



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

"Rearreglos subteloméricos en niños
con retraso mental idiopático"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

RUTH RUIZ ESPARZA GARRIDO

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Diego Julio Arenas Aranda

México, D.F

DICIEMBRE 2008



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.

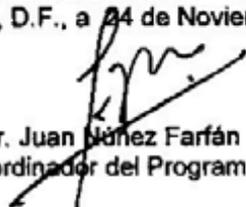
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 18 de Agosto de 2008, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **RUTH RUIZ ESPARZA GARRIDO** con número de cuenta **402092384** con la tesis titulada "**Rearreglos subteloméricos en niños con retraso mental idiopático**", realizada bajo la dirección del **DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA**:

Presidente: DRA. SUSANA HELENA KOFMAN EPSTEIN
Vocal: DRA. ROSARIO RODRÍGUEZ ARNAIZ
Secretario: DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA
Suplente: DR. FABIO ABDEL SALAMANCA GÓMEZ
Suplente: DR. RAMÓN MAURICIO CORAL VÁZQUEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 24 de Noviembre de 2008.


Dr. Juan Néñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente de la interesada.

Agradecimientos

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por el apoyo y respaldo recibido incondicionalmente durante mi posgrado.

Agradezco a CONACYT por el apoyo económico otorgado a lo largo de la realización de este trabajo

A la M. en C Ana Claudia Velazquez Wong, por todo el tiempo invertido en cada uno de los experimentos, por tu paciencia. Gracias por enseñarme gran parte de tus conocimientos, que se han reflejado en mi desarrollo profesional.

Al Dr. Diego J. Arenas Aranda, por dirigir este proyecto, por su disponibilidad, apoyo y conocimientos que han ayudado en gran manera a mi formación académica y personal.

De igual manera agradezco a los doctores:

Dr. Ramón M. Coral Vázquez

Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz

Dr. Fabio A. Salamanca Gómez

Dra. Susana H. Kofman Epstein

Por cada uno de los consejos recibidos, así como por su disponibilidad y colaboración en la realización de este trabajo de investigación.

Dedicatorias

A mi Padre Celestial, por estar siempre delante de mí, guiándome con tanto amor y cuidado.

“El que mora al abrigo del Altísimo morará bajo la sombra del Omnipotente”

A mis padres, por haberme dado la vida, gracias por amarme y cuidarme siempre, gracias también por todas sus oraciones que han guardado mi vida a lo largo de todo este tiempo, por ser un ejemplo de lucha y perseverancia, los amo profundamente.

A Miguel y Yolanda, gracias por contribuir en gran medida a mi desarrollo personal, por el cariño y cuidado que han tenido siempre conmigo. Nunca olviden cuanto los quiero.

Ana Claudia, no tengo palabras para agradecerte el haberme abierto las puertas del laboratorio, por tu paciencia, cuidado y gran amistad. Gracias por impulsarme a ser mejor cada día y enseñarme a no conformarme. Gracias por tu alegría. Por apoyarme incondicionalmente en todas las áreas, tanto académica como personal. Por tantas cosas que he aprendido de ti mil gracias!!!

A mi tía Elizabeth, gracias por apoyarme siempre en todos los aspectos de mi vida, por tus oraciones y amor, sabes que te quiero mucho y admiro.

A mi hermanita Areli, sabes que eres una de las personitas que más amo en esta vida, eres mi hermana, mi compañera y amiga. Siempre contarás conmigo para cuidarte y amarte.

A mi hermano Raúl, no olvides que te quiero, te extraño...y que no importa lo lejos que estemos siempre podrás contar conmigo

A mis amigas de Citogenética: Areli, María Elena, Judith, Angélica, por que cada una de ustedes me han enseñado cosas importantes, gracias por su alegría, apoyo gran paciencia y amistad.

Al amor de mi vida Miguel Ángel: he aprendido muchas cosas de ti, gracias por estar a mi lado en los momentos buenos y malos, por apoyarme siempre, por exigirme, por enseñarme a ser mejor cada día, a nunca darme por vencida por mas difíciles que sean las cosas. Sabes que de igual modo siempre estaré a tu lado para apoyarte. Te amo y sabes que te amare por siempre...

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN..... | 8 |
| INTRODUCCIÓN..... | 12 |
| 1. Retraso Mental (RM)..... | 12 |
| 1.1 Definición de RM..... | 12 |
| 1.2 Origen del RM..... | 13 |
| 2. Citogenética..... | 13 |
| 2.1 Definición de citogenética..... | 13 |
| 2.2 Hibridación <i>in situ</i> con Fluorescencia (FISH)..... | 14 |
| 2.3 Hibridación Genómica Comparada (CGH)..... | 16 |
| 2.4 Rearreglos Subteloméricos..... | 16 |
| 2.5 Polimorfismos Cromosómicos..... | 19 |
| 3. Telómeros y Subtelómeros Humanos..... | 19 |
| 3.1 Telómeros Humanos..... | 19 |
| 3.2 Subtelómeros Humanos..... | 20 |
| 3.3 Estructura de los Subtelómeros Humanos..... | 20 |
| 3.4 Secuencias subteloméricas repetidas (Srpts)..... | 21 |
| 3.5 Secuencias subteloméricas duplicadas..... | 22 |
| 3.6 Secuencias subteloméricas internas (TTAGGG) _n | 23 |
| 3.7 Transcritos subteloméricos (copia única)..... | 23 |
| 3.8 Variaciones subteloméricas..... | 24 |
| 3.9 Consecuencias funcionales de variaciones subteloméricas..... | 25 |
| 4. Reconocimiento de los cromosomas homólogos y recombinación.. | 25 |
| 5. Justificación..... | 29 |
| 6. Hipótesis..... | 30 |
| 7. Objetivos..... | 30 |
| 7.1 Objetivo General..... | 30 |
| 7.2 Objetivos Particulares..... | 30 |

| | |
|--|-----------|
| 8. Metodología..... | 31 |
| 8.1 Selección de los Pacientes..... | 31 |
| 8.2 Extracción de DNA..... | 31 |
| 8.3 Cultivo de linfocitos..... | 32 |
| 8.4 CGH..... | 32 |
| 8.5 FISH..... | 35 |
| 8.6 PCR..... | 37 |
| | |
| 9. Resultados | 39 |
| 9.1 CGH..... | 39 |
| 9.2 FISH Subtelomérico..... | 42 |
| 9.3 PCR..... | 44 |
| 9.4 Características clínicas de los pacientes..... | 45 |
| | |
| 10. Discusión..... | 47 |
| | |
| 11. Conclusiones..... | 54 |
| | |
| 12. Bibliografía..... | 56 |

Resumen

El retraso mental (RM) se define como una incapacidad en el desarrollo de las habilidades cognitivas y en la adquisición de un nivel de inteligencia apropiado para un determinado grupo de edad. Es un desorden común que afecta entre el 1 y 3% de la población mundial. En cuanto a su origen, éste puede establecerse sólo en un 30 a 50 % de los casos, permaneciendo más de la mitad de los casos sin diagnóstico. Diversas causas se han descrito para tratar de explicar la etiología del RM, entre las cuales podemos mencionar: desórdenes genéticos, factores ambientales, enfermedades monogénicas, etc. Se sabe que las anormalidades cromosómicas contribuyen en un 4-28% de los casos de RM. En este sentido, se ha demostrado recientemente que los rearrreglos subteloméricos están involucrados en un 5-7% de los casos de retraso mental idiopático (RMI), siendo la pérdida de la región cromosómica 1p36 la más frecuente. Gracias al desarrollo de técnicas de Citogenética molecular, las regiones subteloméricas de los cromosomas humanos emergieron como regiones importantes, en las cuales, pérdidas o ganancias de material genético están relacionadas con la etiología del RMI.

En este trabajo, se estudiaron 18 pacientes con RMI (de entre 1-16 años) con el objetivo de identificar alteraciones genéticas como: rearrreglos subteloméricos (pérdidas o ganancias de DNA), mediante las técnicas de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) subtelomérico y de hibridación genómica comparada (CGH). Ambas pruebas utilizan un sistema de captura y análisis de imagen especial, el software ISIS de *Metasystems Carl Zeiss*. Mediante la técnica de CGH, se reveló una pérdida subtelomérica en la región terminal del brazo largo del cromosoma 15 (región 15q26.2 -- 26.3 qter) en uno de los pacientes. Por otra parte, con la prueba de FISH subtelomérico, se identificó una translocación críptica no balanceada en la región subtelomérica 10p/17p (46,XX, der (10)t(10p15.3;17p13.3) en otro paciente. Las características clínicas observadas en estos pacientes, se compararon con casos reportados en la literatura, coincidiendo fenotípicamente con las dismorfias y problemas secundarios asociados. Es importante mencionar que solo 6 casos han sido reportados con pérdidas distales 15q 26.2-26.3. En el caso de la translocación no balanceada 10p/17p, es el primer

reporte de un rearrreglo que involucre estos dos cromosomas. Por otra parte, se demuestra que mediante las técnicas moleculares de FISH y CGH es posible detectar rearrreglos crípticos en pacientes con RMI. El hallazgo de nuevos rearrreglos crípticos en humanos, abre un amplio panorama para la identificación de nuevas regiones cromosómicas y genes asociados a la etiología del RM.

Summary

Mental retardation (MR) is defined as an intelligence quotient (IQ) below 70, and it represents the most serious handicap in children and young adults. Mental retardation is a common disorder that affects about 3% of general population and whose genetic causes, in most of the cases, are often unresolved. MR can result from multiple causes including environmental factors, chromosomal anomalies and monogenetic disorders. Nevertheless, in the last years, chromosomal abnormalities have become one of the most significant contribution factors for MR. In these way, subtelomeric chromosomal rearrangements represent a significant cause of unexplained MR (between 5-7% of cases of idiopathic MR). In view of the high rate of children with MR and its enormous impact on family, there is a clear need to study the mechanisms involved in the origin of this disease.

Cytogenetic analysis using conventional methods cannot detect these subtle chromosome imbalances, because most terminal bands are G-band negative and morphologically similar. The limited resolution of these methods has been overcome with the improvement of molecular cytogenetic diagnosis, specially with the advent of fluorescence in situ hybridization (FISH) and comparative genomic hybridization (CGH), which have enhanced the ability to detect submicroscopic deletions (5-10 Mb) and other chromosomal rearrangements.

In this work we studied 18 patients with idiopathic MR (between 1-16 years old) with the aim to identify cryptic subtelomeric rearrangements such as (deletions or duplications) through FISH and CGH. Both methodologies were performed with the application of the specific software ISIS from *Metasystems Carl Zeiss*. CGH results revealed one patient with a subtelomeric deletion in long arm of 15 chromosome (15q26.2 -- 26.3 qter). On the other hand FISH results revealed one patient with a complex subtelomeric rearrangement (unbalanced translocation) between chromosomes 10p/17p (46,XX, der (10)t(10p15.3;17p13.3).

Clinical features observed in our patients were compared with other cases reported in the literature, and similar dysmorphic features were found. In the case of the deletion 15q26.2 qter, only other six cases have been reported. However, unbalanced translocation 10p/17p has

not been reported previously or associated to MR. These results demonstrate the important role of subtelomeric and interstitial rearrangements in the etiology of MR.

The application of new technologies to idiopathic MR opens up a promising new field for the diagnosis of new syndromes with submicroscopic alterations, so that a prognosis can be determined, treatment can be improved and the risk of relapse can be defined.

Introducción.

1. Retraso Mental

1.1 Definición.

El retraso mental (RM) se define como una incapacidad en el desarrollo de las habilidades cognitivas y en la adquisición de un nivel de inteligencia apropiado para un determinado grupo de edad. También se ha descrito como el coeficiente intelectual (IQ) menor que 70 y es considerado como una de las principales causas de discapacidad en niños y adolescentes, presentándose en cerca del 2-3% de la población [1,2]. En cuanto a las causas, el RM puede ser provocado por múltiples factores como el medio ambiente (exposición de la madre a compuestos químicos), anomalías cromosómicas (como la trisomía 21) o enfermedades monogénicas (como el síndrome de X frágil) [3-5] (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación del RM, basada en su origen y nivel de IQ. Modificada de Flint *et al.* 1997 [6].

| Causas más comunes de RM | | |
|----------------------------------|------------|------------|
| Causas | IQ < 50 | IQ 50-70 |
| GENÉTICAS | | |
| Aneuploidias Autosómicas | 35% | 6% |
| Aneuploidias Cromosomas sexuales | < 1% | 1% |
| Desordenes monogénicos | 8% | 2% |
| AMBIENTALES | | |
| Prenatal | 4% | 3% |
| Perinatal | 10% | 4% |
| Posnatal | 5% | 3% |
| DESCONOCIDOS | 34% | 80% |

El RM se ha clasificado como profundo (IQ < 20), grave (IQ 20-35), moderado (IQ 35-50) y leve (IQ 50-70). Frecuentemente, los tres primeros grupos, que abarcan un rango de IQ < 50, se clasifican en un mismo grupo (RM grave), mostrando una prevalencia de 0.3-0.5% [1-3, 6]. En el caso del RM leve, no se sabe con certeza cuál es la prevalencia debido a dos factores fundamentales:

- El diagnóstico del RM leve en niños menores de 3 años es muy complicado, debido a que no presenta rasgos físicos característicos con los que se le pueda asociar.
- Está asociado a una tasa de mortalidad muy baja [3, 4, 7].

1.2 Origen del RM

En cuanto al origen, el RM se puede establecer en un 60-70% de los casos de RM grave y en un 35-50% del RM moderado. Estimando que un 25-50% de los casos de RM grave son de origen genético podemos decir que las causas moleculares, en casi la mitad de los casos de RM grave y en la mayoría de los casos de RM moderado, se desconocen [3,4]. En este sentido el estudio del RM es uno de los campos más complejos de la genética humana, debido a que presenta una heterogeneidad genética muy elevada [2, 4, 7].

2. Citogenética.

2.1 Definición de Citogenética

La Citogenética es la rama de la Genética que se encarga del estudio de la estructura, la función y las anormalidades de los cromosomas humanos [8]. Las primeras técnicas utilizadas en citogenética, fueron empleadas para detectar anormalidades cromosómicas numéricas. Sin embargo, el descubrimiento de las técnicas de bandeo en los años 70, no sólo permitió la identificación de los cromosomas de forma individual, sino también contribuyó de forma importante en la identificación de anormalidades cromosómicas como pérdidas, duplicaciones y translocaciones entre cromosomas no homólogos, relacionadas con síndromes cromosómicos específicos [8]. Este tipo de anormalidades cromosómicas, constituyen una de las causas más frecuentes de RM, provocando fenotipos complejos como resultado del desequilibrio de la dosis génica de un segmento específico de un cromosoma, presentándose con mayor frecuencia en los individuos con RM grave (hasta en un 25% de los casos) [3-5]. De esta manera, un gran número de casos de RM pueden ser atribuidos a la presencia de anormalidades cromosómicas por medio de técnicas de rutina (bandas GTG). Sin embargo, estos métodos tienen un límite de resolución y no pueden detectar pequeños cambios en el

número de copias, ni aberraciones cromosómicas crípticas que involucran regiones con una alta similitud de segmentos o un tamaño muy pequeño [8].

La aplicación de técnicas moleculares en el estudio de los cromosomas, ha permitido un avance espectacular en el campo de la citogenética clínica. Al establecer nuevas técnicas que superan las limitaciones del cariotipo convencional, se ha podido llegar a la identificación de reorganizaciones cromosómicas crípticas que no pueden ser observadas con el microscopio óptico. Por ejemplo, la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), la hibridación genómica comparada de alta resolución (HR-CGH), los microarreglos basados en la hibridación genómica comparada (*array-CGH*) y otras más recientes, como la MAPH (*multiplex amplification and probe hybridization*) y la MLPA (*multiplex ligation –dependent probe amplification*) han permitido la identificación de microdeleciones, microduplicaciones, inversiones, cromosomas marcadores extras, así como secuencias repetidas de DNA que predisponen a recombinaciones homólogas desiguales. [2, 9, 10].

2.2 FISH

El desarrollo de esta técnica, hace aproximadamente 20 años, ha permitido la identificación de numerosos síndromes de microduplicaciones y microdeleciones tanto intersticiales como en regiones subteloméricas. Este tipo de rearrreglos han sido asociados con el RM idiopático (RMI) (retraso mental sin causa aparente) y anomalías congénitas [8, 9]. La técnica de FISH se basa en la utilización de moléculas fluorescentes (biotina, digoxigenina, fluoresceína, etc.), acopladas a secuencias específicas de DNA de una sola hebra (sonda) que son complementarias a la secuencia de interés. Una ventaja muy importante de esta técnica es que se pueden obtener resultados tanto en metafases como en interfases [8]. En este sentido, la prueba de FISH ha sido considerada como una de las mejores técnicas para detectar cambios en el número de copias y rearrreglos balanceados, debido a su gran especificidad y nivel de resolución (2Mb). Aunque con esta técnica, es necesario conocer la secuencia de la región que se quiere estudiar [8-13].

Las sondas que se utilizan en la prueba de FISH se pueden clasificar en: (1) sondas beta-satélite, las cuales son utilizadas para detectar los satélites de los cromosomas acrocéntricos; (2) sondas alfa-satélite, las cuales detectan las regiones centroméricas de todos los cromosomas de manera específica; (3) sondas satélite clásicas, que corresponden a las regiones pericéntricas de los cromosomas 1, 9, 16 y Y; (4) sondas teloméricas/subteloméricas, las cuales son específicas para las regiones terminales de los cromosomas (teloméricas/subteloméricas); (5) sondas de secuencias únicas, las cuales son utilizadas para identificar regiones específicas de un cromosoma y clínicamente para la detección de síndromes de genes contiguos o síndromes de microdeleciones y microduplicaciones (Tabla 2); y (6) sondas de cromosomas completos (WCP=Whole Chromosome Paint), estas sondas reconocen secuencias únicas y repetitivas de cada cromosoma completo y sirven para detectar el origen de segmentos de cromosomas o cromosomas marcadores [8].

Tabla 2. Síndromes de microdelección y microduplicación más conocidos. Modificada de Dave y Sanger, 2007 [8].

| Síndrome | Región cromosómica |
|-------------------------------------|--------------------|
| Delección 1p36 | 1p36 |
| Wolf-Hirschhorn | 4p16.3 |
| Cri-du-Chat | 5p15.2 |
| Síndrome de Williams | 7q11.23 |
| Saethre- Chotzen (TWIST gene) | 7q21.1 |
| Prader-Willi/ Angelman | 15q11.2 |
| Millar Dieker | 17p13.3 |
| DiGeorge/VCFS | 22q11.2 |
| Síndrome de Kallmann | Xp22.3 |
| Duchenne/ Becker distrofia muscular | Xp21.2 |
| SRY | Yp11.3 |

2.3 CGH

La técnica de CGH descrita en 1992, nos permite detectar pérdidas o ganancias de material en el genoma completo. A diferencia de otras técnicas como la de FISH, no se requiere del conocimiento previo de la región involucrada, ya que consiste en la hibridación competitiva entre DNA de un paciente y DNA de referencia (sano) sobre metafases normales.

Previamente, el DNA del paciente es marcado con el fluorocromo SpectrumGreen dUTP (0.2 mM) y el DNA de referencia es marcado con el fluorocromo rojo Texas SpectrumRed dUTP (0.2 mM), lo cual permite su posterior identificación y análisis mediante microscopía de fluorescencia y de un software específico. El programa cuantifica la proporción de fluorocromo verde/rojo que hay en todos los cromosomas, de manera que si existe una ganancia de material genómico en una región determinada, se produce un aumento de la fluorescencia verde. Por el contrario, si se pierde material genómico se produce una disminución de la fluorescencia verde y, en consecuencia, un incremento de la roja. En este sentido, si una región cromosómica determinada de DNA del paciente presenta una mayor densidad o un incremento en el número de material, con respecto al DNA de referencia, podemos hablar de una ganancia o duplicación de material. Sin embargo, si una región cromosómica de DNA del paciente presenta menor número de copias que el de referencia, podemos hablar de una pérdida de material o de segmentos [15-16].

La técnica de CGH, detecta cambios que implican la pérdida o ganancia de secuencias de DNA, pero no detecta translocaciones balanceadas. Asimismo, la resolución máxima del CGH se ha estimado en un rango aproximado de 5-10Mb, por lo que rearrreglos menores a este rango no se pueden detectar con esta metodología [14-16].

2.4 Rearreglos Subteloméricos.

Gracias al desarrollo de las técnicas de citogenética molecular, las regiones subteloméricas de los cromosomas humanos comenzaron a surgir como regiones importantes, en las cuales, pérdidas o ganancias de material podrían estar implicadas en los casos de RMI, basándose principalmente en tres evidencias experimentales:

- 1) Si se comparan tanto el tamaño como la cantidad de genes que se encuentran en las regiones subteloméricas de los cromosomas humanos, contra el tamaño y la cantidad de genes que se encuentran en otras zonas del genoma, podemos observar que las regiones de los subtelómeros presentan una mayor concentración de genes. Basado

en lo anterior, se propuso que rearreglos en estas regiones, provocan fenotipos anormales.

- 2) Los desbalances subtelométicos crípticos comenzaron a ser una causa importante en la etiología del RM (5-10% de los casos de RMI).
- 3) En levaduras, se observó, que grandes fragmentos de secuencias de DNA homólogo subtelomérico de cromosomas no homólogos, estaban involucrados en el apareamiento incorrecto durante la meiosis [17].

A lo largo de los años, los datos obtenidos de numerosas investigaciones han confirmado los dos primeros postulados [17-18]. Sin embargo, a pesar de que el tercer postulado explicaría el mecanismo por medio del cual se generan estas alteraciones, no existe evidencia de que esto suceda en las regiones subteloméricas de los cromosomas humanos. Por lo que el mecanismo más aceptado hasta ahora, para explicar este tipo de rearreglos cromosómicos en humanos, es el rompimiento al azar. Sin embargo, debemos mencionar que en los subtelómeros humanos existen secuencias repetidas, que son particularmente susceptibles a sufrir rearreglos durante la búsqueda y apareamiento de cromosomas homólogos, lo cual podría dar lugar a un fenotipo anormal [11,17-18]. Actualmente, existen diversas metodologías que nos permiten determinar la frecuencia de casos originados por este tipo de desbalances. Entre estos métodos, podemos encontrar sistemas de FISH con sondas de secuencias únicas para las regiones de todos los subtelómeros humanos [11]. Hasta el momento, se han analizado aproximadamente 2,585 pacientes con RMI de moderado a grave, encontrando una prevalencia de 5-10% de anomalías cromosómicas subteloméricas en pacientes con RMI [11]. Por medio de esta metodología se ha confirmado que el 50% de los casos se han originados de novo, mientras que la otra mitad ha sido atribuida a padres (padre/madre) portadores de translocaciones balanceadas [11]. Es importante mencionar, que los datos reportados en cada uno de estos trabajos presentan grandes variaciones en relación a la frecuencia. Estas inconsistencias son originadas en gran parte, por los criterios que fueron

utilizados para seleccionar a los pacientes (grado de RM, características dismórficas, historia familiar de RM, etc.) [9,18].

Recientemente, los grupos de Ravnan (2006) y Ballif (2007) [20-21] analizaron a 19,000 pacientes con RMI por medio de aCGH, reportando una frecuencia de 2.5% de rearrreglos subteloméricos. A pesar de que esta proporción es mucho menor de lo que se había reportado y se esperaba confirmar, este porcentaje sigue siendo importante y significativo [17, 19-22].

Gracias al gran esfuerzo que se ha hecho por estudiar las regiones subteloméricas de los cromosomas humanos y su implicación directa en patologías tales como el RMI, se ha podido establecer una relación de los cromosomas que presentan mayor frecuencia de rearrreglos subteloméricos, siendo el subtelómero del cromosoma 1p el más común, seguido del 4p, 9q, 8p, 2q, 20p y 22q (Figura1) [22].

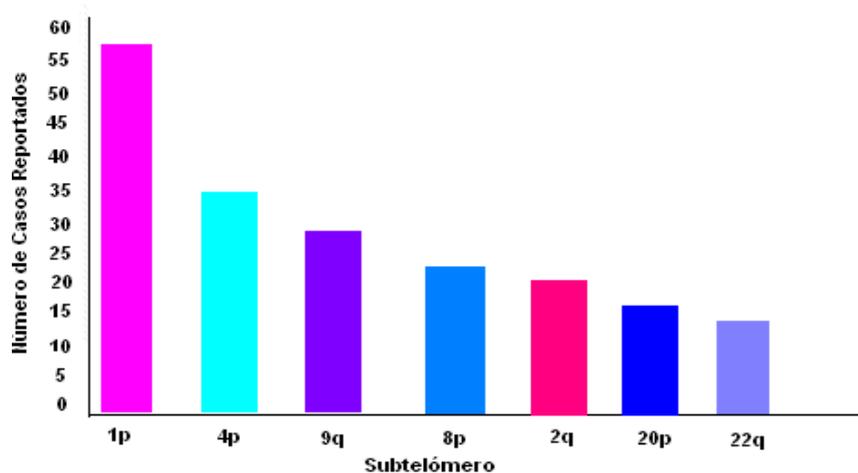


Figura1. Frecuencia de rearrreglos subteloméricos de cada cromosoma, estudiada por Ravnan *et al* (2006) y Ballif *et al* (2007) [20-21]. Modificada de Ledbetter y Martin, 2007 [22].

2.5 Polimorfismos Cromosómicos.

Los polimorfismos cromosómicos, son segmentos de DNA condensado de longitud variable, formados por secuencias repetidas, que no se transcriben ni traducen y por consiguiente, permanecen inactivas o apagadas. Los genes localizados en estas regiones, ya sea de forma natural o como resultado de un rearrreglo cromosómico, tienen muy pocas posibilidades de expresarse [11,21-22].

Para poder establecer si un polimorfismo es patológico o neutral, debemos tener en claro dos aspectos fundamentales. Primero, se ha reportado en la literatura que muchos polimorfismos

no producen alteraciones. Hasta el momento se han descrito 87 polimorfismos no patológicos, siendo los cromosomas más polimórficos el 1q, 9q, 16q y el Yq [11,22]. Segundo, no todos los polimorfismos que existen han sido reportados. En este sentido es importante mencionar, que se han encontrado polimorfismos responsables de ciertas patologías, generado de esta manera, una gran controversia en la citogenética actual [11].

3. Telómeros y Subtelómeros Humanos

3.1 Telómeros Humanos

Las regiones terminales o telómeros de los cromosomas están constituidas por zonas complejas y dinámicas de DNA. Junto con sus proteínas asociadas, estas regiones son esenciales para llevar a cabo de forma correcta tanto la replicación como la estabilidad genómica. Muchas de las funciones biológicas fundamentales de la célula como la regulación del ciclo celular, inmortalización celular, movimientos y localización nuclear de los cromosomas, así como la regulación transcripcional de los genes subteloméricos, están mediadas en gran parte por estos segmentos terminales de DNA [23-24].

En las células somáticas, las regiones terminales de cada cromosoma están compuestas por secuencias simples de DNA repetido (TTAGGG)_n de un tamaño que varía de 5 a 15 kb. Adicionalmente, se ha demostrado que el tamaño de estas regiones puede variar debido a su compleja dinámica, la cual es modulada por medio del balance de exonucleasa-replicación-telomerasa. En las células somáticas del humano, el tamaño del telómero está relacionado tanto con la historia replicativa del linaje celular como con factores ambientales que son capaces de inducir estrés o daño oxidativo. La pérdida de estas regiones afecta la viabilidad celular [25-28].

3.2 Subtelómeros Humanos

Adyacente a los repetidos terminales (TTAGGG)_n, los cromosomas eucariontes contienen un conjunto más complejo de secuencias repetidas que se denomina región subtelomérica [8-10]. Estas regiones cromosómicas presentan una clase particular de DNA denominado repetidos

cortos o “*low copy repeat*” y se caracteriza por tener una similitud de secuencias de ente 90% a >99.5% aproximadamente entre las regiones repetidas. Estas regiones de tamaños variables van desde 1kb hasta >200kb. Algunas de estas regiones repetidas son únicas de los subtelómeros, mientras que otras son muy similares a los repetidos encontrados en regiones pericentroméricas, así como en regiones intersticiales cromosómicas [25].

Aún cuando se han utilizado técnicas sofisticadas para analizar estas regiones en humanos, la organización inusual de las secuencias de DNA presentes en las regiones terminales de los cromosomas humanos ha sido muy complicada. Por lo que, las secuencias subteloméricas se encuentran prácticamente ausentes en la mayoría de los genomas que se han secuenciado de muchos vertebrados (excepto para el humano y el chimpancé) [26].

3.3 Estructura de los Subtelómeros Humanos.

Las regiones subteloméricas han sido definidas como las 500kb terminales antes del telómero de cada brazo de los cromosomas humanos. La organización de los subtelómeros se ha dividido en cuatro bloques fundamentales:

1) Secuencias subteloméricas repetidas (Srpts). Estas secuencias han sido definidas como regiones de entre 10kb a 300kb de largo, que presentan un 90% de similitud. Están compuestas por mosaicos de segmentos duplicados de DNA, que se encuentran localizados en uno o más segmentos a lo largo del subtelómero.

2) Segmentos duplicados. Estos segmentos forman las zonas de transición entre secuencias específicas de los cromosomas y las secuencias específicas de los repetidos subteloméricos.

3) Secuencias subteloméricas internas parecidas a telómero (TTAGGG)_n. Estas secuencias tienen un tamaño aproximado de 2-15 kb de largo. Se encuentran intercaladas a lo largo de la región subtelomérica y presentando la misma secuencia de repetidos en tandem de los telómeros.

4) Secuencias únicas de genes. Estas secuencias se caracterizan por presentar un alto contenido de GC y una alta densidad de genes. Se encuentran localizadas hacia el centrómero partiendo de las secuencias Srpt [26-27].

3.4 Secuencias Srpts.

Las secuencias más distales de los subtélomeros están conformadas por bloques de Srpts. Sin embargo, el arreglo específico de estas regiones es variable. Como se ha observado en los subtélomeros de los cromosomas 2p, 2q, 3q, 5p, 7p, 8p y 12p, adicional al bloque Srpt, hay pequeños segmentos entremezclados de DNA de copia única y segmentos duplicados. Provocando un patrón de distribución y contenido sumamente variable, Se ha estimado que por cada 18.87 Mb de DNA subtelo mérico analizado, el 12.5% corresponde a Srpt y cerca del 8.3% corresponde a DNA de segmentos duplicados (Figura 2) [26-27].

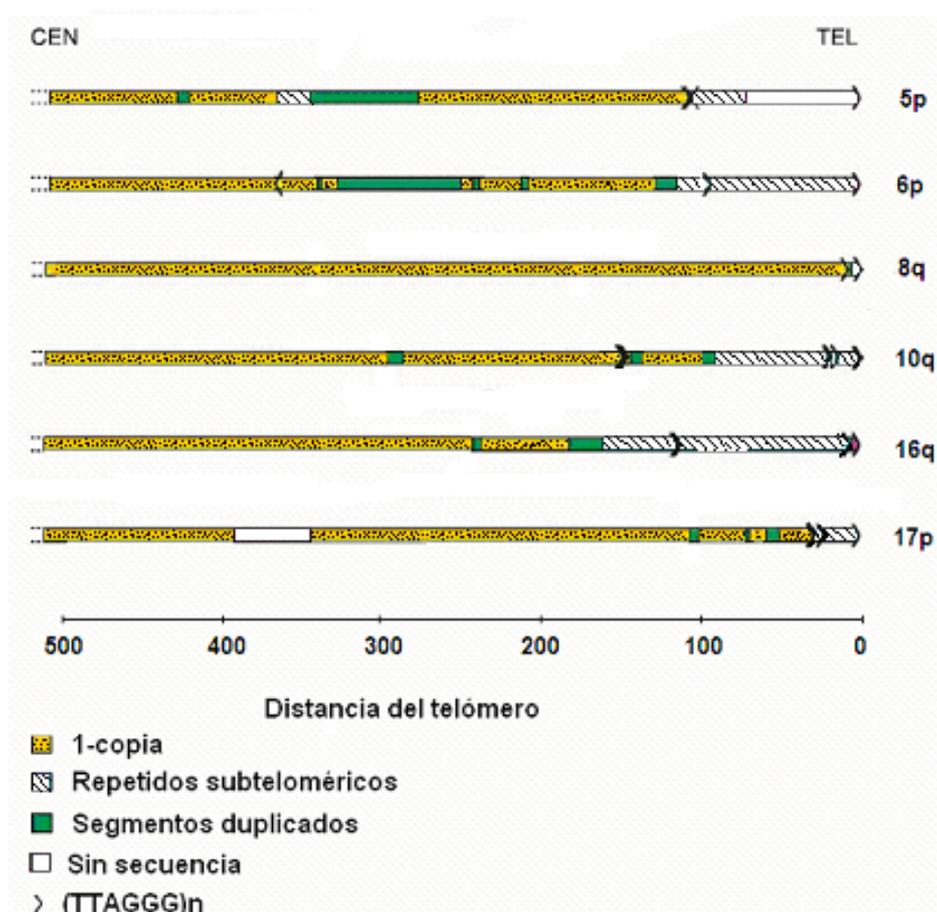


Figura 2. Distintas organizaciones de las secuencias subtelo méricas en los cromosomas humanos. Tomado y modificado de Riethman *et al.*, 2005 [26].

3.5 Secuencias subtelo méricas duplicadas

Al estudiar con detalle las secuencias Srpt, se pudo observar, que intercaladas con estas regiones (Srpt), existen segmentos compuestos por regiones grandes y complejas formadas a su vez por una mezcla de segmentos genómicos en mosaicos o parches. A las cuales se les ha denominado secuencias duplicadas subtelo méricas [26].

Los segmentos duplicados de los subtelómeros, han sido considerados importantes, debido a que en ellos se han encontrado pseudogenes. Estos están formados por partes o fracciones de secuencias de copia única, o segmentos duplicados. Los pseudogenes se generan por apertura o yuxtaposición de los transcritos precursores, lo que resulta muy interesante, debido a que puede generar nuevas funciones derivadas de la mezcla del exón sobre el segmento duplicado. Algunos ejemplos son los transcritos para proteínas F-box, dominios de unión a DNA tipo dedos de Zinc y muchas proteínas de función desconocida, localizadas en los subtelómeros y generadas por este tipo de procesos [26].

3.6 Secuencias subteloméricas internas parecidas a telómero (TTAGGG)_n

En el caso de las levaduras, las secuencias subteloméricas (TTAGGG)_n desempeñan un papel muy importante, ya que intervienen directamente tanto en la recombinación como en la transcripción [17]. Muchos estudios han sugerido que estas regiones en los subtelómeros humanos, además de ser una especie de límite, pueden desempeñar funciones similares a las de levaduras [28-30]. Por otra parte, este tipo de secuencias han demostrado tener un papel muy importante en la naturaleza, por ejemplo, el genoma del virus Epstein-Barr contiene tres pequeñas islas TTAGGGTT, a las cuales se acoplan tres moléculas (TRF1, TRF2 y hRAP1) que son requeridas para unir proteínas asociadas al ciclo celular [31-32].

El estudio de estas secuencias ha sugerido que la mayoría de las regiones intersticiales (TTAGGG)_n de los subtelómeros humanos, se han generado de forma reciente, por medio de un proceso de separación de regiones o por medio de algún mecanismo de selección que ha mantenido la similitud de los segmentos (TTAGGG)_n [6].

3.7 Transcritos subteloméricos (copia única)

Estas regiones son zonas ricas en genes, intercaladas a lo largo del subtelómero con segmentos duplicados, Srpts y algunas secuencias (TTAGGG)_n. Se han identificado cerca de 1,012 transcritos subteloméricos de los cuales 732 pertenecen a secuencias de copia única y 280 provienen de segmentos duplicados y repetidos de DNA [26] (Figura 3). En general las

regiones subteloméricas son ricas en transcritos de genes únicos (aproximadamente 54 transcritos por Mb). Cabe destacar que la densidad de transcritos varía de un subtelómero a otro [26-27] (Figura 3).

Las familias de genes subteloméricos presentan una similitud de secuencias de aproximadamente 70%-90%. Algunos ejemplos de estas familias incluyen a los genes de la cadena pesada de la inmunoglobulina (localizada en el subtelómero del cromosoma 14q), genes de receptores olfatorios (1q, 5q, 10q, 15q, 22, 17, etc.), factores de transcripción tipo dedos de zinc (4p, 5q, 8p, 8q, 12q, 19q) entre otros. Los transcritos para muchos de estas familias de genes, se localizan dentro de distintas regiones subteloméricas. La abundancia de este tipo de genes en las regiones subteloméricas, es una característica común de muchos eucariontes y podría estar reflejando un mecanismo común para generar nuevos genes por medio de duplicación [25-27].

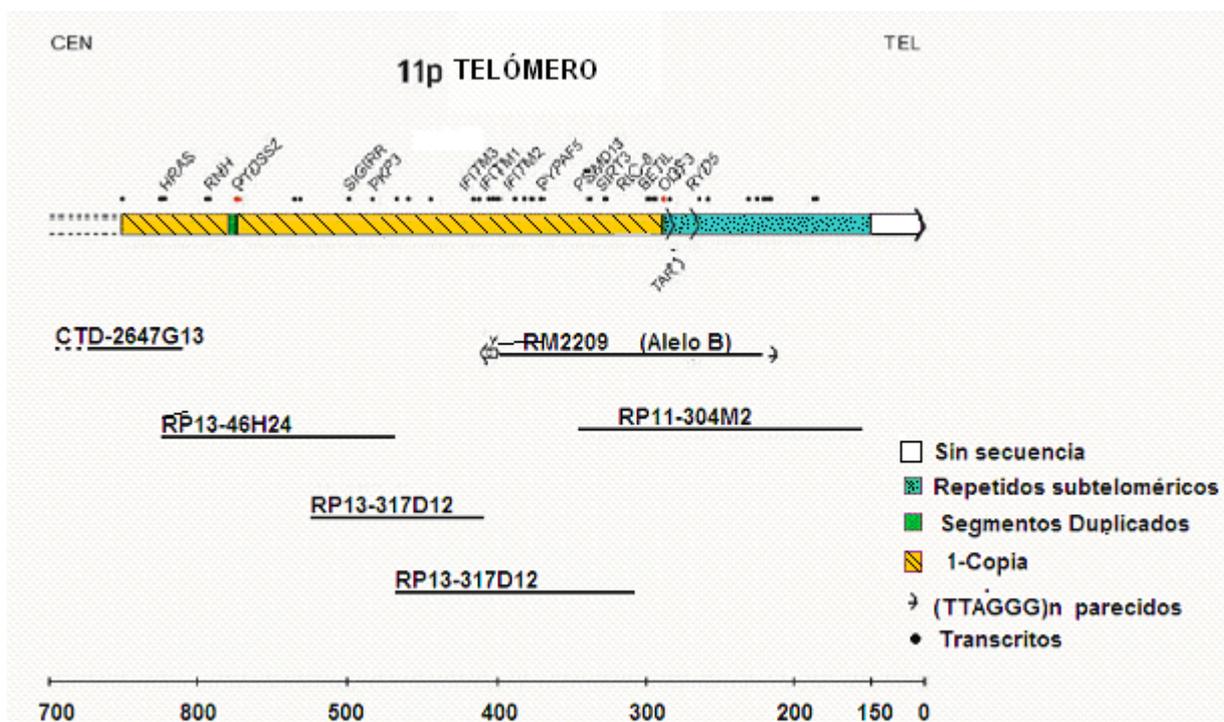


Figura 3. Región subtelomérica del cromosoma 11p. La zona rallada muestra la región de copia única subtelomérica y en la punteada se muestra la región de Srpt, así como respectivos transcritos localizados en esas zonas. La región blanca o sin secuencia, representa una región del subtelómero 11p con gran variabilidad. Tomado y modificado de Riethman *et al*, 2005 [26].

3.8 Variaciones subteloméricas.

Además de la complejidad y gran dinámica que presentan las regiones subteloméricas humanas, se han identificado grandes variaciones en estas zonas. Estas variaciones involucran la presencia de alelos pequeños que difieren de alelos grandes por cientos de kilobases de DNA, provocando la formación de regiones alélicas dispares. Este tipo de eventos promueve la separación de genes de copia única, dando como resultado la generación de polimorfismos. Tanto el origen de los alelos polimórficos como el origen de la secuencia, en muchos casos se desconocen. Sorprendentemente, se han encontrado una gran cantidad de bloques generados por duplicaciones intracromosomales esparcidos por todo el genoma humano, cuyo significado se desconoce, debido principalmente a que los métodos comunes para detectar y analizar las variaciones de los subtelómeros del humano siguen siendo limitados [23, 25- 28].

3.9 Consecuencias funcionales de las variaciones subteloméricas en el genoma humano

Las consecuencias funcionales de las variaciones en las regiones subteloméricas continúa siendo en gran parte especulativa. Sin embargo, se ha observado que las regiones subteloméricas que contienen una gran cantidad de secuencias Srpt son más inestables, aumentando su susceptibilidad. Por esta razón, la dosis génica puede cambiar y una rápida mezcla de segmentos puede generarse [26-27]. Como ejemplo particular de las consecuencias que pueden tener este tipo de variaciones, podemos mencionar el intercambio que se genera en el tandem repetido subtelomérico D4Z4 entre los subtelómeros 4q y 10q. El tamaño del repetido D4Z4 en ambos cromosomas es sumamente variable a nivel poblacional, sin embargo, la pérdida de una región grande de este repetido ubicado en el subtelómero del cromosoma 4 provoca distrofia muscular Facioescapulohumeral (FSHD). El hecho de que la variación de los nucleótidos repetidos en la secuencia D4Z4 entre los alelos 4qA y 4qB sea sumamente elevada, sugiere que el proceso que permite el intercambio intercromosómico de los segmentos repetidos entre los cromosomas 4q y 10q esté modulado por algún proceso de selección o algún tipo de recombinación inusual [33].

4. Reconocimiento de los cromosomas homólogos y recombinación

El reconocimiento, apareamiento, sinapsis de los cromosomas homólogos y la recombinación genética, son eventos comunes a la primera fase de la meiosis de la mayoría de las células reproductivas de los eucariontes. Sin embargo, poco se sabe acerca de los mecanismos que llevan a cabo el reconocimiento temprano de secuencias homólogas, en los que están involucrados eventos como la búsqueda y acercamiento de los cromosomas homólogos desde una gran distancia. Estos eventos están mediados por una gran cantidad de macromoléculas como proteínas, DNA y/o RNA. En este sentido, muchos autores han considerado al DNA como agente primario en la búsqueda de homología, reconocimiento y apareamiento. Se postula, que el alineamiento de los cromosomas es el resultado de la búsqueda de homología, el cual inicia con el mecanismo de rompimiento de la doble cadena del DNA [34].

Por otra parte, diversos autores han planteado la posibilidad de que secuencias homólogas de cromosomas no homólogos estén interactuando entre sí [34-35]. El rompimiento de doble cadena y su proceso de reparación, han sido considerados como los mecanismos más probables por medio de los cuales se generan las interacciones DNA-DNA entre cromátidas no hermanas. La hipótesis más aceptada hasta el momento, se basa en la formación de dúplex complementarios de moléculas de DNA de cromosomas no homólogos [34-35].

Adicionalmente, diferentes grupos de investigación han propuesto que ciertas moléculas pueden funcionar como mediadoras del proceso de reconocimiento [34-35]. Como ejemplo podemos mencionar a la proteína RAD51 (*repair of DNA double strand breaks*), la cual se considera que actúa como mediadora del reconocimiento y apareamiento de cromosomas homólogos en plantas durante la etapa de leptóteno y cigóteno [36-38]. Por otra parte, estudios realizados en núcleos de espermatogonias tipo B de roedores, han revelado la formación de estructuras tipo plumuladas (*lampbrush*) que se forman durante la interfase meiótica, asociándose las regiones homólogas por medio de filamentos múltiples. La formación de estas asas se genera de forma simultánea con la formación del complejo

sinaptonémico durante el leptóteno-cigóteno. Asimismo, se ha observado que estas estructuras pueden estar compuestas por la RNA polimerasa II, ribonucleoproteínas, así como por pequeñas ribonucleoproteínas que podrían ser en realidad las mediadoras del proceso de reconocimiento [33]. Sin embargo, se necesitan más estudios al respecto para poder detallar este proceso. Lo que hasta ahora se puede afirmar, es que el alineamiento cromosómico y la transcripción son eventos relacionados, sugiriendo que los cromosomas homólogos únicamente se pueden reconocer cuando están transcripcionalmente activos [34-35].

En cuanto a los eventos de recombinación, poco se conoce sobre los factores que influyen sobre la frecuencia y distribución de los eventos meióticos de recombinación dentro de los sitios susceptibles o *"hot spots"*. A este respecto, existe un gran interés por entender la distribución de los eventos de recombinación a una escala fina del genoma humano, ya que el dilucidar todos los procesos que están implicados en la recombinación, podrían ayudar a entender los patrones y procesos que pueden estar determinando la diversidad de haplotipos [35]. Es importante mencionar, que tanto las regiones teloméricas como las secuencias subteloméricas Srpts, presentan una estructura y patrón muy parecidos al que presentan los sitios de recombinación *"hot spots"* [39].

Los segmentos duplicados de las regiones subteloméricas han emergido como un factor importante de los rearrreglos cromosómicos que generan una rápida innovación genómica. Sin embargo, debemos recalcar que se desconoce el mecanismo exacto por medio del cual se generan cambios en estas regiones [39]. Además, las regiones subteloméricas contienen genes que desempeñan funciones importantes; sin embargo, presentan una dinámica y plasticidad muy grande. A lo largo de los años, se ha demostrado que la divergencia en el número de copias de DNA subtelomérico ha sido controlada de mejor manera en estas regiones. Esto se puede explicar, debido a que los subtelómeros son mucho más susceptibles a los rompimientos de doble cadena y al intercambio entre las cromátidas hermanas de estas regiones. Adicionalmente, se ha observado que los repetidos subteloméricos pueden favorecer durante la meiosis, el intercambio de secuencias terminales para reparar los rompimientos de doble cadena, generando grandes bloques que difieren entre un alelo y otro,

provocando cambios adicionales. Debido a que estas regiones son muy propensas a sufrir intercambios, este tipo de reparación puede ser una gran ventaja evolutiva al favorecer la generación de nuevos genes. Por otra parte, este mecanismo ha servido como plataforma de diversificación para los haplotipos, donde rápidamente pueden diversificar en regiones genómicas de copia única.

Se ha relacionado a los genes subteloméricos con procesos adaptativos en muchos organismos, sin embargo, su dinámica es complicada. Asimismo, la reparación del rompimiento de doble cadena puede resultar en pérdidas o ganancias de dosis génica en las regiones más distales de DNA de copia única o en cambios con efectos adversos de la regulación génica [34-35, 39-40].

5. Justificación.

Existen múltiples razones para investigar la etiología del retraso mental y proporcionar un diagnóstico preciso. Dentro de estas razones podemos destacar la gran importancia que tienen este tipo de estudios en función del amplio panorama que se abre ante la identificación de nuevos rearrreglos crípticos en humanos, que pudieran contribuir en la identificación de nuevas regiones cromosómicas y genes asociados a la etiología del RM. Por otra parte, existe la enorme necesidad de proporcionar información a los padres sobre los riesgos de recurrencia mediante un adecuado asesoramiento genético, lo que a su vez permitirá planear mejor su vida reproductiva futura, y en el caso que se requiera, ofrecerles un diagnóstico prenatal cuando éste sea posible. Por otra parte es necesario que los pacientes puedan recibir un manejo adecuado y prevenir problemas médicos secundarios al RM.

Hipótesis:

Si alguno de los pacientes seleccionados presenta rearrreglos subteloméricos, entonces una de las causas asociadas con el RMI será los rearrreglos subteloméricos.

Objetivo General:

Identificar rearrreglos cromosómicos subteloméricos en pacientes con RMI

Objetivos Particulares:

- 1) Identificar rearrreglos subteloméricos, pérdidas o ganancias de DNA en pacientes con RMI, mediante hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) subtelomérico ("*Cromoprobe Multiprobe*" y *ToTelVysion Multi-color DNA Probe*) e hibridación genómica comparada (CGH).
- 2) Determinar el tipo y frecuencia de rearrreglos subteloméricos en pacientes con RMI
- 3) Determinar si existen asociaciones entre el tipo de rearrreglo subtelomérico encontrado y el fenotipo del paciente.
- 4) Implementar los sistemas *Cromoprobe Multiprobe*, *ToTelVysion Multi-color DNA Probe* y CGH como pruebas de rutina especializada para pacientes con retraso mental idiopático en el laboratorio de Citogenética del HP del CMNS XXI.

8. Metodología

8.1 Selección del los Pacientes

Se seleccionaron 18 pacientes procedentes de la consulta de Genética del Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI, mediante los siguientes criterios:

- (1) RM de medio a severo ($IQ \leq 70$).
- (2) Retardo en el crecimiento.
- (3) Rasgos dismórficos.
- (4) Cariotipo normal a una resolución ≥ 500 bandas.
- (5) Rango de edad de 1-16 años.

8.2 Extracción de DNA

Se tomaron 5ml de sangre periférica de cada paciente, colocando la sangre en tubos con etilendiaminotetracético (EDTA) al 0.5% como anticoagulante. La muestra se centrifugó por 15 minutos a 420 g a temperatura ambiente.

La capa de glóbulos blancos que queda entre la fase de suero y la fase de glóbulos rojos, se transfirió a un tubo de ensaye, agregándole 15 ml de solución de lisis para glóbulos rojos RCLB (Red Cell Lisis Buffer) (Tris- HCl 10mM, pH 7.6, MgCl₂ 5mM y NaCl 10mM).

Posteriormente la muestra se centrifugó por 10 minutos a 8,232 g, desechando el sobrenadante y repitiendo dos a tres veces más este paso hasta obtener un botón limpio.

La pastilla resultante fue transferida a un tubo Eppendorf de 1.5 ml, adicionando 180 μ l de NaCl 5 mM y 61.3 μ l de SDS al 10%, mezclando y dejando reposar por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 410.6 μ l de NaCl saturado (6M), homogeneizándolo y centrifugando la mezcla durante 15 minutos a 15,120 g a temperatura ambiente, lo cual permite romper las membranas celulares por medio de choque osmótico.

Se recuperó el sobrenadante y se le adicionaron dos volúmenes de etanol al 100%, para precipitar el DNA. Se lavó la pastilla con etanol al 70% para quitar la mayor cantidad de sales, dejándolo secar a temperatura ambiente y diluyéndolo en 400 μ l de agua inyectable.

Por último se cuantificó cada muestra por medio de espectrofotometría a 260/280 para corroborar tanto su cantidad como su pureza.

8.3 Cultivo de linfocitos.

Se tomaron de 2 a 3 ml de sangre periférica de cada paciente por medio de una jeringa previamente heparinizada. La muestra se colocó en tubos con medio de cultivo completo (100 ml de RPMI, 20 ml de suero fetal bovino, 320 µl de fitohemaglutinina, L-glutamina y sulfato de gentamicina). La muestra se dejó incubar a 37°C por 72 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se le agregó a cada tubo 150 µl de colchicina (inhibidor mitótico) por un lapso de 45 minutos, para posteriormente transferir el cultivo a tubos de centrifuga y centrifugar a 420 g a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el botón en 8 ml de solución hipotónica (KCl 0.075 M) (para romper las membranas) dejando la muestra a 37°C por 45 minutos. Transcurrido este tiempo, se le agregó a cada tubo 1 ml de solución fijadora (3:1 metanol-ácido acético) y se centrifugaron los tubos a 420 g a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón en 8 ml de solución fijadora, centrifugando la muestra a 420 g a temperatura ambiente durante 10 minutos. Este último paso se repitió dos veces más hasta obtener el botón limpio. Una vez obtenido el botón, se desechó el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de solución fijadora. Para hacer las laminillas, se tomó la suspensión de células con una pipeta de transferencia, dejando caer de 3-5 gotas sobre cada uno de los portaobjetos.

8.4 Hibridación Genómica Comparada (CGH).

Para realizar esta técnica, el DNA de cada paciente y su control fue marcado por separado por medio de la técnica "*nick translation*" utilizando los siguientes reactivos:

*1ug de DNA (paciente o control).

*1 μ l de *SpectrumGreen* dUTP-biotina 0.2mM (paciente).

*1 μ l de *SpectrumRed* dUTP-digoxigenina 0.2mM (control).

*5 μ l de dTTP, 0.2mM.

*3 μ l de cada dNTPs 0.1 mM.

*5 μ l de solución amortiguadora para *nick translation* 10X (Tris-Hcl 500mM, ph 7.2, MgSO₄ 100mM, DTT 1mM).

*5 μ l de enzima (DNA polimerasa I, DNasa I en 50% de glicerol, Tris-HCL 50mM, pH 7.2, MgSO₄ 10mM, DTT 0.1mM y 0.5 mg/mL de nucleasa libre BSA.

*X μ l de agua libre de nucleasas, para completar el volumen final (50 μ l).

La mezcla se incubó a 15°C durante 55 minutos, deteniendo la reacción a 75°C por 10 minutos. Este tiempo y temperatura fueron las óptimas para poder generar los fragmentos de DNA marcados (sondas) de entre 500 y 1800 pb aproximadamente. Posteriormente se hizo una mezcla de sondas, colocando 10 μ l de sonda control y 10 μ l de sonda del paciente, en presencia de 25 μ l de DNA Cot1 (el cual bloquea las zonas de DNA inespecífico), 2.1 μ l de acetato de sodio 3M y 52.5 μ l (2.5 volúmenes) de etanol al 100%, para precipitar el DNA. Se dejó precipitar la muestra durante 1 hora a -20°C y se centrifugó a 4°C por 30 minutos a 9,676 g. Adicionalmente se removió el sobrenadante y se dejó secar durante 10 minutos a temperatura ambiente, para posteriormente agregar 12 μ l de solución de hibridación (5 ml de formamida, 1.0 ml de 20X SSC, pH 7.0 y 1g de dextran sulfato).

Para la hibridación, se utilizaron laminillas de la marca Vysis con metafases de individuos masculinos sanos. Se seleccionaron las zonas donde el índice de metafases era el más apropiado para llevar acabo la hibridación (aproximadamente 3 metafases por campo 10x). Posteriormente, se desnaturalizó la laminilla en formamida al 70% a 73 \pm 1°C y se deshidrató mediante el paso por una serie de etanoles durante 2 minutos (70%, 80% y 100%). Se aplicaron 10 μ l de la mezcla de sondas (desnaturalizada por 5 minutos a 73 \pm

1°C) sobre la laminilla, dejando incubar las laminillas en una cámara húmeda por 72 horas a 37°C. Una vez transcurrido este tiempo, se colocaron las laminillas en la solución de lavado, 0.4 X SSC 0.3% y NP-40 (2 ml de 20x SSC, 95 ml de agua destilada y 300 µl de NP-40) a una temperatura de 73± 1°C durante 2 minutos. Inmediatamente después se pasaron las laminillas a una segunda solución de lavado 2X SSC y 0.1% NP40 a temperatura ambiente por 2 minutos. Las laminillas se dejaron secar y se les agregó 11 µl de DAPI II (4',6-Diamidino-2-fenilindol Diclrorhidrato), para su posterior análisis al microscopio de fluorescencia (Figura 4).

Las metafases fueron visualizadas mediante el microscopio Axio Images (Carl Zeiss), seleccionando 30 metafases por paciente para su análisis mediante el sistema *ISIS (In Situ Imaging System) de MetaSystems*. Los rangos utilizados para la identificación de pérdidas o ganancias de material fueron de 0.80 (límite mínimo) y 1.20 (límite máximo), respectivamente.

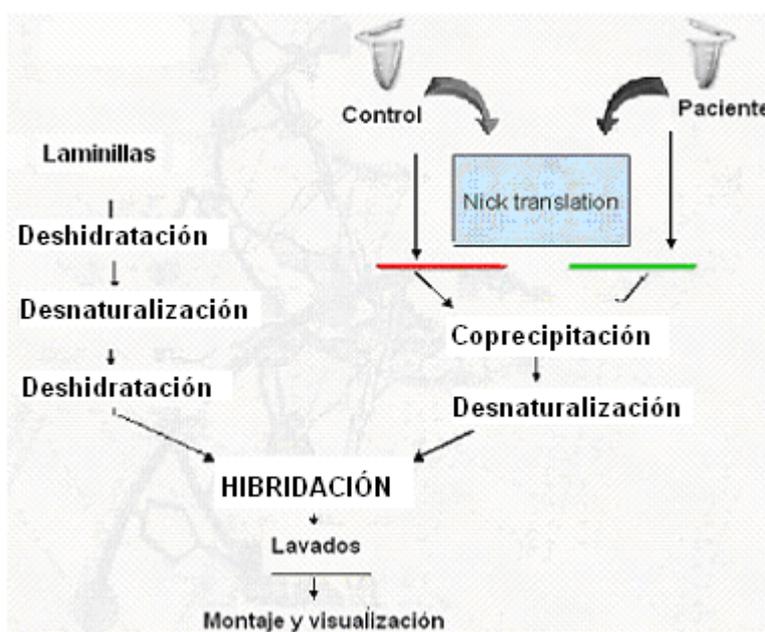


Figura 4. Resumen de los pasos para realizar la Hibridación Genómica Comparada.

8.5 Hibridación *in situ* con Fluorescencia (FISH)

Se tomaron 5 ml de sangre periférica de los pacientes para hacer cultivos de linfocitos y obtener de esta forma laminillas con cromosomas metafásicos. Dos metodologías fueron utilizadas para realizar el FISH subtelo mérico. Es importante destacar que ambas metodologías se basan en la hibridación de sondas contra regiones específicas subtelo méricas de todos los cromosomas humanos (Figura 5).

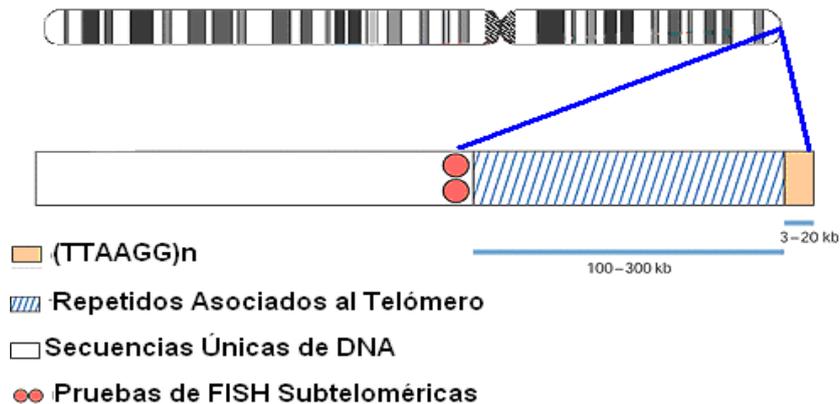


Figura 5. Región sobre la que se hibridan las sondas para subtelo méros.

A) Identificación de rearrreglos subtelo méricos mediante el kit *ToTelVysion Multi-color DNA Probe Mixtures (Vysis)*

Este sistema está conformado por 15 mezclas distintas que contienen las sondas específicas para cada uno de los subtelo méros de los cromosomas humanos, exceptuando los acrocéntricos. Se elaboraron 5 laminillas de cada paciente, las cuales se desnaturalizaron en formamida al 70% a $73 \pm 1^\circ\text{C}$ por 5 minutos y se deshidrataron en series de etanoles (70%, 85% y 100%) por 2 minutos, seleccionando 3 áreas distintas en cada laminilla y agregando $3\mu\text{l}$ de cada mezcla, previamente desnaturalizada a $73 \pm 1^\circ\text{C}$ por 5 minutos, en cada área seleccionada. Posteriormente se dejaron las laminillas en una incubadora por 12 horas a 37°C , para su posterior lavado con $0.4 \times \text{SSC}$ y 0.3% NP-40, a $73 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 2 minutos y $2 \times \text{SSC}$ y 0.1% NP-40 a temperatura ambiente por 2 minutos.

Por último se agregaron 3µl de DAPI II a cada área, colocando un cubreobjetos para el análisis al microscopio de fluorescencia (Figura 6).

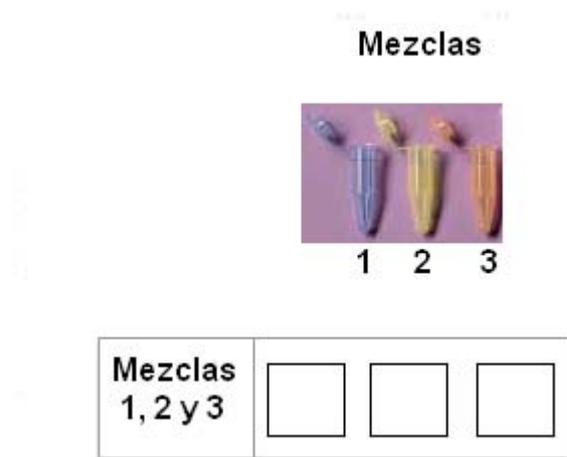


Figura 6. Sistema *ToTelVysion Multi-color DNA Probe Mixtures (Vysis)*

B) Identificación de rearrreglos subtelméricos mediante el kit *Chromoprobe Multiprobe®-System CytoCell*

Mediante este sistema se pueden analizar simultáneamente las regiones subtelméricas de todos los cromosomas humanos, ya que cuenta con 24 pozos que contienen una sonda específica para cada subtélomero. No se requiere hacer laminillas ya que se agrega directamente la suspensión de cromosomas de cada paciente sobre el dispositivo que contiene las sondas específicas. (Figura 7)

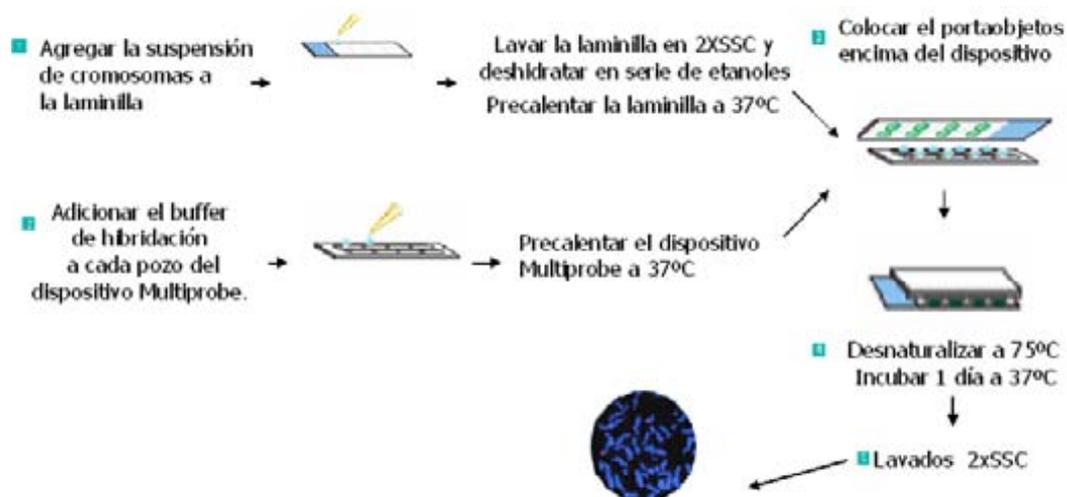


Figura 7. Sistema *Chromoprobe Multiprobe®-System CytoCell*

8.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La secuencia del gen que codifica para el receptor del factor de crecimiento tipo uno parecido a la insulina (IGFR1) del humano, fue obtenida mediante la búsqueda en NCBI en la base de datos de GeneBank. Una vez obtenida la secuencia del gen, se diseñaron los oligos, eligiendo el exón 16 en la posición 170 y el exón 17 en la posición 273, con un tamaño de 21pb de longitud por primer (Tabla 4). Estos parámetros fueron obtenidos mediante el programa Oligo, por medio del cual se determinó el contenido de CG (49.2%) y la diferencia de temperaturas entre los primers (1.1°C)

Tabla 4. Secuencia de los primers para el gen IGF1R de humano. Exones 16-17

| | |
|-------------------|-----------------------------|
| Oligo 3' | |
| Secuencia (5'-3') | TGA GAG GAT TGA GTT TCT CAA |
| Oligo 5' | |
| Secuencia (5'-3') | TGT CAT CAG TTC CAT GAT GAC |

Una vez obtenidas las secuencias de los primers, se estandarizaron las condiciones para llevar a cabo la PCR, utilizando los siguientes reactivos, tiempos y temperaturas (Tabla 5):

1.5 µl de solución amortiguadora (K⁺ 1x)

1 µl de dNTPS (10 mM)

0.5 µl de cada uno de los oligonucleótidos (10 pmol cada uno)

0.2 µl de TagPolimerasa (1.5 µd)

0.6 µl de Mg (1.5 mM)

X µl de DNA (1.2 µg totales de DNA para el paciente y 1.2 µg para el control).

X µl de agua destilada para completar un volumen final de 15µl.

Tabla 5. Tiempos y temperaturas que se utilizaron para llevar a cabo la PCR.

| | | | |
|---|--------------|--------------------|--------------------|
| Activación (desnaturalización inicial) | 95 °C | 10 minutos | |
| Desnaturalización | 95 °C | 45 segundos | } 28 Ciclos |
| Alineamiento | 51 °C | 30 segundos | |
| Extensión | 72 °C | 45 segundos | |
| Extensión final | 72 °C | 10 minutos | |

Una vez que se llevo acabo la reacción, se corrió un gel de agarosa al 2% para verificar el tamaño de los fragmentos obtenidos.

9. Resultados.

9.1 Hibridación Genómica Comparada (CGH).

Para realizar esta prueba, lo primero que se hizo fue corroborar tanto la pureza como la concentración de DNA de cada paciente (Tabla 6). Estos datos fueron de suma importancia ya que a partir de ellos se pudo llevar acabo de forma óptima la prueba de CGH.

Tabla 6. Promedio de los datos obtenidos de concentración y pureza de las muestras de DNA de cada paciente.

| Paciente | DNA ng/μl | Pureza 260/280 |
|----------|-----------|----------------|
| 1 | 189.66 | 1.60 |
| 2 | 297.6 | 1.79 |
| 3 | 250 | 1.76 |
| 4 | 248.5 | 1.70 |
| 5 | 287.4 | 1.91 |
| 6 | 129.66 | 1.70 |
| 7 | 187.66 | 1.97 |
| 8 | 277.3 | 1.69 |
| 9 | 852 | 1.82 |
| 10 | 158 | 1.67 |
| 11 | 181.75 | 1.79 |
| 12 | 131.5 | 1.85 |
| 13 | 135.5 | 1.83 |
| 14 | 247 | 1.89 |
| 15 | 321.5 | 1.74 |
| 16 | 187.66 | 1.81 |
| 17 | 70.6 | 1.62 |
| 18 | 88.33 | 1.44 |

Se estandarizaron las condiciones necesarias para poder obtener los fragmentos deseados de entre 500-1800pb, ya que fragmentos más grandes o más pequeños provocan una mala hibridación que no puede ser analizada. Para esto, fue necesario utilizar el DNA control MPE600 *SpectrumGreen* (0.2μg/μl DNA aislado de células tumorales inmortalizadas de cáncer de mama MPE600), Esta línea celular tiene alteraciones cromosómicas predefinidas:

- 1) Pérdida pequeña cerca de 1pter, ganancia de 1q.

2) Pérdida del 9p.

3) Pérdida distal en el 11q.

4) Pérdida en 16q.

Una vez que se estandarizaron las condiciones y se pudieron observar las pérdidas y ganancias esperadas, se procedió a trabajar con el DNA de los pacientes (Figura 8).

Después de marcar el DNA control y el DNA de los pacientes, se corrió un gel de agarosa al 0.8% para corroborar el tamaño de los fragmentos de DNA marcados

(Figura 9)

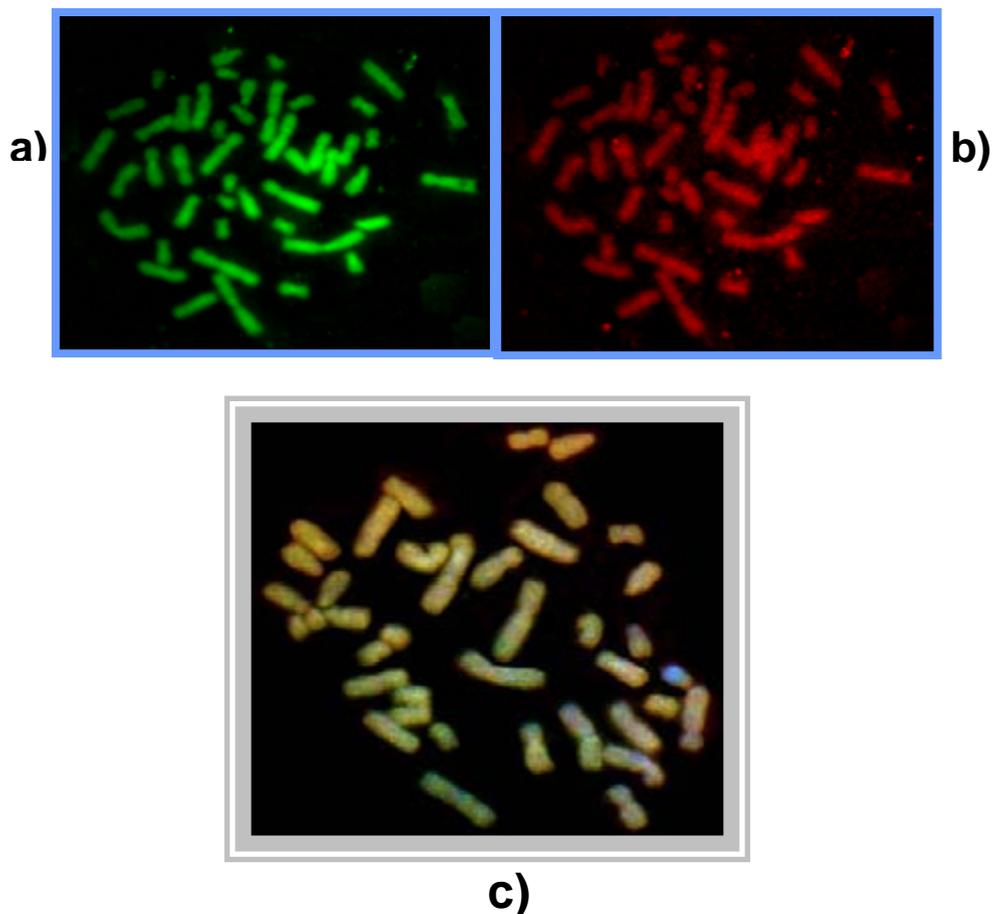


Figura 8. Ejemplos de DNA marcado de los pacientes con; (a) SpectrumGreen y (b) SpectrumRed sobre cromosomas metafásicos. (c) Combinación de SpectrumGreen y SpectrumRed sobre los cromosomas.

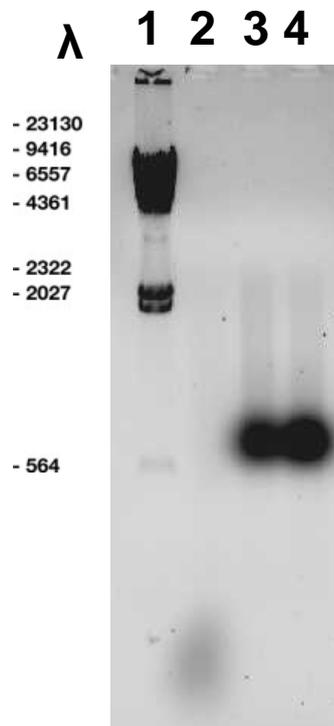


Figura 9. Ejemplo de marcaje y corte de DNA control y paciente. Carril uno muestra el marcador de peso molecular Lambda DNA/HindII. Carriles 2-4 corte de los fragmentos de ente 500 y 1800 pb pacientes (2 y 3) y control (4).

Por medio de esta técnica, se analizaron un total de 18 pacientes con RMI, con el propósito de observar pérdidas o ganancias de fragmentos del genoma completo. El análisis reveló una pérdida subteloamérica de la región terminal del brazo largo del cromosoma 15 (región 15q26.2 -- 26.3 qter), en uno de los pacientes (Figura 10).

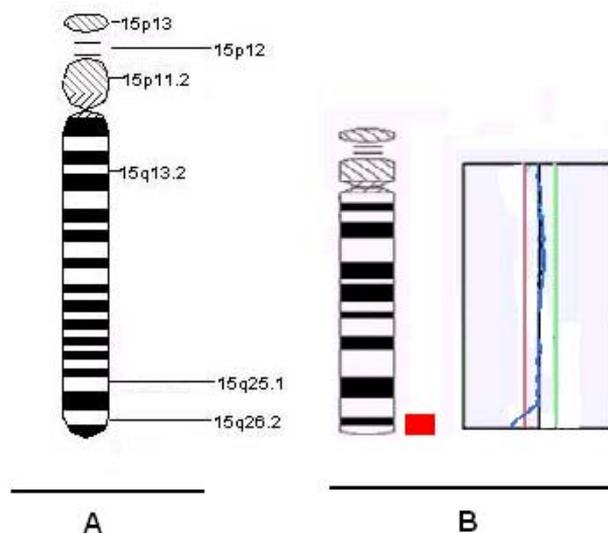


Figura 10. Pérdida encontrada en uno de los pacientes del cromosoma 15q26.2-26.3 por medio del programa ISIS para CGH.

9.2 FISH Subtelomérico

La prueba de FISH para subtelómeros se aplicó a todos los pacientes con el objetivo de hacer un análisis más detallado de todas las regiones subteloméricas de sus cromosomas (Figura11). En uno de los pacientes se encontró, por medio del kit *ToTelVysion Multi-color DNA Probe Mixtures (Vysis)*, un rearrreglo complejo, confirmándose de este modo, una translocación críptica no balanceada de la región subtelomérica 10p/17p. Por medio de esta metodología se observó la ausencia de una señal correspondiente al brazo corto del cromosoma 10 (monosomía parcial del cromosoma 10) y tres señales específicas del brazo corto del cromosoma 17 (trisomía parcial del cromosoma 17) en cada una de las 30 metafases analizadas. La señal adicional fue detectada en la región distal del brazo corto del cromosoma 10. El cariotipo del paciente fue definido como 46,XX, der (10)t(10;17)(p15.3; p13.3) (Figura12). Por otra parte, con la finalidad de confirmar y delimita la región perdida del cromosoma 15 (15q26.2-26.3 qter), que fue detecta por medio de CGH, se aplicó la sonda subtelomérica *TelVysion 15q Spectrum Orange* sobre cromosomas metafásicos del paciente. Sin embargo, se pudieron apreciar ambas señales en los cromosomas 15 del paciente, por lo que, por medio de esta técnica, el resultado fue negativo para la región perdida (Figura 13 y 14).



Figura 11. Prueba de FISH subtelomérico. Se muestra la correcta hibridación de las regiones subteloméricas para los cromosomas (a) tres y (b) veinte.

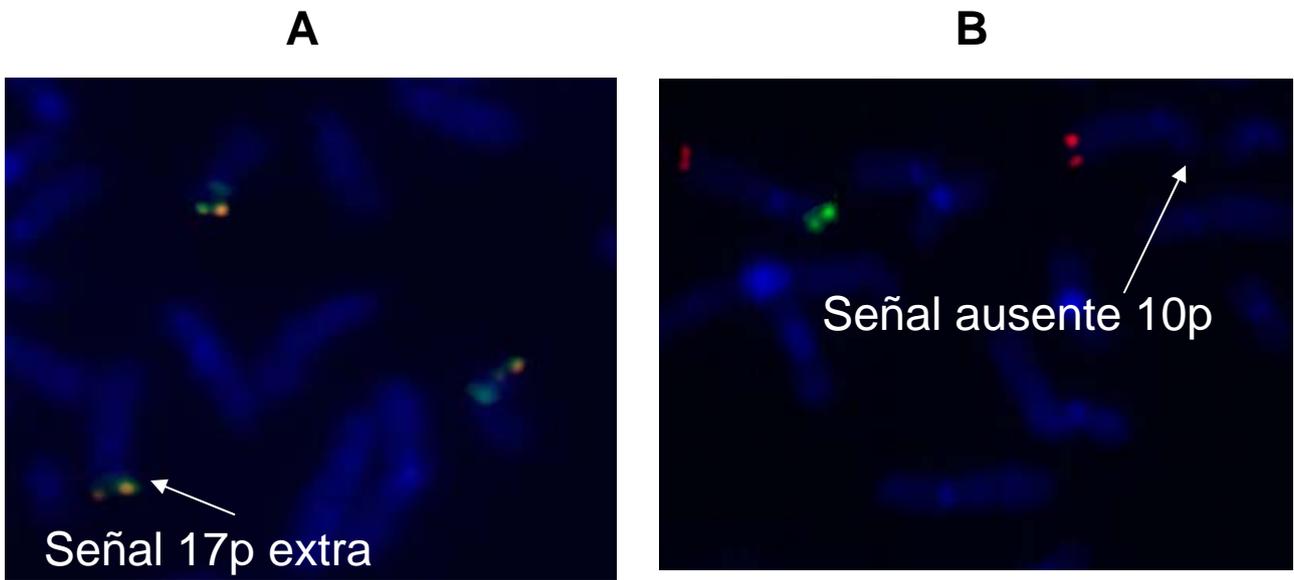


Figura 12. Translocación no balanceada encontrada en un paciente. Panel A muestra la duplicación parcial del cromosoma 17p. Panel B muestra la pérdida de la región 10p

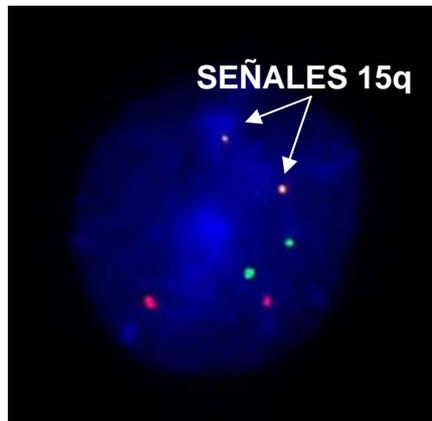


Figura 13. FISH subtelo mérico para la región 15q (amarillo) y la región subtelo mérica 10 p y q (verde y rojo) del paciente con la pérdida distal del cromosoma 15.

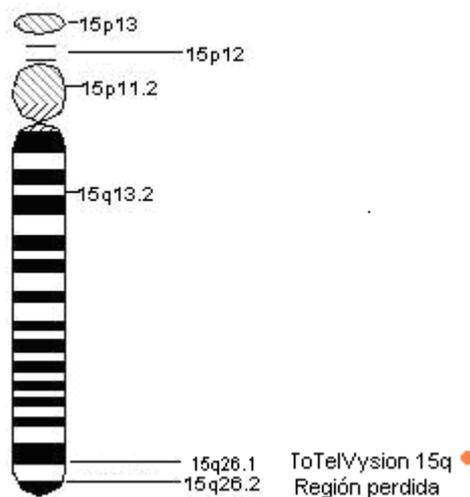


Figura 14. Se muestra la región específica contra la que hibrida la sonda para subtelo meros ToTelVysion 15q (15q 26.1), así como la región perdida detectada por medio de CGH (15q26.2-26.3).

9.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Debido a que la pérdida 15q 26.2-26.3 comprende la región donde se encuentra el gen IGF1R, se realizó la PCR tiempo final, mediante la cual se pudo confirmar la presencia del gen IGF1R, al obtener el fragmento esperado de 388pb que corresponde a la región de los exones 16 y 17 del gen IGF1R de ambas muestras (tanto paciente como control positivo) (Figura15). Debido a que el gen IGF1R se encuentra implicado en vías importantes del desarrollo y que no existe en la naturaleza individuos con pérdida de ambos alelos (ya que esto es letal) [41-42], mediante esta metodología se trató de observar si existían diferencias significativas en el producto amplificado del paciente contra una muestra control (persona sana), sin embargo, a pesar de que se agregaron 1.2 µg de DNA de ambas muestras no se obtuvieron resultados concluyentes, por lo que se necesita aplicar una metodología más específica para medir la diferencia real de amplificado entre la muestra del paciente y de un control positivo.

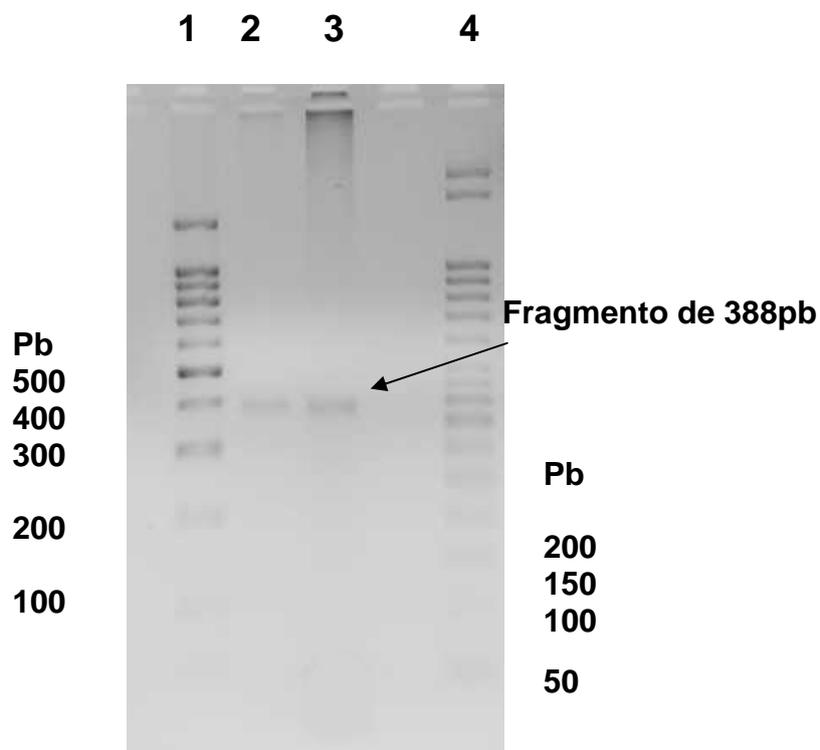


Figura 15. Carril 1 muestra el marcador de peso molecular de 100pb, carril 2, banda amplificada del control positivo para IGFR1, carril 3, banda amplificada del paciente para IGFR1 de 388pb, carril 4, marcador de peso molecular de 50pb.

9.4 Características clínicas encontradas en los pacientes.

Las características fenotípicas que muestra el paciente con la región distal perdida en el cromosoma 15, son muy parecidas a las reportadas para otros pacientes que tienen perdida o alterada esta región. Por lo que se compararon las características fenotípicas reportadas en otros estudios con las de nuestro paciente (Tabla7).

Tabla 7. Comparación de las características encontradas en pacientes con delección distal 15q. Modificada de Pinson *et al.*, 2005 [43].

| | Roback <i>et al.</i> , 1991 [44] del 15q26.1 | Siebler <i>et al.</i> , 1995 [45] del 15q26.1 | Tonnies <i>et al.</i> , 2001 [46] del 15q26.1 | Okubo <i>et al.</i> , 2003 [47] del 15q 26.1 | Pinson <i>et al.</i> , 2005 [43] del 15q26.2 | Paciente CMN SXII 15q26.2-26.3 |
|-------------------------------------|--|---|---|--|--|--------------------------------------|
| Dismorfismos | | | | | | |
| Cara triangular | - | + | - | + | + | + |
| Microftalmia | + | - | - | + | - | + |
| Hipertelorismo | + | - | - | - | - | + |
| Paladar alto | + | + | - | - | - | - |
| Oídos anormales | + | + | + | - | - | + |
| Micrognatia | + | + | + | + | + | + |
| Cubitus valgus | - | + | - | - | + | - |
| Braquio/clino-dactilia | + | + | - | + | + | + |
| Implantación anormal del pulgar | + | + | - | - | + | - |
| Malformaciones en las manos y pies | - | + | - | - | + | + |
| Otros defectos | | | | | | |
| Cardiacos | + | - | - | + | - | + |
| Hipoplasia de pulmón | - | - | + | + | - | - |
| Renales | + | - | - | - | - | - |
| Piel | - | - | + | - | - | + |
| Desarrollo Psicomotor | | | | | | |
| Retraso en el desarrollo | + | - | + | + | + | + |
| Retraso en el habla | + | + | - | + | + | + |
| Hipotonía | - | - | + | + | + | + |
| Retraso en el crecimiento | | | | | | |
| Problemas de alimentación | + | - | + | - | + | - |
| Anormalidades urogenitales | + | - | + | + | + | - |
| Retardo en el crecimiento postnatal | - | + | + | + | + | + |

En el caso de la translocación críptica no balanceada de la región subtelomérica 10p/17p, es importante mencionar, que no ha sido reportado hasta el momento un rearrreglo semejante al encontrado en el presente trabajo. Sin embargo, en la literatura

podemos encontrar casos en los que se encuentra involucrada la pérdida de la región subtelomérica del brazo corto del cromosoma 10 (monosomía parcial del cromosoma 10) (Tabla 8), así como trisomías parciales del cromosomas 17p [48].

Las sondas específicas que se utilizaron para este estudio fueron; (1) la sonda TelVysion 10p Spectrum Green para el locus específico Z9139 (GenBank), el cual corresponde al gen DIP2C (*disco-interacting protein 2 homolog C (Drosophila)*). Este locus se encuentra ubicado en la región subtelomérica específica 10p15.3 y (2) la sonda TelVysion17p Spectrum Green para el locus específico 282M16/sP6, el cual se encuentra ubicado en la región subtelomérica específica 17p13.3

Tabla 8. Comparación de las características clínicas en pacientes reportados con pérdida de la región 10p14-pter y 10p15-pter y nuestro paciente. Modificada de Ross *et al*; 2006 [48].

| | Bourrouillou <i>et al.</i> , 10p14-pter 1981[49]. | Fryns <i>et al.</i> , 10p14-pter 1981[50]. | Suciu <i>et al.</i> , 10p14-pter 1983[51]. | Kinoshita <i>et al.</i> , 10p14-pter 1992[52]. | Ross <i>et al.</i> , 10p15-pter 2006[48]. | Paciente CMN SXII 10p15-pter |
|-----------------------------------|---|--|--|--|---|------------------------------|
| Dismorfias Cranio-faciales | | | | | | |
| Microcefalia | + | - | + | + | + | + |
| Nariz pequeña | + | + | + | + | + | + |
| Implantación baja de orejas | + | - | - | - | - | - |
| Anormalidades del paladar | - | - | - | + | - | + |
| Retrognathia | - | + | + | + | + | + |
| Hipoplasia de la mitad de la cara | + | - | + | + | - | + |
| Extremidades anormales | | | | | | |
| Displasia manos/pies | + | - | - | - | - | + |
| Malformaciones congénitas | | | | | | |
| Anormalidades cardíacas | + | - | - | + | + | - |
| Anormalidades urogenitales | - | - | + | - | Criptorquidismo | + |
| Anormalidades cerebrales | + | + | - | + | - | + |
| Desarrollo | | | | | | |
| Retardo en el crecimiento | - | + | + | + | + | + |
| Retraso mental | + | + | + | + | + | + |

10. Discusión

Los subtelómeros humanos son regiones dinámicas, altamente polimórficas, en las cuales grandes segmentos de DNA pueden estar presentes o ausentes en alelos normales. Estas regiones del genoma humano, contienen cerca de 25 familias de genes con aproximadamente un gen por cada 30kpb. Por lo que, ganancias, pérdidas o alteraciones en estas secuencias tienen un efecto fenotípico potencial. Desde la perspectiva genómica, las regiones subteloméricas son sumamente interesantes, ya que son ricas en genes y frecuentemente, se encuentran involucradas en rearrreglos cromosómicos. En este sentido, un importante número de desbalances subteloméricos crípticos asociados a retraso mental han sido reportados en la literatura [26,28-29].

En el presente trabajo, se estudió a un total de 18 pacientes con RMI, utilizando diferentes técnicas de hibridación (CGH y FISH) con el objetivo de detectar alteraciones subteloméricas.

Los estudios realizados por medio de CGH, revelaron una pérdida de la región subtelomérica del cromosoma 15 en uno de los pacientes, mientras que los estudios realizados con FISH para las regiones subteloméricas, detectaron una translocación críptica no balanceada de la región subtelomérica 10p/17p (46 XX,der (10)t(10;17)(p15.3; p13.3), en otro de los pacientes. En ambos casos los padres resultaron normales al ser analizados mediante bandeo GTG (>500 bandas) y CGH, por lo que se determinó que ambos rearrreglos fueron *de novo*. Por otra parte es importante mencionar, que la técnica de FISH es la prueba por excelencia para detectar cambios en el número de copias, rearrreglos balanceados y no balanceados, probando ser eficiente para este estudio en particular. Por otra parte, la técnica de CGH mostró tener el potencial para identificar aberraciones que son difícilmente detectadas por otras técnicas. Sin embargo cabe destacar que la translocación no balanceada encontrada en uno de los pacientes no fue detectada mediante de la técnica de CGH. Sugiriendo que las regiones involucradas en el rearrreglo son menores a 5 Mb.

Además, con el objetivo de delimitar la región perdida del cromosoma 15 que se encontró por medio de la técnica de CGH, se aplicó la sonda subtelomérica para esta región, sin embargo, la pérdida no pudo ser confirmada con dicha sonda. Este resultado no contradice lo encontrado por medio de CGH, ya que la sonda subtelomérica TelVysion 15q Spectrum Orange se hibridó en una región subtelomérica distinta (15q26.1) a la afectada en el paciente (15q26.2-26.3) [43,46].

Otro aspecto importante es que la frecuencia detectada en este estudio (11.11%) fue mayor a la frecuencia reportada en la literatura (5-10%) [9, 11]. Esto es atribuido a los criterios de selección que fueron tomados para la selección de los pacientes en nuestro trabajo. En este sentido, el utilizar criterios bien establecidos para seleccionar a los pacientes ha demostrado tener una mayor eficiencia para encontrar este tipo de rearrreglos [9, 11, 53].

La pérdida de segmentos que involucran la región terminal del cromosoma 15q son muy poco frecuentes, reportándose hasta hoy, sólo doce casos con pérdidas distal de esta región [36-38]. Alrededor de 60 genes han sido asociados a la región 15q 26.2-26.3 y podrían estar involucrados en la etiología del retraso mental. Se ha demostrado que las pérdidas terminales en esta región, frecuentemente involucran la pérdida de un alelo del gen para el receptor del factor de crecimiento parecido a la insulina tipo 1 (IGF1R) [43].

El IGF1R es una proteína transmembranal de tipo tirosina-cinasa que es indispensable para el control del crecimiento celular, con fuertes implicaciones en el desarrollo del sistema nervioso central [54]. En este sentido, se ha estudiado ampliamente la relación entre IGF1R y el crecimiento tanto prenatal como postnatal asociado a la pérdida distal 15q. Sin embargo, hasta el momento no se han obtenido resultados concluyentes. No obstante, los pacientes que presentan la pérdida de la región distal 15q o cromosomas 15 en anillo, comúnmente presentan retraso en el desarrollo [41-42, 54-56], sugiriendo, que la hemicigosis de este gen puede alterar diversas vías, provocando un crecimiento anormal de los pacientes. Además, se ha propuesto que la pérdida de una copia del

gen IGF1R contribuye de forma importante en los problemas cardiacos que presentan los pacientes con esta pérdida [54-56].

Para tratar de confirmar si la pérdida del cromosoma 15 encontrada en el paciente incluye la región del gen IGF1R, se realizó un PCR tiempo final. Sin embargo, debido a que este gen se encuentra perdido sólo en uno de los dos cromosomas afectados, los resultados no fueron concluyentes por medio de esta metodología. En este sentido es importante destacar que, debido a que el IGF1R es de suma importancia para el desarrollo, la pérdida de ambas copias del gen no es viable en la naturaleza [43]. Por esto se propone como estrategia a seguir, realizar un PCR tiempo real (qPCR), para medir las diferencias de cantidad de transcrito de este gen entre el paciente y un control negativo (persona sin la pérdida). Por otra parte, en esta región del cromosoma 15, se localiza el gen *Myocyte Enhancer Factor 2A* (MEF2A), el cual ha sido postulado como candidato para entender los defectos cardíacos que presentan los pacientes con pérdidas de la región 15q [43]. Este gen codifica para una proteína reguladora de unión a DNA, encargada de promover la diferenciación de las células precursoras del mesodermo a mioblastos y, por lo tanto, es una proteína esencial para el desarrollo de los miocitos cardiacos. Los miembros de la familia MEF2, se caracterizan por ser potentes mediadores de la transcripción, aunque recientemente se demostró que MEF2 se encuentra involucrado en la morfogénesis de neuronas, lo cual da la pauta para sugerir que este gen regula procesos del desarrollo y, de esta manera, influir en el retraso mental [43].

Adicionalmente, en esta región se determinó la presencia del gen *Carbohydrate (Chondroitin) Synthase 1* (CHSY1), el cual codifica para la proteína condroitin sulfato. Esta proteína es un glicosaminglicano que se expresa tanto en la superficie celular como en la matriz extracelular. Las cadenas de los glicosaminglicanos pueden unirse covalentemente a un gran número de proteínas, regulando procesos biológicos de gran importancia como proliferación, reconocimiento celular, morfogénesis, entre otras [43].

En diferentes estudios, se ha mostrado la importancia que estos genes tienen en diversos procesos biológicos y durante el desarrollo [41-42, 54-56], por lo que se han implicado en el retraso mental, en el retraso del desarrollo, así como con problemas cardiacos. Sin embargo, debemos recalcar que existen más de 60 genes reportados para esta región, de los cuales, en muchos casos se desconoce su función. Por lo anterior, no podríamos afirmar cuál de ellos está directamente implicado tanto en el retraso mental como en las otras características fenotípicas que presentan los pacientes con estas pérdidas distales. Bajo esta perspectiva, debemos mencionar que aún cuando no se ha podido delimitar con exactitud el tamaño de la pérdida (15q26.2-26.3) que se detectó mediante CGH, el paciente coincide con muchas características que han sido reportadas en los casos con este tipo de pérdidas distales [54-56]. Entre los rasgos dismórficos y problemas secundarios más importantes que podemos mencionar se encuentran: cara triangular, micrognatia, defectos cardiacos, retraso en el desarrollo, retraso en el habla, hipotonia, manchas color café claro en la piel, retraso mental, etc. [41, 54-56].

En el caso de la translocación no balanceada que fue encontrada por medio de FISH subtelomérico en otro de los pacientes, debemos recalcar que no ha sido reportado en la literatura ningún caso clínico con este tipo de rearrreglos subteloméricos entre el cromosoma 10p y el cromosoma 17p. Sin embargo, podemos encontrar en la literatura ejemplos de translocaciones no balanceadas, en las cuales se ven involucradas las regiones subteloméricas de distintos cromosomas [48-49]. Las monosomías parciales del cromosoma 10p han sido reportadas con frecuencia en la literatura [50]. Por lo que, al comparar las características fenotípicas del paciente con la translocación, se pudo observar la coincidencia de muchas características reportadas en monosomía parcial del 10p. Entre las características más importantes, podemos mencionar: retraso en el desarrollo, RM, dismorfías cráneofaciales, malformaciones congénitas, etc. Sin embargo, nuestro paciente no presenta completamente la apariencia de los casos reportados para monosomías parciales 10p. En este sentido, la presencia de otras

características dismórficas asociadas, podrían ser atribuidas a la trisomía parcial del cromosoma 17p. [48-52].

La sonda específica que fue utilizada para este estudio, hibrida en la región subtelomérica específica 10p15.3 (locus Z9139). Esta región resultó ausente en el paciente con la translocación no balanceada, sin embargo, no podemos definir si las regiones adyacentes a este locus se encuentran también perdidas. Cerca de 25 genes han sido reportados para la región 10p15.3, de los cuales aun no se sabe cuál de ellos podría estar generando el RM, el retraso en el desarrollo, las dismorfías faciales, etc. Por otra parte, debemos mencionar que la trisomía parcial del cromosoma 17p en el paciente también es de suma importancia, ya que la región extra que se translocó a la región perdida del cromosoma 10p, contienen una gran cantidad de genes que podrían estar asociados al RM.

Estudios recientes [57] han demostrado que la formación de este tipo de arreglos cromosómicos complejos (CCR), son mucho más difíciles de entender de lo que se pensaba. La mayor parte de las anomalías cromosómicas, son provocadas por rearrreglos simples que involucran dos o más puntos de ruptura en uno o dos cromosomas. Sin embargo, la arquitectura del genoma es muy compleja y los CCR han sido asociados a regiones de repetidos cortos o "*low-copy-repeat*" (LCR) [57-59]. Los LCRs se encuentran presentes en más de una copia en el genoma, presentando un tamaño aproximado de 1kb y un 90% de similitud de secuencia. Estas secuencias predisponen la formación de rearrreglos de DNA como duplicaciones, pérdidas o translocaciones que son de gran importancia, ya que frecuentemente involucran fragmentos de genes o genes completos. La región proximal del brazo corto del cromosoma 17 ha sido asociada con una gran variedad de aberraciones cromosómicas recurrentes, que son el resultado de recombinaciones homólogas no alélicas entre los múltiples LCRs que han sido reportados para este cromosoma. Entre los LCRs más estudiados del cromosoma 17p que provocan este tipo de recombinaciones homólogas no alélicas, encontramos desórdenes genéticos como el síndrome Charcot-Marie-Tooth

tipo 1A, la neuropatía heredable, el síndrome de Smith-Magenis, así como el síndrome de Potocki-Lupski asociado a una duplicación de la región 17p11.2 [57-59].

Vissers y sus colaboradores (2007), reportaron dos casos de rearrreglos complejos en los cuales se encontró implicada la región del subtélomero del cromosoma 17p, observando la presencia de LCRs en los puntos de ruptura de los CCR. Contribuyendo de forma importante al darnos un posible mecanismo por medio del cual se puede genera este tipo de CCR [57-59].

La sonda utilizada para estudiar la región subtelomérica 17p, hibrida en el locus específico 282M16/SP6, el cual corresponde a la región 17p13.3. En esta región se encuentran localizados alrededor de 107 genes, entre los cuales cabe destacar, la gran cantidad de genes para receptores olfatorios (OR) que se encuentran ubicados en el subtélomero de este cromosoma [59-60]. Los OR pertenecen a la superfamilia de proteínas transmembranales denominadas proteínas G y representan una de las familias de multigenes mas grandes en el genoma de vertebrados. Cabe destacar que el número de genes de OR varía ampliamente entre especies, aumentando o disminuyendo el número de genes de forma paralela con el sentido del olfato en cada especie. Los genes OR de mamíferos se encuentran ampliamente distribuidos a lo largo de los cromosomas, encontrándose en todos los cromosomas, exceptuando el 20 y el Y [61].

Se ha reportado en la literatura que estas regiones OR, frecuentemente están involucrados en apareamientos desiguales, promoviendo translocaciones entre distintas regiones del genoma. [60-61].

Por otra parte, es importante mencionar, que los casos de trisomías parciales subteloméricas del cromosoma 17p siempre involucran rearrreglos complejos con otros cromosomas, por lo que no se sabe con exactitud cuáles son las características fenotípicas que provoca un evento de este tipo. Sin embargo, podemos mencionar algunas características encontradas en pacientes [57-58] que coinciden con nuestro caso, como son: clinodactilia, anomalías en pabellón auricular, facies asimétricas

discretas, fontanela anterior anormal, hemangiomas en rostro, entre otras. Este tipo de rearrreglos subteloméricos crípticos desbalanceados que generan aneuploidias y desbalances en la dosis génica, representan un número importante de casos de RM asociado con malformaciones congénitas [57].

Por otra parte, en este trabajo se pudo corroborar la utilidad de las metodologías utilizadas, observando que ambas se complementan, proporcionando un análisis mucho más detallado y preciso de rearrreglos crípticos subteloméricos que no pudieron ser detectados por medio de citogenética convencional (bandas GTG).

Por último, es importante mencionar, que en cuanto a la función y consecuencias de los genes que se encuentran involucrados en pérdidas, duplicaciones o rearrreglos complejos encontrados en pacientes con RM, falta mucho por estudiar. En este sentido, un gran número de investigadores [62-63] han comenzado a estudiar en el cerebro, los mecanismos por medio de los cuales determinados genes implicados en el desarrollo tanto de neuronas como directamente en desórdenes neurológicos o RM, son modulados por la ausencia o presencia de ciertas moléculas en el cerebro. Algunos de los mecanismos propuestos hasta el momento involucran la presencia de RNAs pequeños o microRNAs, los cuales llevan a cabo funciones de regulación en el desarrollo de patologías o desordenes neurológicos en el cerebro humano, especialmente durante el desarrollo neuronal [62-63]. Por otra parte, es importante mencionar, que aun cuando solo el 1.2% del genoma de mamíferos codifica para proteínas, la mayor parte del genoma se transcribe, generando de esta manera patrones complejos de transcritos entrelazados y sobrelapados denominados RNAs no codificantes (ncRNA) [63]. Mercer y colaboradores en el 2007 [63], identificaron 849 transcritos (ncRNA) con poca o ninguna capacidad de codificar para proteínas, expresándose específicamente en distintas regiones del cerebro del ratón adulto [64].

En este sentido, los desordenes neurológicos en el cerebro humano así como enfermedades o síndromes que involucran un inadecuado funcionamiento del cerebro son sumamente complejos y se requiere de la intervención de múltiples disciplinas

científicas que contribuyan a entender los mecanismos por medio de los cuales son provocados o modulados durante el desarrollo y etapas posteriores.

11. Conclusiones.

- 1.-Las anormalidades cromosómicas como las pérdidas, duplicaciones y translocaciones críticas de las regiones subteloméricas constituyen una de las causas del RMI.
- 2.- La frecuencia de rearrreglos subteloméricos encontrada en los pacientes coincide con la reportada en la literatura.
- 3.- Ambas técnicas utilizadas en este trabajo probaron ser eficientes y complementarias para la búsqueda de rearrreglos subteloméricos en pacientes con RM.
- 4.- Las características reportadas para los rearrreglos encontrados en nuestros pacientes coincidieron con las reportadas para pacientes con las mismas pérdidas o translocaciones.
- 5.- Se reporta una nueva translocación no balanceada entre las regiones subteloméricas de los cromosomas 10p y 17p.

ABREVIATURAS

array-CGH. Microarreglos de hibridación genómica comparada

CCR. Rearreglo Cromosómico Complejo

CGH. Hibridación Genómica Comparada

CHSY1. Carbohydrate (Chondroitin) Synthase1

FISH. Hibridación *in situ* con Fluorescencia

HR-CGH. Hibridación genómica comparada de alta resolución

IGF1R: Receptor del Factor de Crecimiento Parecido a la Insulina tipo 1 (*Insulin Growth Factor 1 Receptor*)

IQ. Coeficiente Intelectual

ISIS. *In Situ Imaging System*

LCRs. Repetidos cortos (*low copy repeats*)

MAPH. Multiplex amplification and probe hybridization

MEF2A. Myocyte Enhancer Factor 2A

MLPA. Multiplex ligation –dependent probe amplification

OR. Receptores Olfatorios

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa tiempo real

RM. Retraso Mental

RMI. Retraso Mental Idiopático

rpm. Revoluciones por minuto

Srpts. Secuencias subteloméricas repetidas

WCP. Whole chromosome paint

12. Bibliografía.

- 1.-Guitart-Feliubadalo MA, Brunet-Vega S, Villatoro-Gómez N, Baena-Diez E. Gabau V. 2006. Causas cromosómicas que originan el retraso mental: alteraciones cromosómicas diagnosticables en el paciente. *Rev Neurol.* 42:S21 S26.
- 2.- Rio MF, Molinari S, Heuertz C, Ozilou P, Gosset O, Raoul V, Cormier-Daire J, Amiel S, Lyonnet M, Le Ferrer C, Turleau MC, de Blosi M, Prieur S, Romana M, Vekemans A, Munnich L, Colleaux L. 2002. Automated fluorescent genotyping detects 10% of cryptic subtelomeric rearrangements in idiopathic syndromic mental retardation. *J Med Genet.* 39:266-270.
- 3.- Milá-Recasens M, Rodríguez-Revenga BL, Madrigal-Bajo L. 2006. Diagnóstico del retraso mental de origen genético. Protocolo de estudio. *Rev Neurol.* 41:S103-S117.
- 4.-Rodríguez-Andrés C, Delgado-Najero J, Bellón Vázquez A. 2006. Epidemiología del retraso mental de origen genético. Análisis de la necesidad, importancia, objetivos, características, utilidad y limitaciones de un registro de casos de retraso mental de origen genético. *Rev Neurol.* 42:S7-S13.
- 5.-Lao-Villadóniga JI, 2001. Diagnóstico y asesoramiento genético en el retraso mental. *Rev Neurol.* 33:S1-S6.
- 6.- Flint J, Bates GP, Clark K, Dorman A, Willingham D, Roe BA, Micklem G, Higgs DR, Louis EJ. 1997. Sequence comparison of human and yeast telomeres identifies structurally distinct subtelomeric domains. *Hum Mol Genet.* 6:1305-1313.
- 7.-Rodríguez-Revenga BL, Madrigal-Bajo I, Milá-Recasens M. 2006. Retraso mental de origen genético. *Rev Neurol.* 43:S181-S186.
- 8.-Dave BJ, Sanger BG. Role of Cytogenetics and Molecular Cytogenetics in the Diagnosis of Genetic Imbalances. 2007. *Semi Pediatr Neurol.* 14:2-6.
- 9.- Knight SJ, Regan A, Nicod S, Horsley W, Kearney L, Homfray T, Winter RM, Bolton P, Flint J. 1999. Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet.* 354:[1659-60](#).
- 10.- Davies AF, Kirbuy TL, Docherty Z, Ogilve CM. 2003. Characterization of Terminal Chromosome Anomalies Using Multisubtelomere FISH. *Am J Med Genet A.* 120A:483-489.
- 11.-Flint J, Knight SJ.2003. The use of telomere probes to investigate submicroscopic rearrangements associated with mental retardation. *Curr Opin Genet Dev.* 13:310-316.
- 12.- Joyce CA, Dennis NR, Cooper S, Brown CE. 2001. 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* 109:440-451.
- 13.- Rodríguez-Revenga L, Badenas C, Sánchez A, Mollolas J, Carrió A, Pedrinaci S, Barrionuevo JL, Milá M. 2004 Cryptic chromosomal rearrangement screening in 30 patients with mental retardation and dysmorphic features. *Clin Genet.* 65:17-23.

- 14.- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. 1992. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 258: 818-821.
- 15.- Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D. 1994. Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 10:231-243.
- 16.- Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. 1993. Comparative genomic hybridization: a rapid new method for detecting and mapping DNA amplification in tumors. *Semin Cancer Biol*. 4:41-46.
- 17.- Ledbetter HD, Lese Martin C. 2007. Cryptic Telomere Imbalance: A 15-Year Update. *Am J Med Genet A. Part C. Semin Med Genet*. 145C:327-334.
- 18.- Blouin JL, Christie DH, Gos A, Lynn MA, Morris DH, Ledbetter A, Chakravarti S, Antonarakis E. 1995. A new dinucleotide repeat polymorphism at the telomere of chromosome 21q reveals a significant difference between male and female rates of recombination. *Am J Hum Genet*. 57:388-394.
- 19.- Biesecker LG. 2002. Coupling genomics and human genetics to delineate basic mechanisms of development. *Genet Med*. 4:39S-42S.
- 20.- Ravnán JB, Tepperberg JH, Papenhausen P, Lamb AN, Hedrick J, Eash D, Ledbetter DH, Martin CL. 2006 Subtelomer FISH analysis of 11 688 cases: An evaluation of subtelomer rearrangements in individuals with developmental disabilities. *J Med Genet*. 43:478-489.
- 21.- Ballif BC, Sulpizio SG, Lloyd RM, Minier SL, Theisen A, Bejjani BA, Shaffer LG. 2007. The clinical utility of enhanced subtelomeric coverage in array CGH. *Am J Med Genet. Part A*. 143A:1850-1857.
- 22.- Ledbetter HD, Lese Martin C. 2007. Cryptic Telomere Imbalance: A 15-Year Update. *Am J Med Genet. Part C. Semin Med Genet*. 145C:327-334.
- 23.- De Vries BBA, Winter R, Schinzel A, van Ravenswaaij-Arts C. 2003. Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. *J Med Genet*. 40:385-398.
- 24.- Knight SJ, Flint J. 2000. Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. *J Med Genet*. 37:401-409.
- 25.- Mefford HC, Trask BJ, 2002. The Complex Structure and Dynamic Evolution of Human Subtelomeres. *Nat Rev Genet*. 3: 91-95.
- 26.- Riethman H, Ambrosini A, Paul S. 2005. Human subtelomere structure and variation. *Chromosome Research*. 13:505-515.
- 27.- Hills M, Jeyapalan JN, Foxon JL, Royle NJ. 2007. Mutation mechanisms that underlie turnover of a human telomere-adjacent segmental duplication containing an unstable minisatellite. *Genomics*. 89:480-489
- 28.- Azzalin CM, Nergadze SG, Giulotto E. 2001. Human intrachromosomal telomeric-like repeats: sequence organization and mechanisms of origin. *Cromosoma*. 110:75-82.

- 29.-Modello C, Pirzio L, Azzalin CM, Giulotto E. 2000. Instability of interstitial telomeric sequences in the human genome. *Genomics*. 68:111-117.
- 30.- Ruiz-Herrera A, Garcia F, Azzalin C. 2002. Distribution of intrachromosomal telomeric sequences (ITS) on *Macaca Fascicularis* (Primates) chromosomes and their implication for chromosome evolution. *Hum. Genet.* 110:578-586.
- 31.- Deng Z, Atanasiu C, Burg JS, Broccoli D, Lieberman PM. 2003. Telomere repeat binding factors TRF1, TRF2, and hRAP1 modulate replication of Epstein- Barr virus OriP. *J Virol.* 77:11992-12001.
- 32.- Zhou J, Chau CM, Deng Z. 2005. Cell cycle regulation of chromatin at an origin of DNA replication. *EMBO J.* 24:1406-1417.
- 33.- Van Deutekom JC, Bakker E, Lemmers RJ, van der Wielen MJ, Bik E, Hofker MH, Padberg GW, Frants RR. 1996. Evidence for subtelomeric exchange of 3.3 kb tandemly repeated units between chromosomes 4q35 and 10q26: implications for genetic counselling and etiology of FSHD1. *Hum Mol Genet.* 5:1997-2003.
- 34.- Vázquez-Nin GH, Echeverría OM, Ortiz R, Scasselli C, Martin TE, Ubaldo E, Fakan S. 2003. Fine Structural Cytochemical Analysis of Homologous Chromosome Recognition, Alignment, and Pairing in Guinea Pig Spermatogonia and Spermatocytes. *Biol Reprod.* 69:1362-1370.
- 35.- Linardopoulou EV, William EM, Fan Y, Friedman C, Young JM, Trask BJ. 2005. Human subtelomeres are hot spots of interchromosomal recombination and segmental duplication. *Nature.* 437:94-100.
- 36.- Jeffreys AJ, Neuman R. 2005. Factors influencing recombination frequency and distribution in a human meiotic crossover hotspot. *Hum Mol Genet.* 14:2277-2287.
- 37.- Anderson LK, Offenbergh HH, Verkuilen WMHC, Heyting C. 1997. RecA-like proteins are components of early meiotic nodules in lily. *Proc Nat Acad Sci U S A.* 94: 6868-6873.
- 38.- Plug AW, Xu J, Ready G, Golub EI, Ashley T. 1996 Presynaptic association of Rad51 protein with selected sites in meiotic chromatin. *Proc Nat Acad Sci U S A.* 93: 5920-5924.
- 39.- Barlow AL, Benson FE, West SC, Hultén MA. 1997. Distribution of the Rad51 recombinase in human and mouse spermatocytes. *EMBO J.* 16:5207-5215
- 40.- Cornforth MR and Eberle RL. 2001 Termini of human chromosomes display elevated rates of mitotic recombination. *Mutagenesis.* 6:85-89.
- 41.- Peoples R, Milatovich A, Francke U. 1995 Hemizigosity at the insulin-like growth factor I receptor (IGF1R) locus and growth failure in the ring chromosome 15 syndrome. *Cytogenet Cell Genet.* 70:228-234.
- 42.- Holzenberger M, Leneuve P, Hamard G, Ducos B, Perin L, Binoux M, Le Bouc Y. 2000. A targeted partial invalidation of the insulin-like growth factor I receptor gene in mice causes a postnatal growth deficit. *Endocrinology.* 141:2557-2569.
- 43.- Pinson L, Perrin A, Plouzennec C, Parent P, Metz C, Collet M, Le Bris MJ, Douet – Guilbert N, Morel F and De Braekeleer M. 2005. Deletion of Unexpected Subtelomeric

15q26.2—qter Deletion in a Little Girl: Clinical and Cytogenetic Studies. *Am J Med Genet* 138A:160-165,

44.- Roback EW, Barakata AJ, Dev VG, Mbikay M, Chretien M, Butler MG. 1991. An infant with deletion of distal long arm of chromosome 15(q26.1-qter) and loss of insulin-like growth factor 1 receptor gene. *Am J Med Genet.* 38:74-79.

45.- Siebler T, Lopaczynski W, Terry CL, Casella SJ, Munson P, De Leon DD, Phang L, Blakemore KJ, McEvoy RC, Kelley RI, Nissley P.1995. Insuline- like growth factor I receptor expression and function in fibroblasts from two patients with deletion of distal long arm of chromosome 15. *J Clin Endocrinol Metab.* 80:3447- 3457.

46.- Tonnies H, Sculze I, Hennies HC, Neumann LM, Keizer R, Neitzel H. 2001. De novo terminal deletion of chromosome 15q26.1 characterised by comparative genomic hybridisation and FISH with locus specific probes. *J Med Genet.* 38:617-621.

47.- Okubo Y, Siddle K, Firth H, O'Rahilly S, Wilson LC, Willatt L, Fukushima T, Takahashi SI, Petry CJ, Saukkonen T, Stanhope R, Dunger DB. 2003. Cell proliferation activities on skin fibroblasts from a short child with absence of one copy of the type 1 insullin-like growth factor (IGF1R) gene and a tall child with three copies of the IGF1R. *J Clin Endocrinol Metab.* 88: 5981-5988.

48.- Roos A, Rudnik-Schöneborn S, Eggermann K, Eggerman T, Snderek J, Schwanitz G, Zerres K, Schüler HM. 2006. Submicroscopic unbalanced translocation resulting in del 10p/dup13q detected by subtelomere FISH. *Eur J Med Genet.* 49:505-510.

49.- Bourrouillou G, Colombies P, Gallegos D.1981. Monosomie partielle du bras court d'une observation avec étude tomodynamométrique. *Ann Genet.* 24:61-64.

50.- Fryns J, Mueleaere DE, Van den Berghe H. 1981. Distal 10p deletion síndrome. *Ann Genet.* 24:189-190.

51.- Suciú S, Nanulescu M. 1983. A new case of 10p-syndrome. *Ann Genet.* 26:109-111.

52.- Kinioshita Y, Tanaka Y, Yasuhara A, Matsuzaki S, Kuriki H, Kobayashi Y.1999. A case of deletion of the short arm of chromosome 10 with severe hearing loss and brainstem dysfunction. *Am J Perinat.* 4:299-301.

53.-De Vries B.B, White S.M, Knight S.J.L, Regan R, Homfray T, Young D.I, Super C, McKeown C, Splitt M, Quarrell O.W.J, Trainer A.H, Niermeijer M.F, Malcom S, Flint J.A, Hurst J.A, Winter R.M. 2001. Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangement : a checklist, *J.Med. Genet.* 38 (3) 145-150.

54.- D'Ercole AJ, Ye P, Calikoglu AS, Collins FS, Dev VG, Phillips JA.1996. Two patients with ring chromosome 15 syndrome. *Am J Med Genet.* 29:149-154.

55.- Golde DW, Bailey R, Geffner ME, Ducos B, Perin L, Binoux M, Le Bouc Y. 1998. Insulin-like growth factor-I resistance. *Endocrinol Rev.* 19:625-646.

56.- Lacerda L, Carvalho JAR, Stannard B, Werner H, Boguszewski MCS, Sandrini R, Malozowski SN, LeRoith D, Underwood LE. 1999. In vivo an in vitro response to short-term recombinant human insulin-like growth factor 1(IGF-1) in a severely growth-retarded girl with ring chromosome 15 and deletion of a single allele for type 1 IGF receptor gene. *Clin Endocrinol.* 51:541-550.

- 57.- Vissers LELM, Stankiewicz P, Yatsenko SA, Crawford E, Creswick H, Proud VK, de Vries BBA, Pfundt R, Marcelis CLM, Zackowski J, Geurts van Kessel W, Lupski JR, Veltman JA. 2006. Complex Chromosome 17p rearrangements associated with low-copy repeats in two patients with congenital anomalies. *Hum Genet.* 121: 697-709.
- 58.- Erdogan F, Chen W, Kirchhoff M, Kalscheuer VM, Hultschig C, Muller I, Schulz R, Menzel C, Bryndorf T, Ropers HH, Ullmann R. 2006. Impact of low copy repeats on the generation of balanced and unbalanced chromosomal aberrations in mental retardation. *Cytogenet Genome Res.* 115:247-253.
- 59.- Babcock M, Pavlicek A, Spiteri E, Kashork CD, Loshikhes L, Shaffer GL, Jurka J, Morrow BE. 2003. Shuffling of Genes Within Low-Copy Repeats on 22q11 (LCR22) by Alu-Mediated Recombination Events During Evolution. *Genome Res.* 13:2519-2532.
- 60.- Kishida T. 2008. Pattern of the Divergence of Olfactory Receptor Genes during Tetrapod Evolution. 3:2385.
- 61.- Vorsanova SG, Iourov IY, Voinova-Ulas VY, Weise A, Monakhov VV, Kolotii AD, Soloviev IV, Novikov VP, Yurov YB, Liehr T. 2007. Partial monosomy 7q34ter and 21 pter-q22.13 due to cryptic unbalanced translocation t(7;21) but not monosomy of the whole chromosome 21: a case report plus review of the literature. *Molecular Cytogenetic.* 13:1-7.
- 62.- Mercer RT, Dinger ME, Sunkin SM, Mehler MF, Mattick JS. 2008. Specific expression of long noncoding RNAs in the mouse brain. *PNAS.* 2:716-721.
- 63.- Rogaev IE. 2005. Small RNAs in Human Brain Development and Disorders. *Biochemistry.* 70:1404-1407.
- 64.- Mercer TR, Dinger ME, Sunkin SM, Mehler MF, Mattick JS. 2007. Specific expression of long noncoding RNAs in the mouse brain. *PNAS.* 105:716-721.