hasta obtener la pastilla blanca.

La pastilla se resuspendió con 180 ul de NaCl 5 mM, se agitó vigorosamente, se adicionaron 80 µl de SDS al 10 por ciento, para lisar la membrana nuclear de los leucocito. La mezcla se agitó suavemente por 5 minutos y se agregó 615 µl de NaCl saturado, se homogeneizó y centrifugó 10 minutos a 10 Krpm. Se recuperó el sobrenadante en un nuevo tubo Eppendorf, desechando la pastilla de con los restos celulares. Se adicionaron al DNA de la fase acuosa dos volúmenes de etanol al 100% y se agitó suavemente, para precipitar el DNA. Se centrifugó 3 minutos a 10 Krpm., se decantó el sobrenadante y se lavó dos veces con 500 µl de etanol al 70%, se agitó hasta

separar la pastilla obtenida por la centrifugación. Posteriormente se dejo secar la pastilla a temperatura ambiente hasta evaporarse el etanol, para finalmente resuspender en 100 µl de agua hasta disolver en DNA. Se almacenaron las muestras a -20 °C hasta su uso.

Determinación de la integridad del DNA

Se determinó la integridad en gel de agarosa al 1% en TBE 1X (Tris-base 89 mM, ácido bórico 89mM y EDTA 2mM) con 5 μ l de bromuro de etidio. Una vez terminada la electroforesis se observó el gel en un transiluminador de UV de onda corta y se tomaron las imágenes con el sistema de cómputo de Alphamager 2000.

Se determinó la concentración de DNA por espectrofotometría para cada una de las muestras obtenidas, leyendose a longitudes de onda de 260 y 280 nm, asumiendo que una densidad óptica equivale a 50 μ g/ml. (Figura 3)

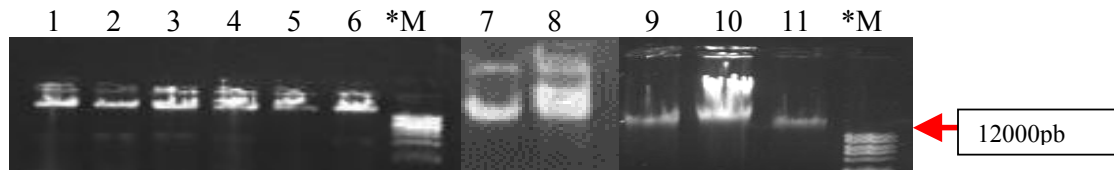


Figura 3. Gel de electroforesis del DNA íntegro obtenido de las muestras. El número se refiere a la muestra por paciente.
*M: marcador de peso molecular.

EXTRACCIÓN DE RNA

Obtención de RNA total

Se extrajeron 4 ml de sangre periférica y previamente colocados en un tubo de 5ml. que contenía 500 μ l EDTA como anticoagulante. Se diluyó con 1 volumen de PBS 1X (*Phosphate Buffer saline*). Se colocaron en un tubo de cristal de 13x10mm, 3ml. de Fycoll_plaqueTM PLUSy cuidadosamente sobre este 5 ml de sangre ya diluída sin que se mezclaran, se centrifugó por 30 minutos a 1.6 Krpm. con la finalidad de separar los componentes de la sangre. Se extrajo el paquete de células de la capa intermedia entre el plasma y los glóbulos rojos para colocarlo en un tubo de microcentrifuga,

manejando todos los procesos a partir de este momento en hielo, se adicionó 1ml de PBS, se homogenizó y se centrifugó por 10 minutos a 1.2 Krpm. a 4°C. Se decantó el sobrenadante, se agregó 1 ml. de trizol y 12.5ml de glicógeno, posteriormente se homogeneizó y se mantuvo a 4°C por 5 minutos. Se agregaron 20 μ l de cloroformo, se

homogeneizó y se colocó a 4°C por otros 5 minutos. Se centrifugó por 15 minutos a 10 Krpm. Se recuperó en un tubo nuevo la fase superior, se agregaron 550µl de etanol, se agitó y se colocó a 4°C por 15 minutos, para posteriormente centrifugar 15 minutos a 4°C a 1° Krpm. Se eliminó el etanol y se agregaron 1000 µl. de etanol al 80%, se mezcló y centrifugó por 5 minutos a 6 Krpm.. Se eliminó el etanol, se colocó a 45°C por 3 minutos y posteriormente a temperatura ambiente hasta evaporarse todo el etanol. Se agregaron 22 µl de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) y se homogeneizó. Se almacenó a -20°C.

Determinación de la integridad de RNA total

Se colocaron 50µl de TBE 1X (Tris-base 89 mM, ácido bórico 89mM y EDTA 2mM) y 1 g. de agarosa grado molecular, se fundió la agarosa a 50°C aproximadamente. Se agregaron 5 µl de bromuro de etidio (concentración 1microg/ml) y se homogeneizó. Se agregó amortiguador TBE hasta cubrir ligeramente los pozos, se cargan 2 µl de muestra mezclada con 1 µl de azul de bromoxifeno (6X). Se separan los ácidos nucleicos mediante 70 volts durante 120 minutos. Se visualizó el gel a través del transiluminador de luz ultravioleta de onda corta y se toman las imágenes con el sistema de cómputo de Alphamager 2000. (Figura 4)

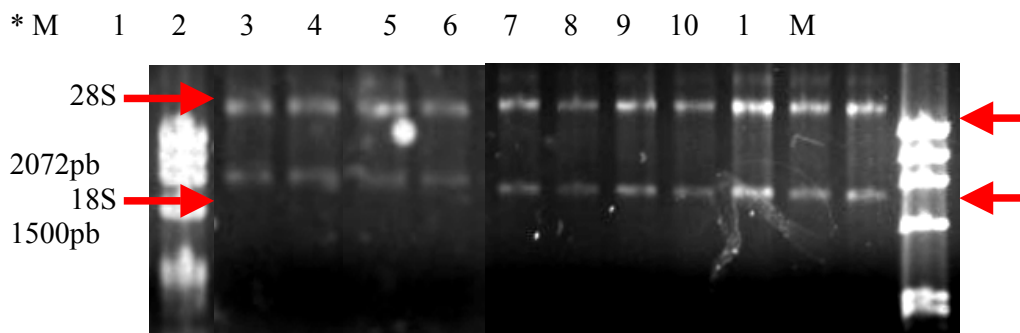


Figura 4. Electroforesis del RNA. El número se refiere a la muestra por paciente.
*M: marcador de peso molecular.

Cuantificación de RNA con espectrofotómetro

Para todas las muestras obtenidas, se determinó la concentración de DNA por espectrofotometría, leyéndose a longitudes de onda de 260 y 280 nm. asumiendo que una densidad óptica equivale a 40 µg/ml. Se partió de una alícuota de RNA total (2µl) mezclada con 98 µl de agua y se colocó en una celdilla.

HIBRIDACION GENOMICA COMPARATIVA

Marcaje (*nick translation*)

La reacción se llevó a cabo combinando 1 µg de DNA, 2.5 µl dUTP-biotina de *SpectrumGreen* (en el caso de DNA del paciente) o de dUTO-digoxigenina *SpectrumRed* (en el caso del control) 0.2mM, 5µl de dTTP 0.1 mM, 10µl de dNTPs 0-1mM, 5 µl de buffer para nick translation 10X (Tris-Hcl 500mM, ph 7.2, MgSO₄ 100mM, DTT 1mM), 7 µl de enzima (del kit para CGH 32-801023 de Vysis), ajustando con agua un volumen de 50 µl. Esta mezcla se agitó brevemente, y se incubó a 15°C por 40 minutos para generar las sondas de DNA. Se paró la reacción inactivando la enzima con calor (70°C) por 10 minutos. Posteriormente se almacenó a -20°C.

Se obtuvieron sondas de DNA de 400 a 1800 pb aproximadamente, que se corroboró por electroforesis en gel de agarosa al 1%. (Figura 5)

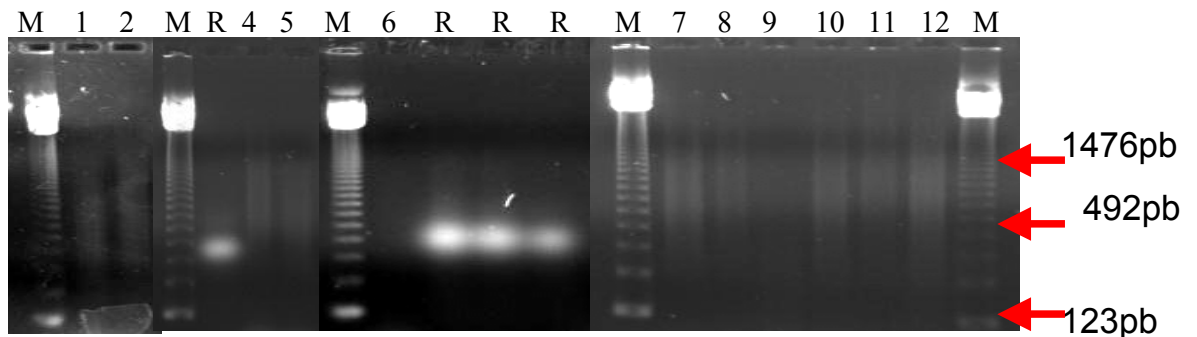


Figura 5. Detalle del tamaño de las sondas de DNA marcado.
R: Sondas de DNA de referencia (sano). M: Marcador de peso molecular.

Mezcla de sondas de referencia y del paciente

En un tubo para microcentrífuga, las sondas de DNA del paciente (prueba) y del control (referencia) se mezclaron en igual concentración, 200 ng de cada uno, y se mezclaron con 10 µg de DNA-cot1 humano, 0.1 volumen de acetato de sodio 3M, y 2.5 volúmenes de etanol al 100%, se mezcló brevemente y se incubó en hielo durante 15 minutos para precipitar al DNA. Posteriormente se centrifugó por 30 minutos a 12 Krpm. Se decantó el sobrenadante y se secó la pastilla a temperatura ambiente. Se resuspendió la pastilla en 3µl de agua bidestilada y 7 µl de buffer de hibridación para CGH (del kit para CGH 32-801023 de Vysis).

Hibridación en metafases.

Se utilizaron laminillas con metafases de individuos sanos del sexo masculino, adquiridas en Vysis.

En la laminilla se marcó el área de la metafase con un lápiz con punta de diamante. Se colocó en solución desnaturalizante (49 ml. de formamida, 7ml de SSC 20X, y 14 ml. de agua purificada mezclados) por 4 minutos a una temperatura de 73°C. Las laminillas se pasaron posteriormente por 2 minutos en alcohol al 70, 85 y 100% en cada uno, para deshidratarlas. Se aireó y se dejó secar. Se agregó 10µl de la mezcla de sondas sobre la metafase y se colocó cubreobjetos se selló la periferia con cemento. Se colocaron en una caja húmeda y se mantuvieron a 37°C por 72 horas, hasta el lavado.

Lavado de laminillas

Se colocaron las laminillas en solución de lavado (SSC0.4X/NP-40 0.3%) previamente calentado en baño maría a 74°C al menos 30 minutos. Se retiró el cemento de las laminillas, se colocó en esta solución agitandolas 3-5 segundos y finalmente permanecienco ahí dos minutos. Se colocó la

laminilla en una segunda solución de lavado (SSC2X/NP-40 0.1%) a temperatura ambiente, agitando i

nicialmente 3-5 segundos y posteriormente se dejó 1 minuto en esa solución. Se sacó la laminilla y sobre esta, se realizó un goteo de agua inyectable con micropipeta, se aireó y se dejó secar a 40-50°C.

Visualización de la hibridación

Finalmente se agregaron 13 ul de DAPI (diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol) sobre cada metafase, se colocó encima un cubreobjetos y se selló con cemento. Se almacenaron a -20°C para su uso posterior uso.

Las laminillas se visualizaron con el microscopio de fluorescencia, inicialmente con el objetivo 40X y posteriormente con el de 100X (con aceite de inmersión), teniendo cuidado de no exponer la laminilla por tiempo prolongado a la luz. Con el software Quips® Genetic Imaging se seleccionaron de 15 a 20 metafases por paciente, se capturó la imagen con los filtros que permiten visualizar los fluoróforos usados en la hibridación, para ver la contratinción, el *SpectrumRed* y el *SpectrumGreen*.. Un cuarto filtro permite simultáneamente detectar los tres colores.

Se clasificaron los cromosomas de cada una de las metafases de acuerdo al grupo realizando un cariógrama de acuerdo a la contratinción del DAPI II, que proporciona un patrón de bancas GTG.

Interpretación y Análisis

Se conjuntaron los datos de cada una de las metafases analizadas de cada paciente, realizándose por medio del software un promedio de la proporción de la hibridación entre las sondas marcadas con *SpectrumGreen* (DNA del paciente) y *SpectrumRed* (DNA de referencia): Esto se basa en un a proporción del color verde/rojo, con valores en un intervalo menor a 1.25 y mayor a 0.75 para lo normal, un proporción mayor a 1.25 para ganancias de material cromosómico (predominio del verde sobre el rojo) y una proporción menor de 0.75 para pérdidas del material cromosómico (predominio del rojo sobre el verde).

A continuación se ilustran imágenes de la interpretación y análisis de la CGH.

Al iniciar el análisis se observaron las metafases de las laminillas. En la figura 6, se muestra un ejemplo de las metafases, con un patrón de bandeado GTG (que se obtuvo a partir de contrateñir con DAPI), para poder realizar la clasificación de cromosomas.

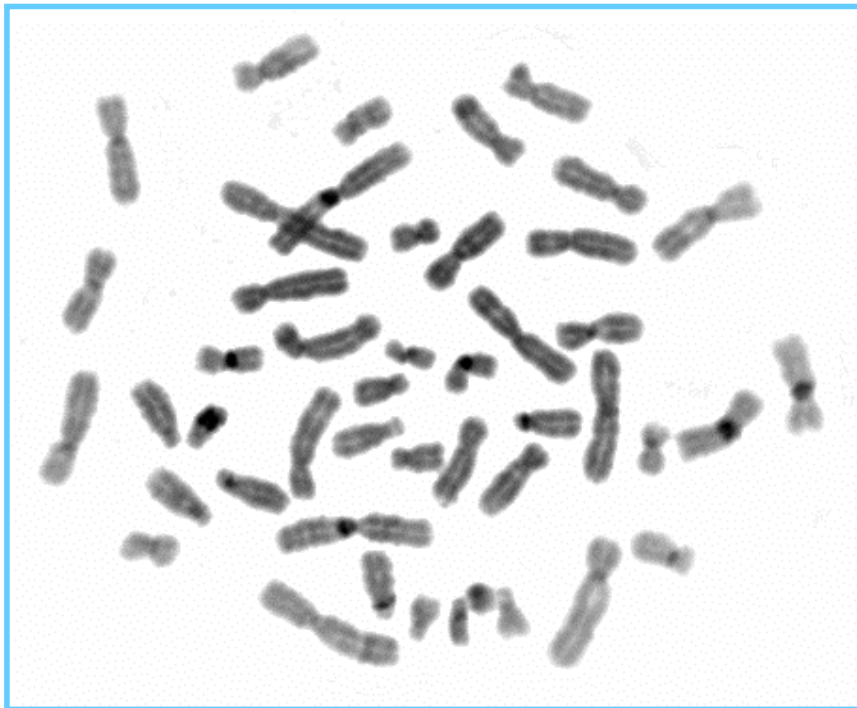
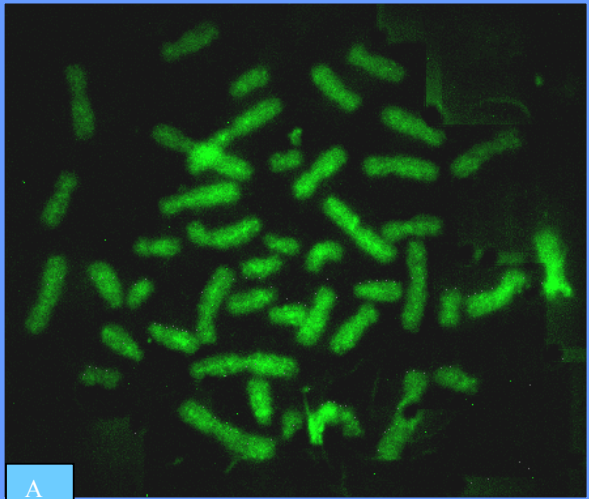


Figura 6: Metafase con patrón de bandas GTG. Esta imagen corresponde a metafases hibridadas con DNA del paciente 4.

El sistema de filtros del microscopio, permite visualizar la hibridación en forma independiente para las diferentes sondas, en este caso del DNA del paciente en color verde y en rojo para el DNA del control sano. (Figura 7)



A

B

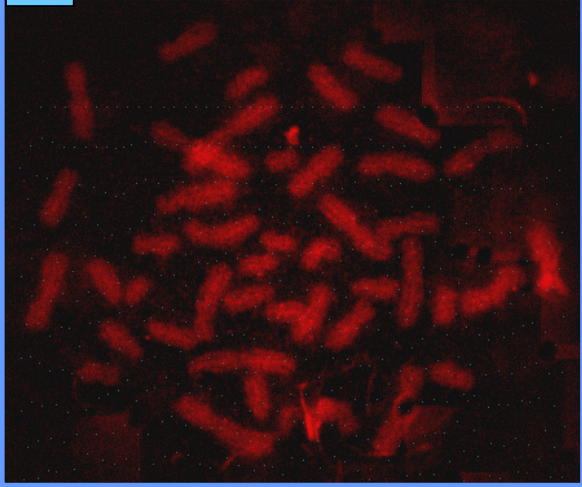




Figura 7. Metafases ya hibridadas con el DNA de control y de referencia. A: Con filtro para detectar el SpectrumGreen (DNA del paciente). B: Con filtro para detectar el SpectrumRed (DNA control). C: Con DAPI II. D: Imagen compuesta. Esta metafase corresponde al paciente 4.

Se realizó un cariograma para cada metafase analizada, el cual puede visualizarse con los diferentes filtros. A continuación se muestra uno que corresponde al paciente 4, en la figura 8. Finalmente, se muestra en las figuras 9 y 10, la proporción del total de cromosomas analizados, especificándose el número de cromosoma y el total de cada uno de ellos en la primera imagen, y en la segunda podemos observar la proporción obtenida del promedio de todos los cromosomas analizados (para cada uno de ellos). Lo que podemos apreciar es que la proporción promedio, dada por la línea azul, se encuentra dentro del rango normal.

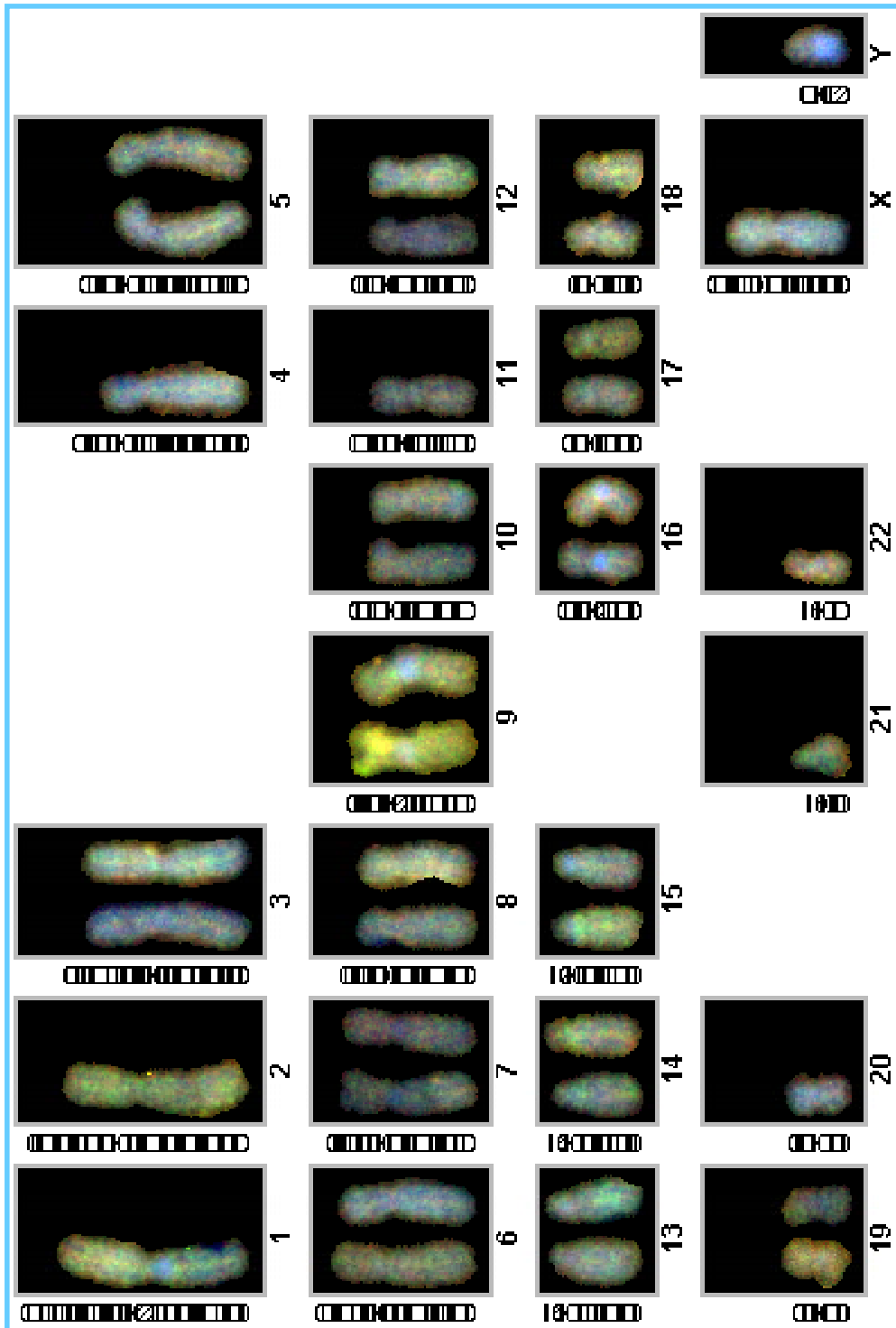


Figura 8. Cariograma de una de las metafases del paciente 4, mostrando la imagen el patrón compuesto. En este caso, se eliminaron de la metafase algunos cromosomas (1,2,4,11,20,21,22) por no alteraciones en su disposición). Podemos observar la presencia del cromosoma Y, ya que la hibridación se realizó sobre metafases de individuos masculinos.

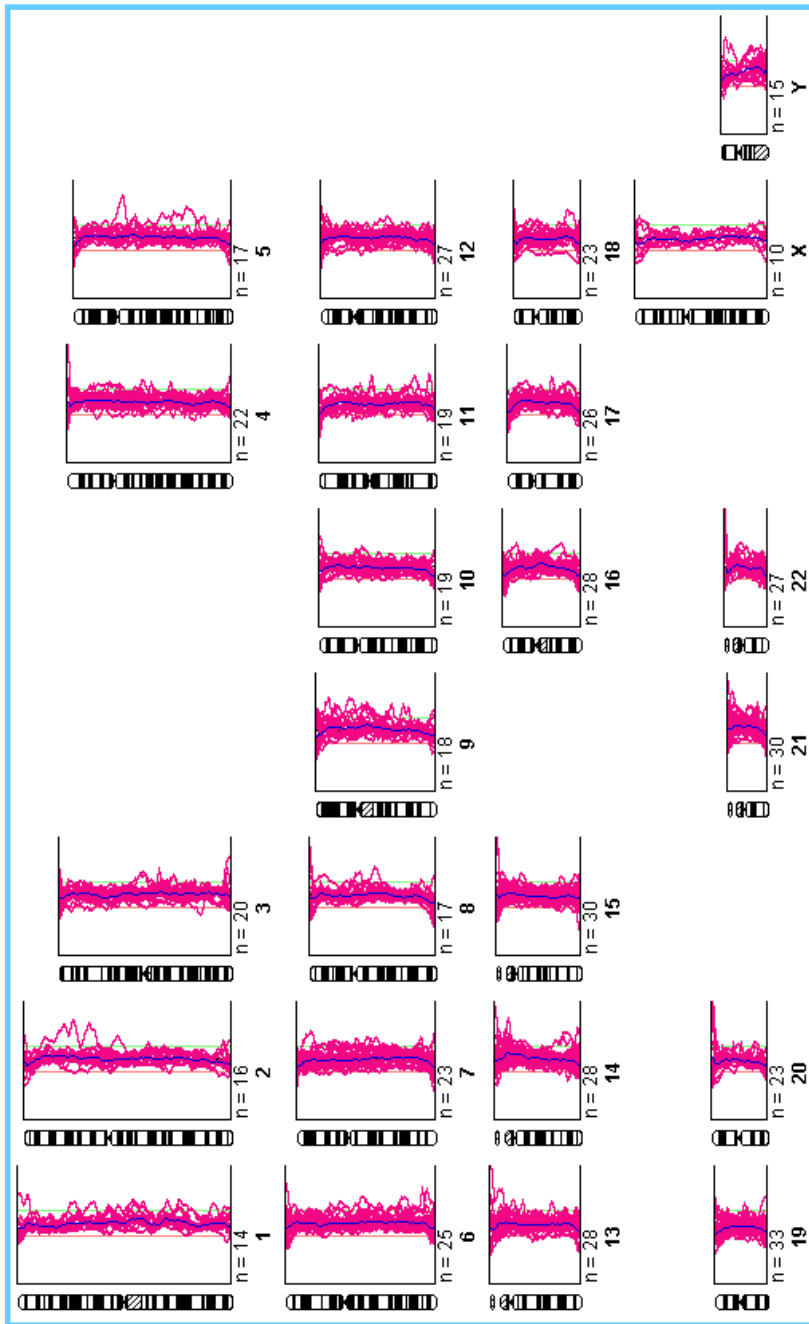


Figura 9. Análisis de la proporción de la hibridación para cada uno de los cromosomas, del total de analizados. Las líneas rosas corresponden a valores para cada metafase analizada. N: Numero total de cromosomas clasificados de acuerdo al tipo.

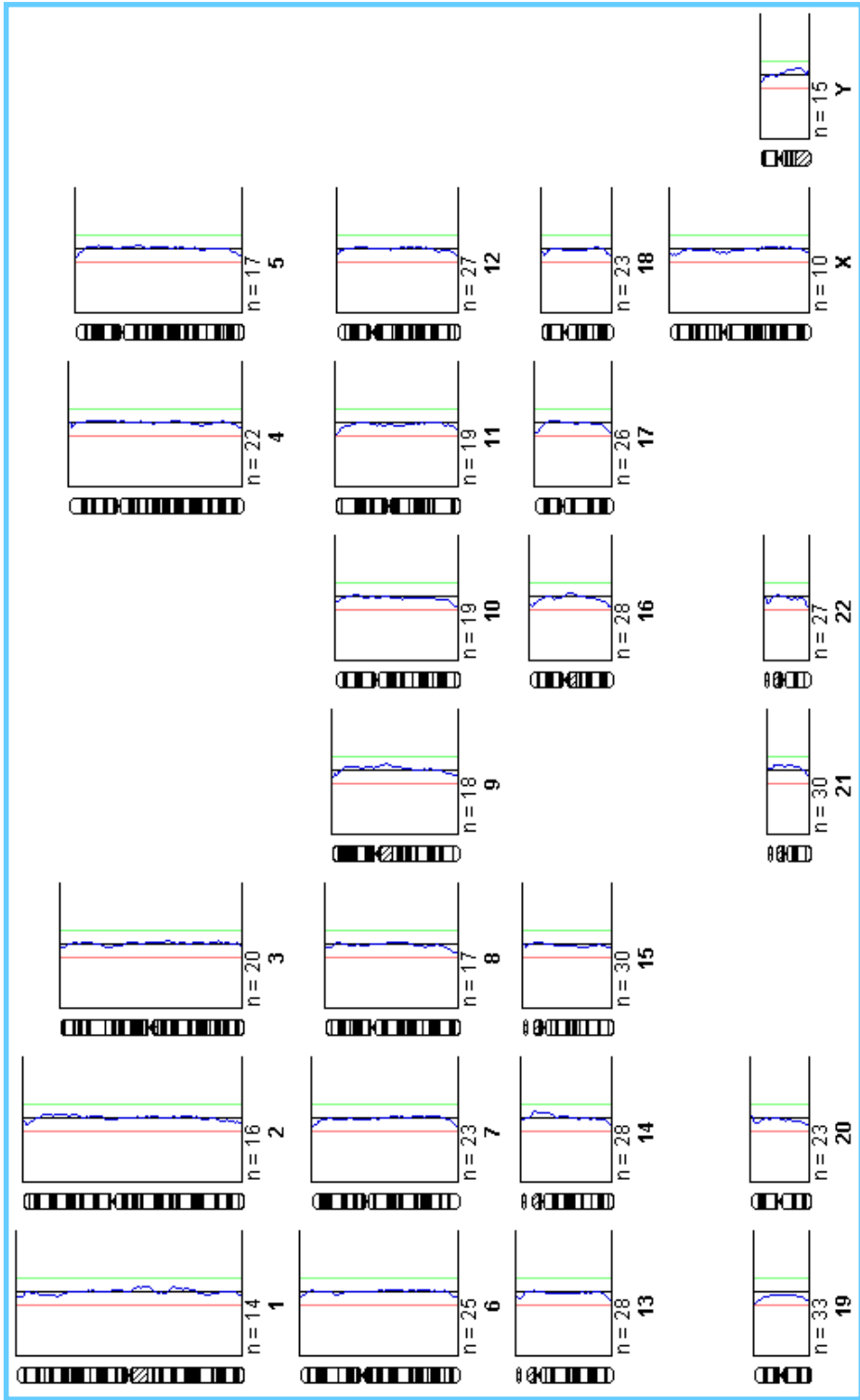


Figura 10. En esta figura podemos apreciar el promedio total para todos los cromosomas analizados (en forma particular), que se muestra en el rango normal.

Análisis de datos

Los hallazgos se analizaron mediante estadística descriptiva.

FACTIBILIDAD Y ASPECTOS ÉTICOS

Fue posible realizar el estudio, ya que en la consulta externa del servicio de Genética Médica se cuenta con pacientes que cubren los criterios.

El protocolo fue evaluado por el Comité de Investigación y la Comisión de Bioética del Hospital de Pediatría. Por ser una investigación con riesgo mínimo contó con carta de consentimiento bajo información. Por el hecho de llevarse a cabo en niños, se les informó a los padres o tutores y estuvieron de acuerdo. Los resultados obtenidos se manejan en forma confidencial.

RECURSOS

Materiales: En la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana del Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, se cuenta con el equipo mínimo necesario, para la realización del presente proyecto. Se dispone de un microscopio y el *software* necesarios para el análisis de CGH y CESH.

Humanos: Se contó con el personal humano mínimo para realizar el proyecto.

Financieros: Se dispuso de financiamiento parcial por parte de CONACYT para el desarrollo de la Citogenética Molecular (Salud-2003-C01-74) y financiamiento de parte del Fondo para el Fomento de la Investigación (FOFOI) del IMSS.

RESULTADOS

En este estudio, se incluyeron 11 pacientes. A continuación se muestran gráficamente algunas de sus características como el género (figura 11), el grupo de edad (figura 12) y grado de retraso (figura 13).

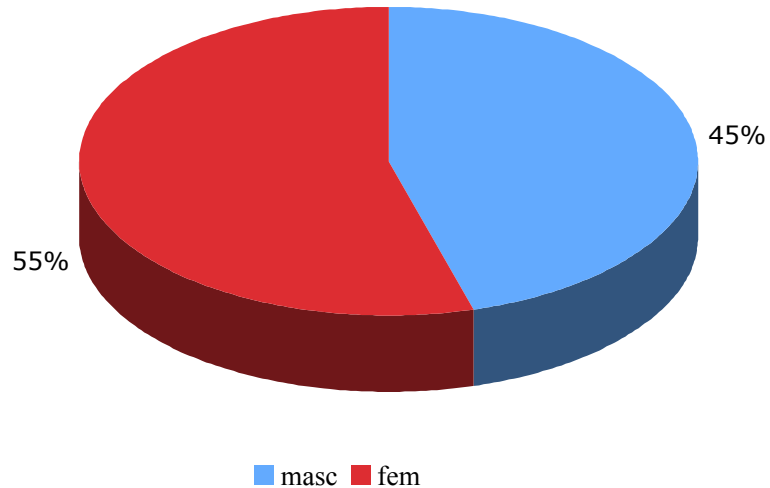


Figura 11. Proporción de pacientes por género.

La edad de los pacientes, se situó al momento de la recolección de datos, de 3 a 15 años, con una media de 7.

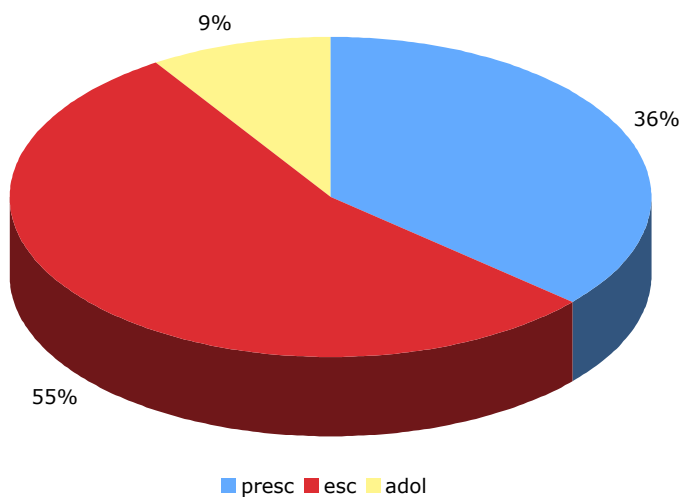


Figura 12. Porcentaje de pacientes incluidos por grupo de edad.

La mayoría de los pacientes padecen un grado leve de retraso mental o del desarrollo.

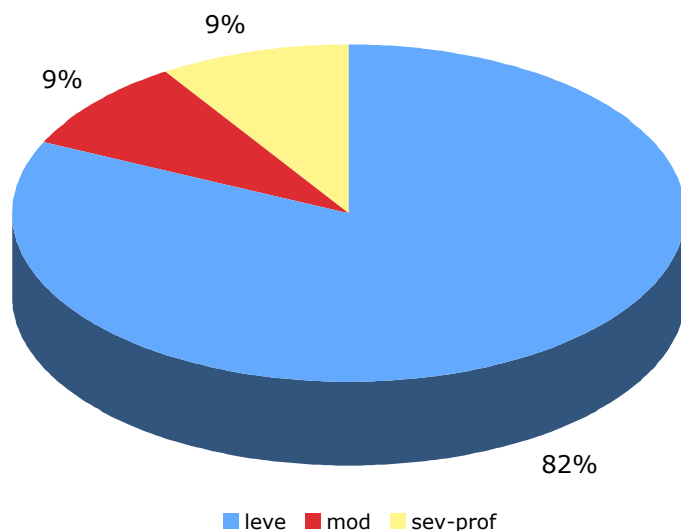


Figura 13. Porcentaje de pacientes incluidos agrupados de acuerdo al grado de retraso. Leve en azul. Rojo en moderado. Grave a profundo en amarillo.

El número de defectos congénitos observados en los pacientes fue desde 13 hasta 23, con un promedio de 15.8 por paciente, con la media y mediana de 17

DEFECTOS CONGENITOS Y OTRAS CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES.

Paciente	Menores	Mayores	Total	*P y **T bajos al nacer	Otra característica
1	14	1	15	P	Hiperqueratoris Hiperelasticidad cutánea
2	12	1	13	NO	Hiperlaxitud articular
3	17	3	20	NO	---
4	15	2	17	P y T	---
5	16	2	18	P y T	---
6	13	2	15	P y T	
7	16	1	17	P y T	Hipertriosis lumbar importante
8	15	2	17	T	Crisis convulsivas en control
9	17	6	23	P y T	Hiperlaxitud articular
10	10	1	2	T	Crisis convulsivas
11	14	3	17	P y T	

Tabla 1. Número de anomalías congénitas por paciente.

*P (peso), **T (talla) .

En cuanto a los rearrreglos crípticos, se muestran imágenes de las metafases que reportaron alteración. En la figura 14 observamos la metafase con el patrón de bandas GTG correspondientes al paciente 11.

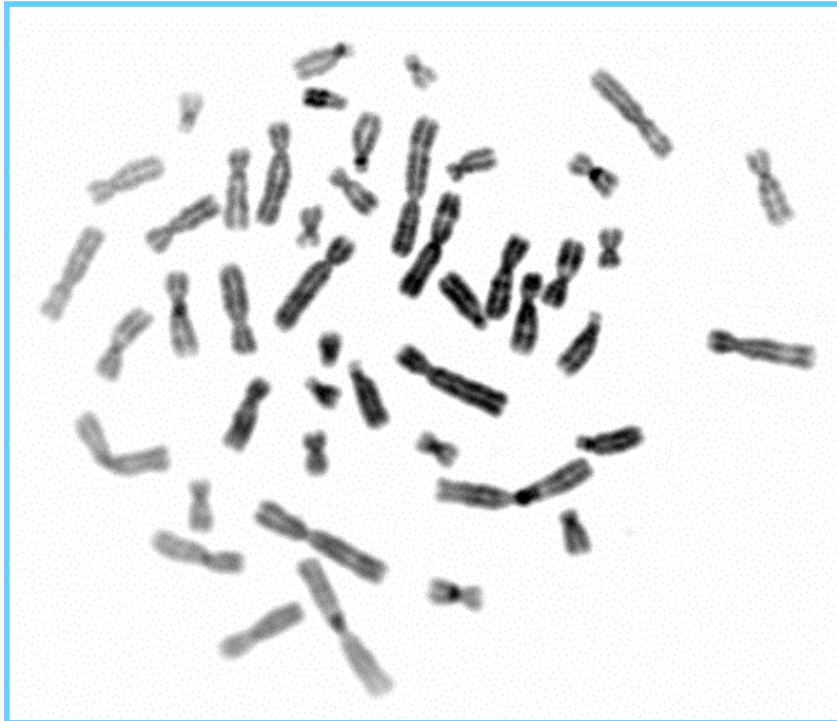
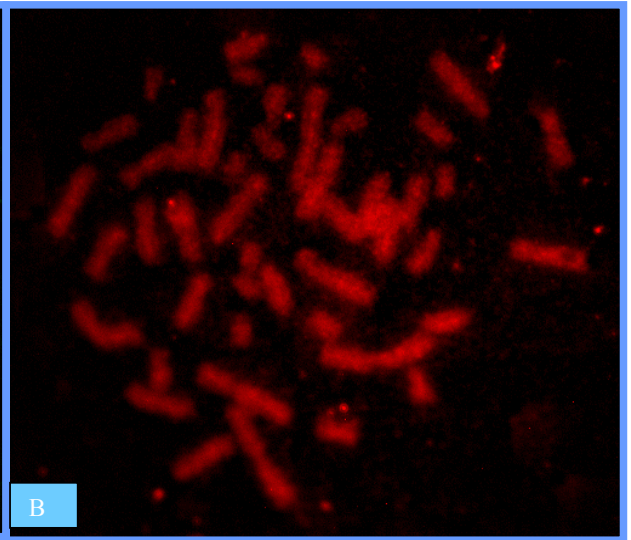
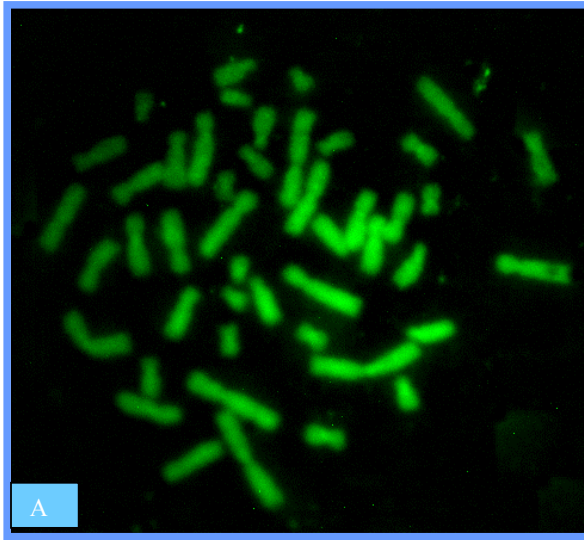


Figura 14. Metafase con patrón de bandas GTG, que corresponde al paciente 11.

Posteriormente, se muestra la misma metafase con los patrones de hibridación para los diferentes filtros, en la figura 15.

En la figura 16, podemos observar el cariograma, donde clasificamos todos los cromosomas disponibles de esta metafase. Se realizó para cada metafase. Posteriormente, en la figura 15 y 16 se muestra el análisis con el perfil de la proporción entre el DNA del paciente y el de referencia, se muestra pérdida de la región terminal del brazo largo del cromosoma 8 (qter), así como el número de cromosomas analizados, el número de metafases incluidas.



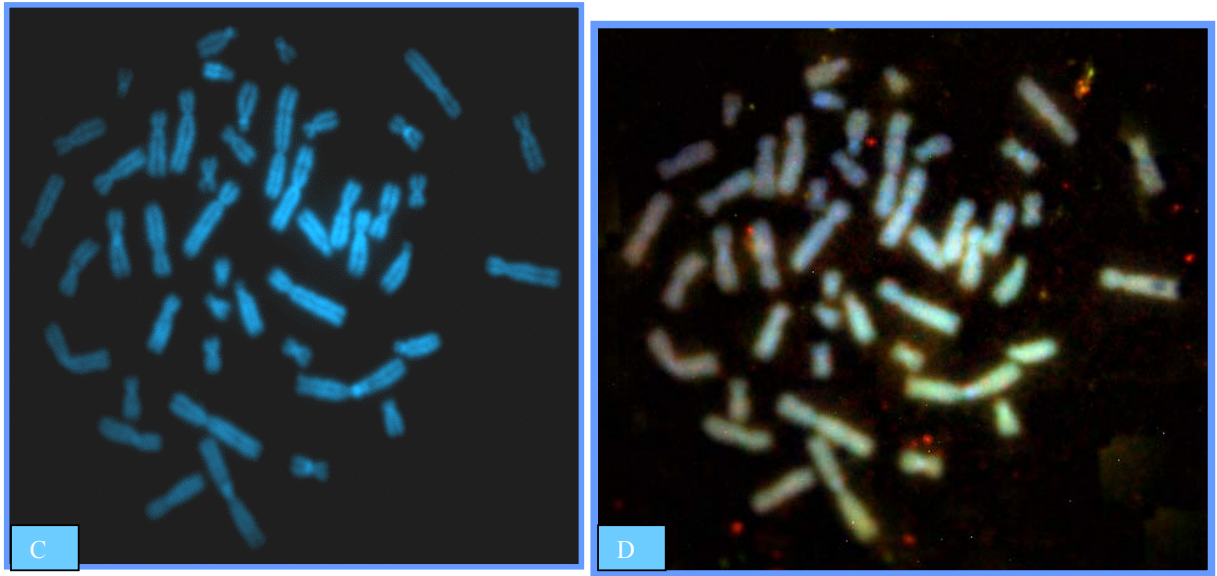


Figura 15. Metafases ya hibridadas con el DNA de control y de referencia. A: Con SpectrumGreen (DNA del paciente). B: SpectrumRed (DNA control). C: Con DAPI II. D: Imagen compuesta. Corresponde al paciente 11.

Finalmente, el análisis de cada una de las metafases, y del promedio del total de cromosomas analizados de cada una de ellas (para cada muestra), las podemos observar en las figuras 20 y 21.

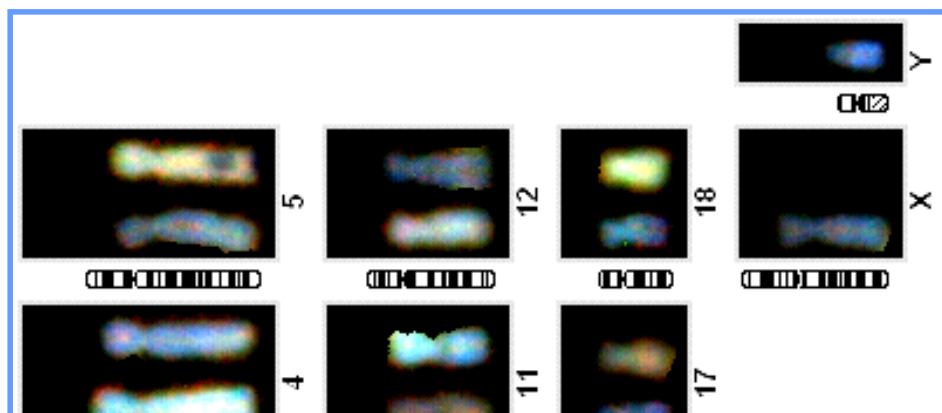


Figura 16: Cariograma donde observamos los cromosomas con la imagen compuesta. Corresponde a la paciente 11. En este caso observamos clasificados el total de cromosomas (46).

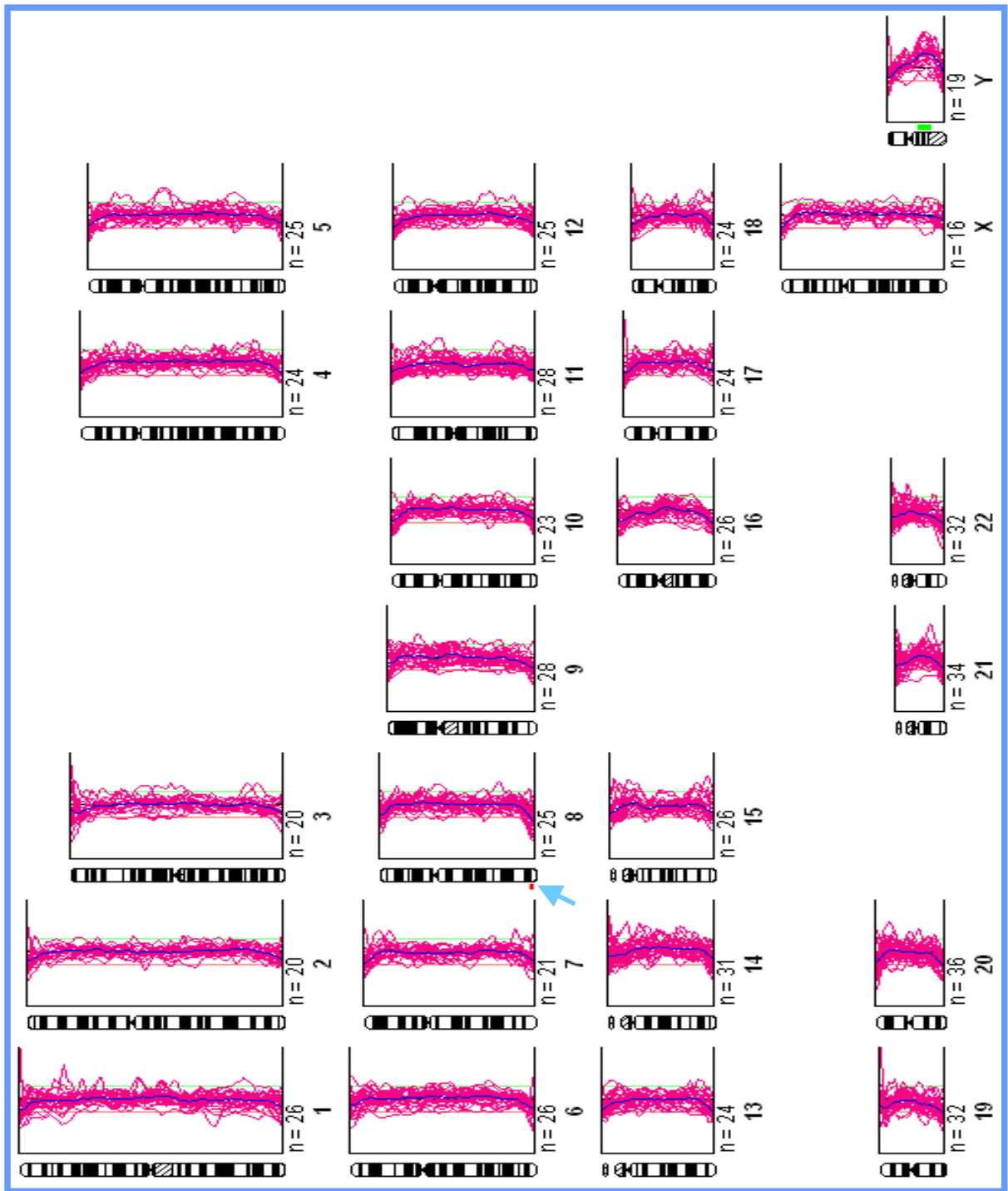


Figura 17. Análisis del total de metafases analizadas para la paciente 11. Las líneas en color rosa muestran la proporción de hibridación entre el DNA del paciente con el de referencia en cada cromosoma. La línea azul es el promedio del total de cromosomas analizados. N: Número de cromosomas. Los números se refieren al cromosoma que está analizando.

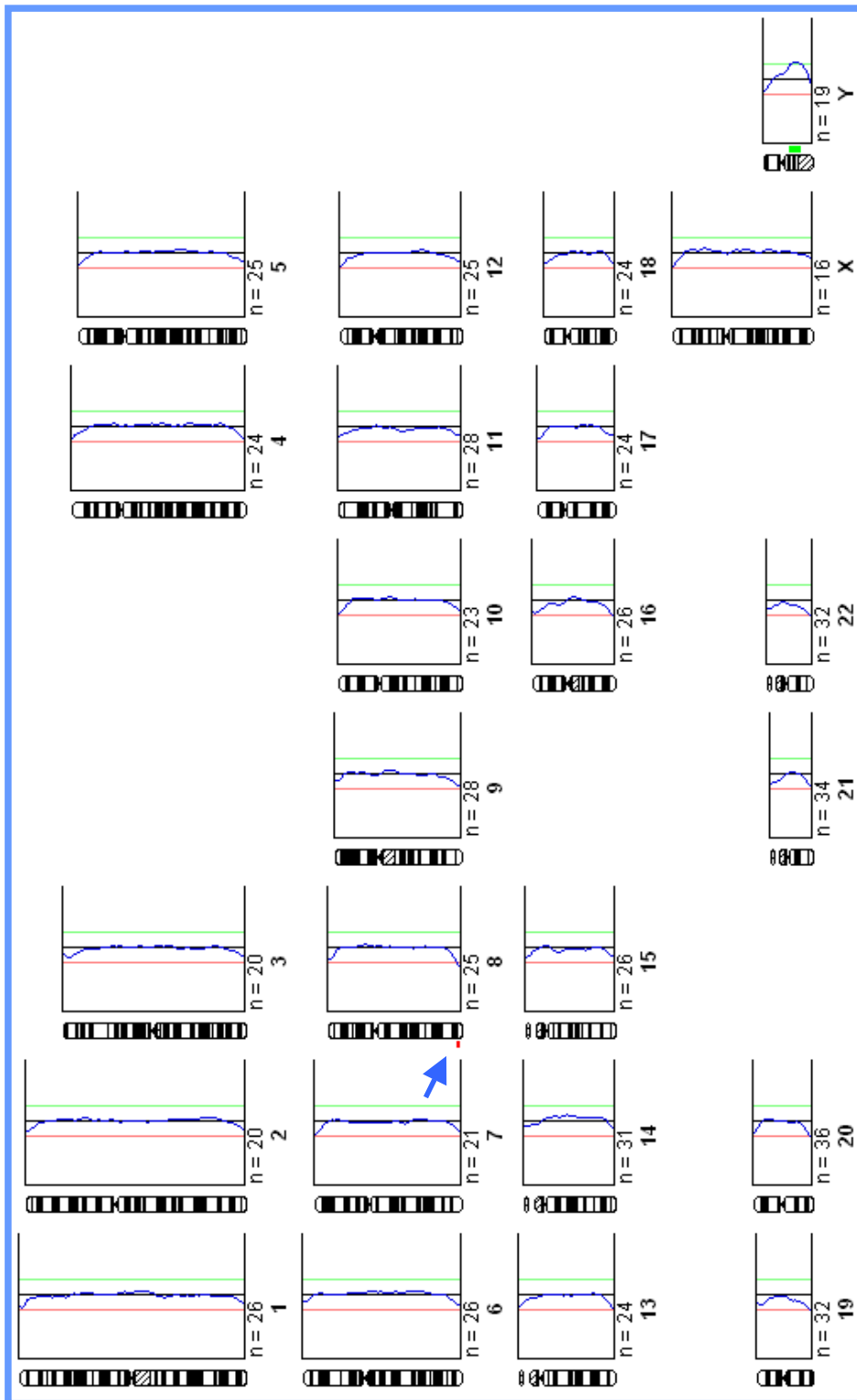


Figura 18. Análisis completo que muestra el promedio del total de cromosomas analizados. Se muestra con una línea roja (indicada con una flecha), la alteración que indica una pérdida de material cromosómico. N: Número de cromosomas. Los números se refieren al cromosoma que está analizando.

Es en esta última figura (18), donde observamos el promedio de la proporción, el cual está fuera del rango normal (menor a 0.75), que corresponde a una deleción en la parte distal del brazo corto del cromosoma 8, específicamente en la banda 8q24. Además, se señala con una flecha un punto rojo localizado a la izquierda de la región alterada, indicativo que corresponde a una pérdidas de material cromosómico.

De tal manera, del total de pacientes, se encontró un rearrreglo, que corresponde a una deleción de 8q24.3-qter.. En la figura 19 se muestra la proporción que guarda con respecto al total de muestras analizadas.

El paciente con la deleción, es una niña de 5 años de edad, que presentó retraso en el crecimiento intrauterino, presenta dismorfias faciales, discreto coloboma palpebral izquierdo, presentó persistencia del conducto arterioso e hipertensión arterial pulmonar, hidrocefalia no comunicante que ameritó derivación ventriculoperitoneal, actualmente con retraso del desarrollo leve.

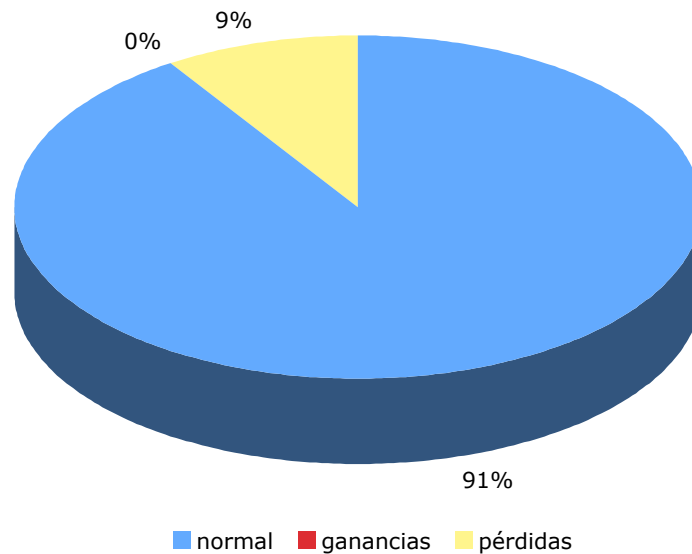


Figura 19. Porcentaje de rearrreglos encontrados en los pacientes incluidos.

DISCUSIÓN

El tamaño de muestra planteado inicialmente en el estudio, fue mediante un método de muestreo de casos consecutivos en el periodo de mayo del 2005 a abril del 2006 (calculado en 30 pacientes aproximadamente). Durante este periodo, el total de pacientes que cumplieron con los criterios establecidos sumaron 28, dentro de éstos, predominó el género masculino en una proporción 2.5:1, dato similar a lo reportado en la literatura donde la frecuencia de RM es mayor en los niños que en las niñas. Sin embargo, de los resultados procesados, solo se incluyó a 11 pacientes, con una proporción de 1:1.1, predominando el género femenino, debido a que a los pacientes que no se localizaban se eliminaban del estudio y se incluía al siguiente.

Cabe hacer notar sobre las características clínicas del primer paciente incorporado al estudio, compatibles con el síndrome de deleción 1p36, el cual se considera el rearrreglo críptico más frecuente reportado en la literatura (frecuencia:1 en 5000). De ahí que intencionadamente se realizó FISH para 1p36 en el laboratorio, cuyo reporte fue negativo. Esto puede deberse a diversas causas, una de ellas es que en este rearrreglo, la región perdida no se presenta siempre en el mismo sitio y el sitio de ruptura se da en sitios diferentes de la secuencia con alteración de segmentos de tamaño variable y la región afectada puede ser intersticial, por lo que pueden requerirse otras sondas (intersticiales) y no solo sondas terminales. Otra posibilidad, es la resolución de la técnica, ya que pueden estar presentes alteraciones no detectables con esta técnica³⁰.

En este estudio, la presencia de un rearrreglo del total de analizados, representa una proporción del 9%, que se sitúa dentro de lo reportado en la literatura. Sin embargo, no podemos inferirlo como una frecuencia, ya que para determinarla se requiere de una muestra más grande de pacientes, representativa de acuerdo a la frecuencia de retraso mental en la población, lo cual se sigue realizando en el laboratorio.

En los pacientes en los que no se detectaron rearrreglos, no se puede descartar alguna alteración de menor cantidad de material cromosómico, debido a la resolución de la técnica de la CGH, ya que la máxima descrita es de hasta 2 Mb. En estos casos, lo más recomendable es realizar la búsqueda de rearrreglos crípticos, mediante técnicas de mayor resolución, tanto de citogenética molecular como de biología molecular y otras técnicas genómicas, que puedan detectar alteraciones de segmentos mas pequeños³¹.

La arquitectura del genoma humano, comprende elementos repetitivos que pueden estar dispersos o agrupados. Dentro de los primeros, se encuentran los repetidos de bajo número de copias (LCR por sus siglas en inglés) y los repetidos asociados a telómero (denominados TARs por sus siglas en inglés), entre otros. Los segundos comprenden a los elementos interespaciados largos (LINEs por sus siglas en inglés), y los interespaciados cortos (SINEs por sus siglas en inglés). Dentro de los LINEs se encuentran los elementos Alu, los cuales representan al 10% del genoma, constituyendo 1 millón de copias. Estos elementos, se localizan principalmente en secuencias con alta densidad génica, en uniones de genes y pseudogenes, y en secuencias con alto contenido de GC.

Estos repetidos, favorecen los mecanismos mas comunes en la generación de rearrreglos cromosómicos, procesos alterados durante el proceso de recombinación en la meiosis o bien por un mecanismo de reparación anómalo. Estos incluyen a la recombinación homóloga no alélica (NAHR por sus siglas en inglés) y la unión de extremos no homólogos (NHEJ por sus siglas en inglés).

En el caso de deleciones que abarcan mas de 1 Mb de material genómico, generalmente se generan a partir de NAHR entre repetidos de bajo número de copias (LCR) que van de 10 a 100 Kb, con homología mayor al 95% y que flanquean un segmento de secuencia única.

Los subtelómeros, son ricos en repetidos y tienen una alta densidad génica, estos repetidos tienen una alta homología entre las regiones subteloméricas de diversos cromosomas no homólogos, hasta el grado de compartir secuencias similares de más de 100kb³²⁻³⁷.

En la figura 20, se aprecia parte de la región de 8q24.3, hasta 8qter, donde se observan repetidos prácticamente a lo largo de toda la región, y justo a 2 Mb un sitio de secuencia única de aproximadamente 100kb, regiones importantes que pudieron haber intervenido durante el mecanismo de la deleción (para la primera) y para el fenotipo (la segunda región).

Cuando la deleción y duplicación son de un segmento grande, generan cambios de dosis génica para múltiples genes, por lo que los cambios fenotípicos se deben a haploinsuficiencia en el caso de deleciones o a exceso de expresión para las duplicaciones. Dado que la densidad génica de estas regiones es alta, se calcula que existe 1 gen cada 30 Kb aproximadamente, por lo que la ganancia o pérdida de esa región tiene potencialmente un efecto fenotípico³³.

El cromosoma 8, ha sido implicado en diversos rearrreglos crípticos, aunque en su mayoría localizados en el brazo corto y asociado al síndrome de Kabuki. La región implicada en este rearrreglo, ya se ha reportado en una paciente con retraso mental y crisis convulsivas, sin embargo la alteración se debe a duplicación de la región, y en este estudio corresponde a una pérdida. La alteración que se encontró en este estudio, corresponde a una niña de 5 años de edad, que presenta 17 defectos congénitos (3 mayores y 14 menores), y retraso mental leve³⁷.

Los genes localizados en la región 8q24.3-qter región son diversos, varios de ellos asociados a enfermedades autosómico recesivas, hasta el momento ninguno asociado a un fenotipo particular por haploinsuficiencia. También se localizan diversos genes que actúan durante el desarrollo, particularmente en la diferenciación y regulación del ciclo celular. En la tabla 2 se muestran algunos genes.

También abarca a varios factores de transcripción del tipo dedos de zinc y se describen numerosos marcos de lectura abiertos que si bien, todavía no se conoce su función, no se puede negar que pudieran tener cierta función en el desarrollo. Por tanto, la suma de varios genes podría explicar el fenotipo de la paciente³⁸.

En este caso, queda por delimitarse el sitio de ruptura y el tamaño de la pérdida de material hereditario para buscar la correlación del fenotipo observado con el genotipo, lo cual es importante para la caracterización clínica de los casos y ofrece un nuevo tema de tesis de especialidad.

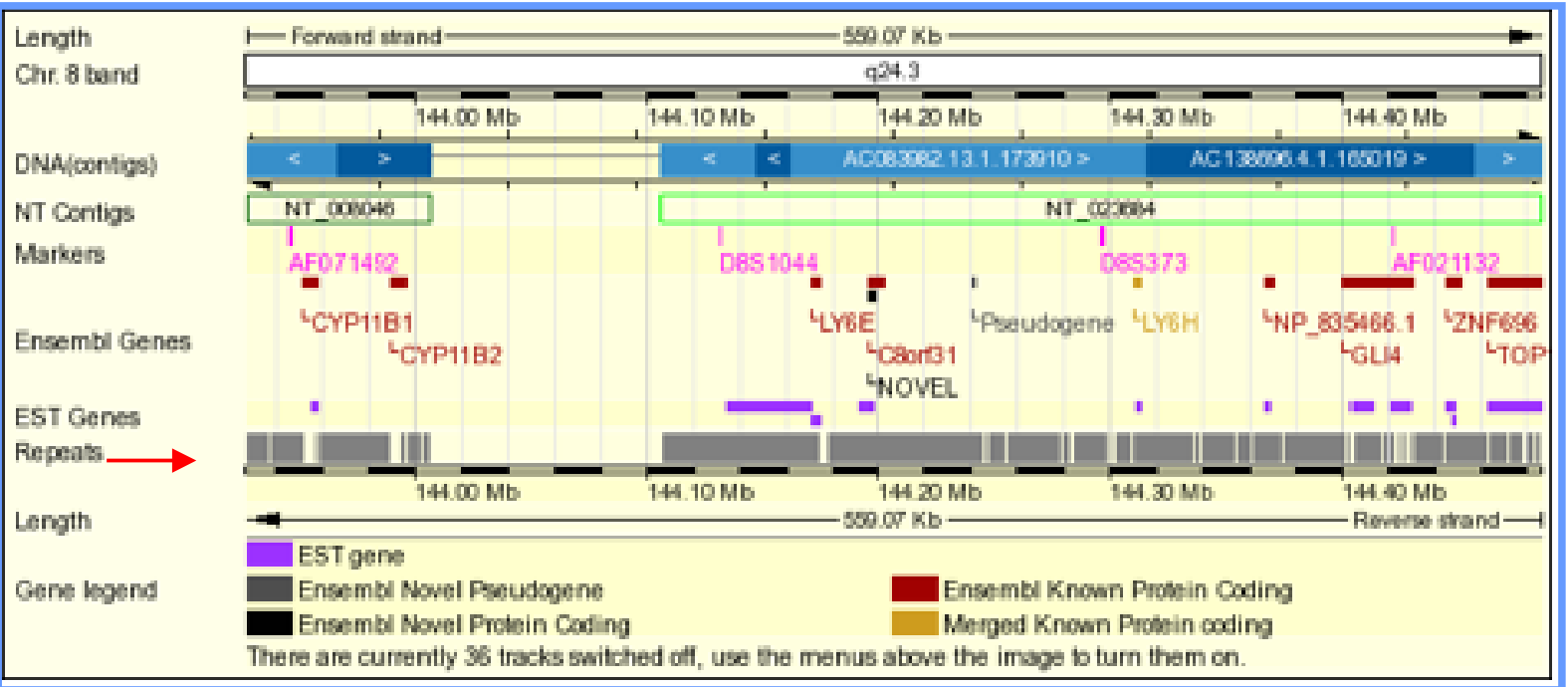


Figura 20. Región que corresponde a 8q24.3. En gris podemos observar los repetidos a lo largo de la región. Se señala con una flecha los repetidos. Tomado de

www.ensembl.org.

GENES LOCALIZADOS EN 8q24.3 CON PROBABLE FUNCIÓN EN SISTEMA NERVIOSO

GEN	NOMBRE	FUNCIÓN	EXPRESIÓN
<i>LY6H</i>	Complejo Antígeno 6 de linfocito, locus H	No conocida. Pertenece a la familia de glicoproteínas asociadas a glicosilfosfatidilinositol	SNC
<i>LY6E</i>	Complejo Antígeno 6 de linfocito, locus E	Alta homología con la familia de receptores de crecimiento, con probable función en transducción de señales.	--
<i>FOXH1</i>	Forkhead Box H1	Transductor de señales de la activina en conjunto con SMAD2 y el ligando similar a factor de crecimiento transformante β , que conducen finalmente a procesos de morfogénesis ya probados en modelo animal.	--
<i>GPAAL1</i>	Proteína 1 de unión a glicosilfosfatidilinositol (GPI)	Cataliza la unión de GPI a proteína con el péptido señal de unión	Todos los tejidos fetales y del adulto
<i>SCRIB</i>	Homólogo de Scribble de drosófila	No conocida La ausencia en ratones causa raquisquisis.	--

Tabla 2. Algunos genes localizados en 8q24.3-qter.

La mayoría de los rearrreglos se presentan *de novo*, generalmente por alteraciones durante la meiosis en el proceso de recombinación. Los eventos de recombinación son más frecuentes en el espermatozoide, y se presenta en mayor grado hacia los telómeros, a diferencia del género femenino en el cual el índice de recombinación es menor a lo largo de todo el cromosoma, aunque hay variaciones con respecto a los loci que se tomen en cuenta. La determinación del origen parental en el que se presentó la deleción, podría aportar datos para conocer el mecanismo del rearrreglo aunado al conocimiento de la arquitectura cromosómica.

Las translocaciones balanceadas se presentan *de novo* en aproximadamente 1 en 1200 concepciones, y 1 de cada 500 individuos es portador de una translocación balanceada.

Por este hecho, en un individuo portador se requiere un segundo evento de intercambio de material genético intercromosómico para que pueda favorecerse una alteración con el riesgo de que se afecten sus gametos³³⁻³⁶.

Aproximadamente el 10% de los casos de deleciones/duplicaciones se atribuyen a rearrreglos balanceados en los padres, por lo que se ofreció a los progenitores de la paciente la búsqueda intencionada de estos. El aportar un diagnóstico preciso a los padres y el integrar un estudio familiar para determinar si se trata de un evento ocurrido *de novo* es la base para otorgar un asesoramiento genético con riesgos de recurrencia confiables.

CONCLUSION

El porcentaje de pacientes afectados en este estudio, que es del 9 %, aunque si bien no es representativo de la población diana, da pie a seguir trabajando, para llegar a conocer la frecuencia de rearrreglos crípticos dentro de la población diana. Así también, para lograr que la búsqueda de estos rearrreglos sea una herramienta diagnóstica ofrecida de forma asistencial en nuestra institución debido a que ocupa un lugar importante en el abordaje del paciente con retraso mental.

Hasta el momento, la detección de una deleción de 8q24.3, es una aportación sumamente valiosa para poder hablar a los padres de la posible causa, durante el asesoramiento genético. Los genes contenidos en la región 8q24.3 y los marcos de lectura abiertos, potencialmente pueden ser genes asociados a Retraso mental y al desarrollo ya que la haploinsuficiencia de éstos ha repercutido en el desarrollo de la paciente.

La CGH, es una técnica genómica útil en el abordaje diagnóstico del retraso mental, tiene la ventaja de estudiar en forma global a todo el genoma de los pacientes con retraso mental idiopático. Sin embargo, es importante mencionar el surgimiento rápido de nuevas técnicas moleculares de mejor resolución, por lo que será conveniente comparar su utilidad desde diferentes aspectos de tiempo y costos.

Los resultados de este estudio esperamos serán la base para comparar los hallazgos de otros estudios con poblaciones similares.

Los rearrreglos crípticos también se han descrito en pacientes con retraso mental sin defectos congénitos, por lo que la búsqueda de estos rearrreglos puede ampliarse en nuestra población a casos con retraso mental en ausencia de defectos congénitos.

El diagnóstico que se realizó, tiene utilidad para el asesoramiento genético, donde se informa de los portadores (en caso de que existan) con el respectivo riesgo de recurrencia.

BIBLIOGRAFIA

1. Van Jarnebeek C. Diagnostic investigations in individuals with mental retardation: a systematic literature review of their usefulness. *Eur J Hum Genet.* 2005; 13:6-25.
2. Curry C. Evaluation of mental retardation: Recommendations of a consensus conference. *Am J Med Genet.* 1997; 272:468-477.
3. Shevell M. Practice parameter: Evaluation of the child with global developmental delay. *Neurology.* 2003; 60:1 de 2.
4. Rittey C. Learning difficulties: what the neurologist needs to know. *J Neur Neurosurg Psych (supp I).* 2003; 74:30-36.
5. Ulovec Z. Prevalence and significance of minor anomalies in children with impaired development. *Acta paediatr.* 2004; 93:836-840.
6. Jelliffe-Pawlowski L. Risk of mental retardation Among Children With Birth Defects. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2003; 157:545-550.
7. De Vries B. Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist. *J Med Genet.* 2001; 38:145-150.
8. Lamb J. Detection of breakpoints in submicroscopic chromosomal translocation, illustrating an important mechanism for genetic disease. *Lancet.* 1989; 8677:819-824.
9. Heather C. The complex structure and dynamic evolution of human subtelomeres. *Nature review Genet.* 2002; 3: 91-102.
10. Lewis S. HotSpots. *Clin Genet.* 2005; 67:154-159.
11. Knight S. Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. *J Med Genet.* 2000; 37:401-409.
12. Kanch J. Composition and conservation of telomeric complex. *Cell Mol Life Sci.* 2003; 60:2295-2302.
13. Joyce C. Subtelomeric rearrangements: results from a study of selected and unselected probands with idiopathic mental retardation and control individuals by using high-resolution G-banding and FISH. *Hum Genet.* 2001; 109:440-451.
14. Sismani C. Screening for subtelomeric chromosome abnormalities in children with idiopathic mental retardation using multiprobe telomeric FISH and the new MAPH telomeric assay. *Eur J Hum Genet.* 2001; 9:527-532.

15. Rio M. Automated fluorescent genotyping detects 10% of cryptic subtelomeric rearrangements in idiopathic syndromic mental retardation. *J Med Genet.* 2002; 39:266-270.
16. Novelli A. High frequency of subtelomeric rearrangements in a cohort of 92 patients with severe mental retardation and dysmorphism. *Clin Genet.* 2004; 66: 30-38.
17. Van Jarnebeek C. Propective screening for subtelomeric rearrangements in children with mental retardation of unknown aetiology: the Amsterdam experience. *J Med Genet.* 2002, 39:546-553.
18. Davies A. Characterization of terminal chromosome anomalies using multisubtelomere FISH. *Am J Med Genet.* 2003;120A:483-489.
19. Shapira K. Chromosome 1p36 deletions: the clinical phenotype and molecular characterization of a common newly delineated syndrome. *Am J Med Genet.* 1997; 67:642-650.
20. Slavotine. Monosomy 1p36. *J Hum Gen.* 1999; 9:657-663.
21. Heilstedt H. Population data suggest that deletions of 1p36 are a relatively common chromosome abnormality. *Clin Genet.* 2003; 64: 310-316.
22. Heilstedt H. Loss of the potassium channel β -subunit gene, *KCNAB2*, is associated with epilepsy in patients with 1p36 deletion syndrome. *Epilepsy.* 2001; 49:1103-1111.
23. Gole L. Fluorescence in situ hybridization. *Encyclopedia of life sciences.* 2001; 1-7.
24. Ghaffari S. A new strategy for cryptic telomeric translocation screening in patients with idiopathic mental retardation. *J Med Genet.* 1998; 35:225-233.
25. Lapierre J. Comparative Genomic Hybridization. *Encyclopedia of life sciences.* 2002:1-5.
26. Kirchhoff M. High resolution comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics. *J Med Genet.* 2001; 38:740-744.
27. Tachdjian G. Cytogenetic analysis from DNA by comparative genomic hybridization. *Ann de Genet.* 2000; 43:147-154.
28. Breen C. Applications of comparative genomic hybridization in constitutional chromosome studies. *J Med Genet.* 1999; 36:511-517.
29. Yong-Jie L. Comparative expressed sequence hybridization to chromosome for tumor classification and identification of genomic regions of differential gene expression. *Proc Natl Acad Sci.* 2001; 98:9197-9202.

30. Heilstedt. Physical Map of 1p36, Placement of Breakpoints in Monosomy 1p36, and Clinical Characterization of the Syndrome. *Am J Hum Genet.* 2003;72:1200-1212.
31. Rooms L. Subtelomeric Rearrangements in the Mentally retarded: A Comparison of detection Methods. *Hum mutation.* 2005;25:513-524.
32. Sharp J. Discovery of previously unidentified genomic disorders from the duplication architecture of the human genome. *Nat genet.* 2006;38(9):1038-1042.
33. Inoue K. Molecular mechanisms for genomic disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2002;43:199-242.
34. Shaw C. Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. *Hum Mol Genet.* 2004;13:57-64.
35. Zhang Z. Patterns of nucleotide substitution, insertion and deletion in the human genome inferred from pseudogenes. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(18):5338-5348.
36. Shaffer L. Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in Humans. *Ann Rev.* 2000;34:297-329.
37. Bonaglia M. A 2.3 Mb Duplication of chromosome 8q24.3 associated with severe mental retardation and epilepsy detected by standard karyotype. *Eur J Hum Genet.* 2005;13:586-591.
38. www.ncbi.nlm.nih.gov/



**ANEXO 1 CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO
HOSPITAL DE PEDIATRIA, CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI,
IMSS.**

Se me ha informado que el servicio de Genética Médica realiza el proyecto de investigación “**Detección de rearrreglos crípticos en pacientes con retraso mental y del desarrollo mediante pruebas de citogenética molecular**”

Se me invita a participar y me informan que se realizará en colaboración con la Unidad de Investigación en genética humana de esta Hospital. El interés del estudio consiste en conocer si los pacientes con retraso mental que acuden a consulta tienen como causa una anomalía que no es visible al microscopio de luz que se utiliza en la prueba de cariotipo.

Se buscarán pérdidas o ganancias de material hereditario mediante pruebas especiales que no se realizan rutinariamente en los pacientes. Estas pruebas necesitan una muestra de sangre. Una parte servirá para separar el material hereditario de los glóbulos blancos y la otra se utilizará para observar al microscopio los estuches del material de la herencia. En caso de que sobre sangre de la muestra proporcionada, será desechada si no se necesita para continuar el estudio familiar, que puede ser necesario en caso de descubrir una alteración que podría ser hereditaria. En caso de necesitar un estudio familiar, se solicitará muestra de sangre al papá y a la mamá del paciente con el fin de saber si la alteración observada en el paciente es hereditaria o no lo es.

Procedimiento

Se tomarán 8 mililitros de sangre de una vena utilizando jeringa y aguja estériles para cada paciente.

Información al paciente

Al término del estudio el investigador (Dra. Ma. Antonieta Araujo y Dra. María del Carmen Palacios) proporcionará la información completa de acuerdo a los resultados.

Beneficios

El estudio puede constituir una herramienta diagnóstica de la causa de las anomalías de mi hijo(a), sin embargo, no representa un beneficio directo para su tratamiento.

Confidencialidad

El estudio sobre la búsqueda de anomalías en el material de la herencia, incluyendo registros clínicos y/o del hospital serán manejados en forma confidencial, se podrán presentar en congresos y revistas estrictamente de interés médico y no será revelada la identidad del paciente y su familia a ninguna persona sin su consentimiento.

Potenciales daños secundarios al estudio.

Al ser un estudio de laboratorio que requiere la extracción de una muestra de sangre, pueden presentarse molestias secundarias al piquete de la aguja, puede ser necesario más de un intento en la toma de muestra y puede aparecer un moretón que desaparecerá por sí solo.

Participación / suspensión

La participación de su hijo en este estudio es voluntaria. Usted está en libertad de retirar a su hijo del estudio en cualquier momento. La decisión de rehusarse a participar no afectará la calidad ni la **disponibilidad de la atención médica.**

Consentimiento

La Dra. María del Carmen Palacios Reyes, la Dra. Ma. Antonieta Araujo Solís y el Dr. Diego Arenas se encargarán de explicarle personalmente cualquier información que no esté bien entendida por usted y contestarán cualquier pregunta que surja durante el estudio. Si tiene alguna duda puede comunicarse al Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI en horario de labores y de lunes a viernes al teléfono 56-27-69-00 extensión 22281 o a la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana al 56-27-69-45. Al firmar este documento, usted accede voluntariamente a participar en este estudio.

México, D.F. A _____ de _____ de 2005.

Nombre del paciente: _____

Firma del padre o tutor: _____ Firma de la madre: _____

Nombre del testigo: _____ Firma del testigo: _____

Relación del testigo con el paciente y su familia: _____

Nombre del testigo: _____ Firma del testigo: _____

Relación del testigo con el paciente y su familia: _____

ANEXO 2 HOJA DE RECOLECCION DE DATOS

No. Consecutivo: _____

No. Expediente: _____

Nombre del niño(a) _____ Edad: _____

Años ___ Meses ___

Nombre de la madre:

_____ Edad _____

Nombre del padre:

_____ Edad _____

Dirección:

Colonia: _____ Mpio: _____ Estado: _____

C. P. _____

Teléfono:

Historia familiar de :

Malformaciones congénitas: Positiva ___ Negativa ___

Retraso mental: Positiva ___ Negativa ___

Antecedentes perinatales

Exposición a:

Radiaciones Si () No () Cual _____ Periodo: _____

Químicos Si () No () Cual _____ Periodo: _____

Biológicos Si () No () Cual _____ Periodo: _____

Retraso en el crecimiento de inicio prenatal/peso bajo al nacer: Positivo ___

Negativo ___

Exploración física:

1.- Peso: _____ Percentil: _____

2.- Talla: _____ Percentil: _____

Perímetro cefálico (cm): _____ Percentil _____

3.- Microcefalia: Sí () No ()

4.- Macrocefalia: Sí () No ()

5.- Cabello

Implantación anormal Sí () No ()

Consistencia anormal Sí () No ()

6.- Fisuras palpebrales

Orientación: Hacia arriba _____ Hacia abajo _____ Normal _____

Tamaño: Corto _____ Largo _____ Normal _____

Medición: _____ cm. P: _____

Distancia intercantal interna (cm) _____ Distancia interpupilar (cm) _____

Distancia intercantal externa (cm) _____

Hipertelorismo: Sí () No ()

Hipotelorismo Sí () No ()

7.- Anomalías en pabellones auriculares:

Fosetas: Sí () No ()

Displasia: Sí () No ()

Fístulas: Sí () No ()

Atresia C.A.E: Sí () No ()

Microtia: Sí () No () Tipo I: ____ Tipo II: ____ Tipo III ____

Hélix anormal Sí ____ No _____ Descripción: _____

Trago anormal: Sí ____ No _____ Descripción: _____

Antitrigo anormal: Sí ____ No _____ Descripción: _____

Rotados: Sí ____ No _____ Descripción: _____

8.- Anomalías en nariz: _____

Pirámide nasal: Pequeña: _____ Grande: _____ Ausente: _____

Base de pirámide: Ancha: _____ Angosta: _____

Puente nasal: Prominente: _____ Deprimido: _____ Ancho _____ Alto _____ Bajo _____

Punta de la nariz: Surco medio: ____ Bífida: ____ Bulbosa: ____ Aplanada: _____

Narinas: Antevertidas: _____ Hipoplásicas: _____

9.- Cavidad oral

Paladar: Alto _____ Angosto _____ Hendido _____
Dientes: Adoncia-hipodoncia _____ supernumerarios _____ alteracion
esmalte _____

Lengua

10.- Maxilar Superior: Hipoplasia mediofacial _____

Inferior: Micrognatia _____ y/o Retrognatia _____

11.- Cuello: Corto _____ Pterigium _____

Tórax: Asimetría _____ Teletelia _____

Abdomen: Defectos de pared _____ Visceromegalias

Cadera: Displasia _____

Genitales: Criptorquidia _____ Hipoplasia _____ ambigüedad _____

Extremidades superiores: Acotamiento: _____ segmento _____

Hiperlaxitud articular _____ articulación _____

limitacion articular _____ articulación _____

Manos: tamaño _____

12.-Anomalías en manos:

Dermatoglifos anormales: Sí () No ()

Sindactilia: Sí () No ()

Braquidactilia: Sí () No ()

Oligodactilia: Sí () No ()

Hipodactilia: Sí () No ()

Camptodactilia: Sí () No ()

Braquimetacarpalia: Sí () No ()

Polidactilia: Sí () No ()

Limitacion articular Sí () No ()

Hiperlaxitud articular Sí () No ()

Otros _____

Anomalías en pies: _____

Sindactilia: Sí () No ()

Braquidactilia: Sí () No ()

Oligodactilia: Sí () No ()

Hipodactilia: Sí () No ()

Camptodactilia: Sí () No ()

Braquimetacarpalia:	Sí ()	No ()
Polidactilia:	Sí ()	No ()
Separación entre primero y segundo dedos:	Sí ()	No ()
Primer dedo ancho		
13.- Extremidades inferiores: Acortamiento _____ Segmento _____		
Limitacion articular	Sí ()	No ()
Hiperlaxitud articular	Sí ()	No ()