



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES DE CUAUTITLÁN

**ANÁLISIS GENÉTICO EN PACIENTES CON MOSAICISMO
PIGMENTARIO ATENDIDOS EN EL INSTITUTO NACIONAL
DE PEDIATRÍA.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:
DANIEL ALEJANDRO MARTÍNEZ ANAYA

Asesor: M en C Bertha Molina Álvarez
Coasesor: Dra. Consuelo Salas Labadia

Cuautitlán Izcalli, Estado de México 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Análisis genético en pacientes con mosaicismo pigmentario atendidos en el Instituto Nacional de Pediatría.

Que presenta el pasante: **Daniel Alejandro Martínez Anaya**

Con número de cuenta: **411025209** para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 15 de Marzo de 2016.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Bertha Molina Álvarez	
VOCAL	Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez	
SECRETARIO	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	
2do. SUPLENTE	Dra. Ana Paola Rojas Meza	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

IHM/cga

DEDICATORIAS

Agradezco a todas las personas que me acompañaron durante este largo camino:

A mi Mamá, que siempre se ha preocupado por mi educación desde el kínder hasta la Universidad.

Gracias por estar conmigo siempre que lo necesito, por pensar en mis necesidades antes que en las tuyas, por los valores que me has enseñado, por todo tu amor, aceptación, consejos y apoyo incondicional y constante.

Muchas gracias mamá, porque soy feliz con el estilo de vida que hoy tengo y todo te lo debo a ti.

A Guillermo, gracias por tu paciencia, sinceridad y fidelidad. Por soportar mi ñoñes y mi forma de ser tan despistada que sé que te desespera. Gracias por nunca haberme abandonado, por todo tu amor y por ser siempre mi mejor compañía.

A Vanesa e Ivan, gracias por ser unos excelentes hermanos que siempre confían en mí. Sin ustedes apyandome todo este tiempo no habría podido llegar hasta aquí. Son los mejores hermanos que podría pedir.

A mi tía Flor, Cris, Uriel e Isac, gracias por todo su cariño y por siempre interesarse en las cosas que hago.

A mi tía Toña, gracias por tu cariño, aceptación y por consentirme siempre.

A mi tío Julio y Lucy, gracias por sus consejos y porque estuvieron para mí siempre que lo necesite.

A Evita, gracias por abrirme las puertas de su casa aun sin conocerme, por todas sus atenciones y especialmente por salvarme del horror de seguir viajando en metro.

A mis amigos Emilia, Gustavo, Ana, Montse, Pili y Uriel, gracias por los buenos momentos que pasamos durante los años de universidad.

A todos ustedes les dedico este trabajo que significa muchas horas de esfuerzo y dedicación.

AGRADECIMIENTOS

Con estas breves palabras quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas del INP que hicieron posible este trabajo:

A los miembros del laboratorio de Genética y Cáncer del INP, les agradezco por su amabilidad y por ser unos excelentes compañeros, siempre respetuosos y amables.

Agradezco especialmente a la Dra. Consuelo Salas Labadia, por su paciencia y dedicación. Sé que no fue fácil tener a un alumno tan distraído y necio. Gracias por no rendirse, por sus consejos y por todo lo que aprendí.

A la Dra. Patricia Pérez Vera, gracias por haberme aceptado tan amablemente en su laboratorio, pero sobre todo gracias por su amistad, sus consejos y todas sus atenciones.

A Verónica Ulloa Avilés y Roberto Cruz Alcívar, gracias por toda su ayuda y sus enseñanzas, espero algún día llegar a ser un citogenetista tan bueno como ustedes.

A Pilar, Rocio, Adriana, Montserrat, Meche, Juan Carlos y Alex, gracias por ser tan excelentes compañeros.

A la Dra. Bertha Molina Alvarez, le agradezco por su valiosa asesoría y por su gran amabilidad que la caracteriza.

Agradezco a las Doctoras Emiy Yokollama Rebollar, Carola Duran McKinster y el Dr. David Cervantes Barragán por su colaboración en este trabajo.

CONTENIDO

Resumen	7
1. Introducción	8
1.1 Mosaicismo	8
1.2 Procesos principales del desarrollo embrionario	10
1.3 Origen del Mosaicismo	11
1.4 Mecanismos de origen del mosaico cromosómico	13
1.5 Frecuencia del mosaico cromosómico	16
1.6 Consecuencias fenotípicas del mosaico cromosómico	18
1.7 Mosaicismo pigmentario	19
1.8 Mosaicismo pigmentario y mosaico cromosómico	22
2. Antecedentes Directos	24
3. Justificación	25
4. Objetivos	26
4.1 Objetivo general	26
4.2 Objetivo particular	26
5 Hipótesis	26
6 Metodología	26
6.1 Población de estudio	26
6.2 Criterios de inclusión	26
6.3 Criterios de Exclusión	26
6.4 Estudio Citogenético	27
6.4.1 Estudio citogenético en Linfocitos de Sangre Periférica	27
6.4.2 Siembra, cosecha, obtención de laminillas y bandeo GTG	27
6.4.3 Estudio citogenético en piel	27
6.4.4 Siembra de biopsia de piel, cosecha de fibroblastos y bandas GTG	27
6.5 Estudio Molecular	28
6.5.1 Extracción de DNA	28
6.5.2 Microarreglos de aCGH	28
6.6 Análisis de resultados	28
6.6.1 Análisis Citogenético	28
6.6.2 Análisis Molecular	28
6.6.3 Correlación Genotipo-Fenotipo	30
7 Resultados	30
7.1 Análisis citogenético	30
7.2 Análisis molecular	36

7.3 Descripción fenotípica de los pacientes con alteraciones cromosómicas-----	39
7.3.1 Correlación genotipo-fenotipo -----	40
8 Discusión-----	42
8.1 Análisis citogenético-----	42
8.2 Análisis molecular-----	45
8.3 Correlación genotipo-fenotipo-----	47
9 Conclusiones-----	51
10 Anexo 1-----	52
11 Referencias-----	53

RESUMEN

Introducción: El mosaicismo pigmentario (MP) es una entidad clínica que se caracteriza por presentar alteraciones a nivel de pigmentación en la piel que siguen un patrón característico y se asocia de manera frecuente a alteraciones extra-cutáneas (30-90%), principalmente en sistema nervioso central, músculo-esquelético y oftalmológico. El 30-60% de los pacientes con MP pueden presentar alteraciones cromosómicas y de estos hasta en un 80% las presentan en estado de mosaico. **Objetivo:** Detectar mosaico cromosómico en linfocitos de sangre periférica (SP) y fibroblastos de piel clara (PC) y de piel oscura (PO) en pacientes con MP. **Metodología:** En el presente trabajo se analizaron mediante citogenética convencional (CC) muestras de SP, PC y PO de 12 pacientes en edad pediátrica con diagnóstico de MP asociado a retraso psicomotor y/o dismorfias, que acudieron a los servicios de Genética Humana y Dermatología del Instituto Nacional de Pediatría entre el periodo del 2014 al 2015. Se analizaron 50 metafases de cada tipo de tejido para descartar MC superior al 5%, con base en los criterios de Hook y utilizando las recomendaciones del ISCN 2013. Para el estudio molecular (aCGH), se eligieron pacientes con alteraciones cromosómicas que no pudieron ser completamente caracterizadas por técnicas de CC. **Resultados:** El análisis citogenético reveló un cariotipo sin alteraciones cromosómicas en el 75% de los pacientes, mientras que en un 25% se detectaron alteraciones cromosómicas: en dos pacientes se observaron deleciones intersticiales constitucionales: 46,XX,del(13)(q21q32) [50] y 46,XX,del(4)(p16.1p15.3),16qh+ [50], en los tres tejidos analizados. En un tercer paciente se detectó un MC: mos 47,XX,+12,22pstk-ps- [44]/46,XX,22pstk-ps- [6], confinado a un solo tejido (PO). Con el uso de aCGH se caracterizaron los puntos de ruptura de las deleciones detectadas y además se hizo evidente una micro-duplicación de 0.81Mb en el cromosoma 8. La búsqueda bibliográfica y en bases de datos, mostró que existen genes ubicados en la región delecionada en 13q y 4p cuya haploinsuficiencia se puede asociar con el fenotipo de los pacientes y que algunas de las características fenotípicas encontradas en los pacientes se comparten con las presentes en los casos reportados en la literatura. **Discusión:** Como resultado del análisis global, se propusieron algunos genes que podrían explicar el fenotipo de los pacientes. En 13q22.3, deleciones del gen *EDNRB* se asocian con el Síndrome de Waardenburg-Shah, caracterizado por la presencia de heterocromía del iris; en 13q31.3 se localiza el gen *MIR17HG*, interrupciones de este gen se asocian con clinodactilia del quinto dedo, estas dos presentes en el paciente. En 4p16.1 y asociado a alteraciones en el gen *PPP2R2C*, se ha observado discapacidad intelectual y problemas de conducta, que son características presentes en el paciente con deleción en 4p. En los casos reportados con trisomía 12 en mosaico confinada a PO, las dismorfias faciales y las alteraciones pigmentarias fueron características frecuentes. **Conclusiones:** La estrategia de análisis citogenético utilizada en este trabajo fue de gran utilidad para la caracterización de pacientes con MP ya que permitió: 1) descartar la presencia de alteraciones cromosómicas; 2) conocer la diferente proporción de las líneas celulares existentes; 3) hacer evidente ya sea la alteración o la línea celular normal en uno de los tres tejidos analizados, mientras que mediante el uso de técnicas moleculares se logró: 1) caracterizar de manera precisa las alteraciones cromosómicas; 2) conocer los genes involucrados en la alteración y 3) detectar alteraciones que pasaron desapercibidas a nivel citogenético.

1. INTRODUCCION

1.1 Mosaicismo

La presencia de dos o más líneas celulares genéticamente distintas, que derivan de un mismo cigoto se define como mosaicismo. La alteración que da origen al mosaicismo ocurre de manera post-cigótica y es heredada a todas las células de un mismo individuo (1-5).

Un individuo con alteraciones genéticas en estado de mosaico, estará compuesto por células sanas y alteradas, si la alteración está presente únicamente en células somáticas, entonces se hablará de un mosaicismo somático (MS) (Figura 1A), en este caso, la alteración no se puede transmitir a la descendencia y las regiones del cuerpo que están constituidas por estas células, presentan ciertas características anormales; si la alteración se encuentra en células germinales entonces se tiene un mosaicismo gonadal (MG) (Figura 1B), el cual se caracteriza por que la alteración ocurre durante la formación de los precursores de las células germinales (antes de la sexta semana del desarrollo) sin comprometer a las células somáticas, de este modo la gónada queda poblada por células normales y anormales y existe la probabilidad de que la alteración se transmita a la descendencia; y por último, si la alteración se encuentra en ambos tipos de células se tiene un mosaicismo somático gonadal (MSG)(Figura 1C) (2-9).

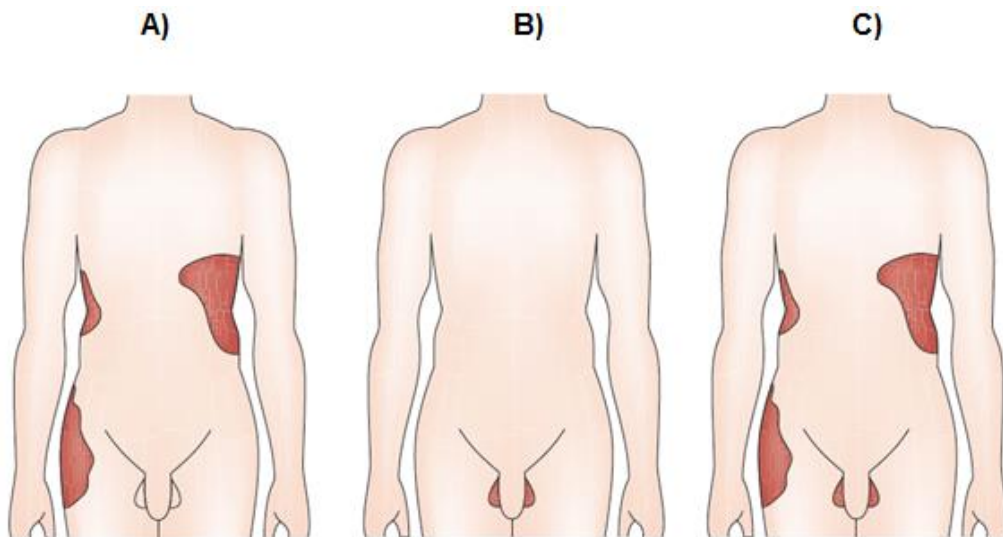


Figura 1. Clasificación del mosaicismo. De acuerdo a la distribución de las células anormales en el individuo (secciones rojas) se tiene: A) MS. La alteración se presenta solo en células somáticas; B) MG. La alteración se presenta solo en células germinales y C) MSG. La alteración se presenta en células somáticas y germinales. (Tomada y modificada de Biesecker LG y Spinner NB, 2014).

El patrón de distribución de las células anormales en un individuo, dependerá de varios aspectos: 1) Si la alteración ocurrió en estadios tempranos del desarrollo embrionario, el ritmo exponencial de crecimiento durante la embriogénesis, provoca que se generen células anormales con una amplia distribución dentro del individuo, a diferencia de aquellas alteraciones que ocurrieron en etapas tardías, en donde las células anormales están confinadas a ciertas secciones del embrión (4,6-8); 2) En estadios pre-implantación, si la

alteración ocurre durante las mitosis iniciales del cigoto, aproximadamente la mitad de las células del individuo tendrán la alteración (Figura 2A); Si las células anormales aparecen antes de la determinación axial del organismo, estas se pueden presentar a ambos lados de la línea media longitudinal del cuerpo, por lo tanto, se pueden ver afectados tejidos de ambos lados en el individuo y se pueden incluir una o las dos gónadas (Figura 2B); si las alteraciones ocurren en etapas posteriores, se presentan en un solo lado de la línea media y es probable que solo una gónada albergue la alteración (Figura 2C) y 3) Durante o después de la gastrulación, los tejidos afectados serán aquellos que se formen a partir de la capa germinativa en la que se haya dado el mecanismo responsable de la alteración genética, lo que provoca que las células alteradas estén confinadas solo a ciertos tejidos (2, 5, 8, 9).

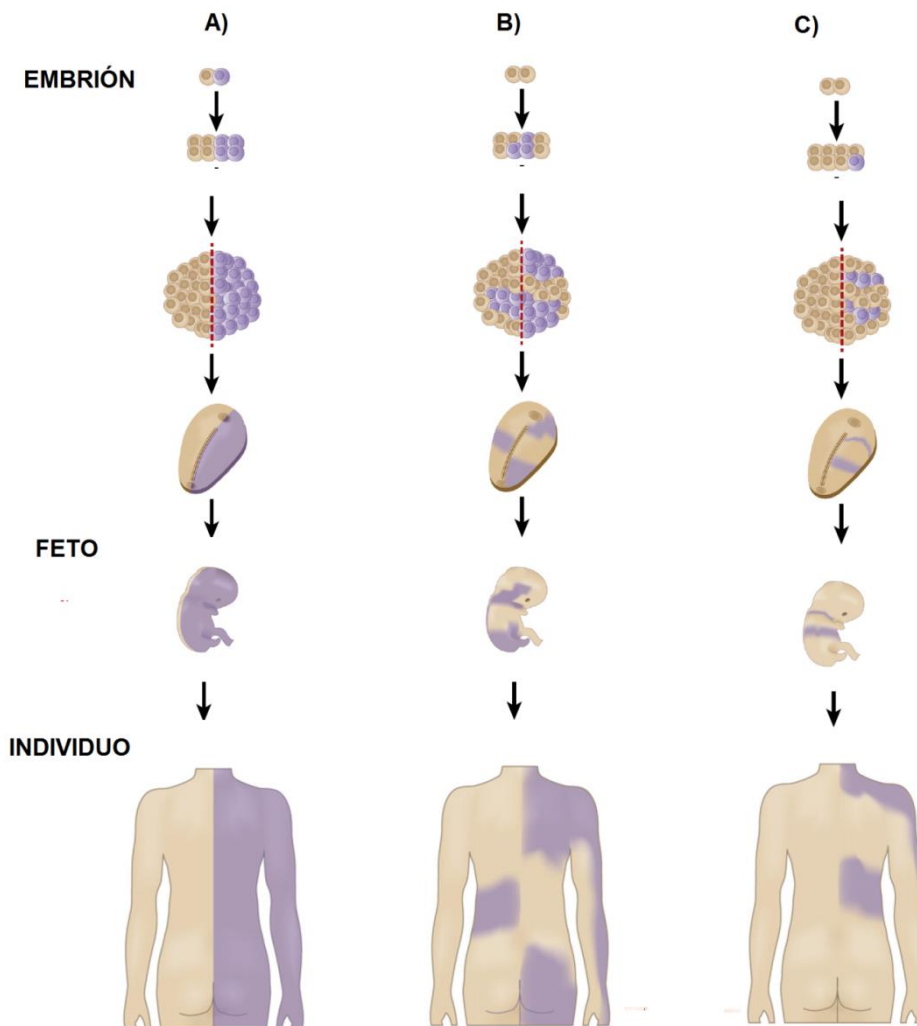


Figura 2. Distribución de las células en estado de mosaico dentro del organismo. En estadios pre-implantación, la alteración que da origen al mosaicismo puede ocurrir: A) Durante la mitosis inicial del cigoto y estará presente aproximadamente en la mitad de las células del individuo; B) Antes de la determinación axial del organismo y las células alteradas estarán presentes a ambos lados de la línea media longitudinal y C) Después de la determinación axial del organismo y solo se observan en uno de los lados de la línea media longitudinal (Tomada y modificada de Campebell et al., 2015).

1.2 Procesos principales del desarrollo embrionario.

El desarrollo embrionario (DE) es el proceso por el cual el ser humano pasa del estado unicelular en el que se encuentra tras la formación del cigoto, al estado pluricelular formado por diferentes órganos y tejidos. La fecundación es el evento que da origen al cigoto, esta es la primera célula del nuevo individuo y contiene un genoma diploide formado por 46 cromosomas (Figura 3A) (10).

Tras la fecundación, comienza la primera etapa del DE (pre-implantación): A) Segmentación, la cual consiste en una serie de mitosis que producen células embrionarias denominadas blastómeros, las cuales siguen en división y a los tres días producen una mórula (16 blastómeros) (Figuras 3A1-A4). B) Blastocisto, formado durante el 4to y 5to día, en los que la mórula entra en una fase de compactación con orientación de los blastómeros hacia la zona pelúcida (ZP) e internalización de agua a través de los mismos (blastocelo) (Figura 3B). En esta fase, el embrión rodeado aún por la ZP consta de dos tipos de células, una capa de blastómeros externos llamada trofoblasto (Tf), las cuales rodean a un grupo de blastómeros internos que reciben el nombre de masa celular interna (M.C.I) (Figura C). Las células de la M.C.I darán origen al embrión y a estructuras extraembrionarias, mientras que las células trofoblásticas formarán estructuras extraembrionarias como la capa más externa de la placenta. Seis días después de la fecundación, se da el proceso de implantación en el cual el blastocisto se libera de la ZP y el trofoblasto se adhiere al endometrio (Figura 3D) (10,11).



Figura 3. Desarrollo embrionario pre-implantación: A) Cigoto rodeado por la zona pelúcida (ZP), con dos pronúcleos: masculino y femenino. A1-A4) El cigoto inicia una serie de divisiones mitóticas que producen blastómeros y al tercer día se produce la mórula. B) Durante el cuarto y quinto día, la mórula sufre cambios morfológicos para transformarse en blastocisto. Los blastómeros se compactan y se produce una cavidad llamada blastocelo. C) El blastocisto queda compuesto por una masa celular interna (M.C.I), por el trofoblasto (Tf) y el blastocelo. D) El blastocisto se libera de la ZP y expone al Tf para implantarse en el endometrio (Tomada y modificada de Carlson, 2009).

A partir del octavo día, el embrión está completamente implantado en el útero de la madre y comienzan los eventos post-implantación. La M.C.I comienza a diferenciarse en hipoblasto y epiblasto que en su conjunto reciben el nombre de disco germinativo bilaminar (Figura 4A). En la tercera semana aparece la línea primitiva sobre el epiblasto y comienza el proceso de gastrulación, del que se establecen tres capas germinativas: el ectodermo, el endodermo y el mesodermo. A partir del hipoblasto se forma el endodermo y el epiblasto es ahora el ectodermo y el mesodermo, como resultado de la migración celular entre ambas capas (Figura 4B). Durante el periodo comprendido entre la tercera semana y el final del primer trimestre de gestación, las tres capas germinales pasarán por múltiples procesos de diferenciación para producir diferentes estirpes celulares que formarán los tejidos del feto (10,12).

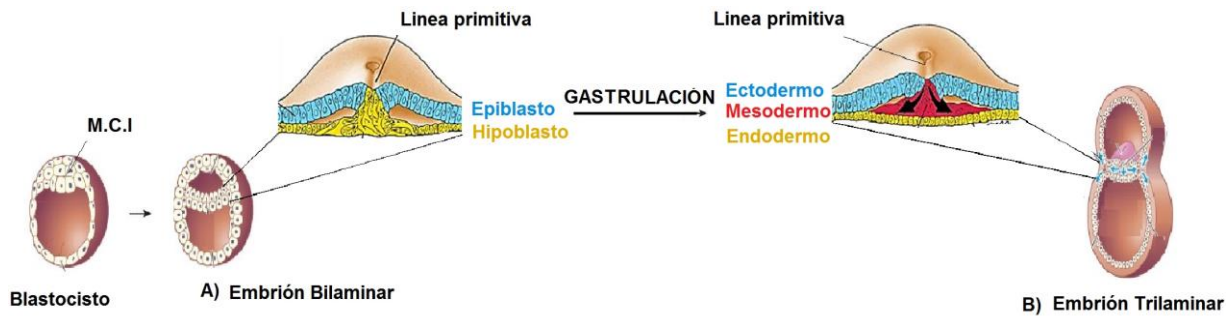


Figura 4. Desarrollo embrionario post-implantación: **A)** A partir del blastocisto implantado, la M.C.I se diferencia en hipoblasto y epiblasto (embrión bilaminar) y a partir del epiblasto se forma la línea primitiva. **B)** La gastrulación da origen a las tres capas germinativas (embrión trilaminar) (Tomada y modificada de William et al., 2013 y Zerrucha, 2009).

1.3 Origen del mosaicismo

La alteración genética que da origen a una población celular en estado de mosaico puede afectar a genes, el perfil epigenético de una región específica del genoma y a cromosomas (1).

A) Mosaico génico

El mosaico génico es resultado de alteraciones post-cigóticas que ocurren a nivel de la secuencia de DNA nuclear o mitocondrial, puede presentarse en cualquier sitio del genoma (secuencias codificantes o no codificantes) y es potencialmente heredable a la progenie celular (Figura 5A) (3,4,13). Se puede presentar para entidades monogénicas, un ejemplo es el síndrome de Proteus (OMIM #176920), el cual es provocado por una mutación autosómica dominante en el gen *AKT1* situado en 14q32.3 (3,6,14); en entidades poligénicas como el síndrome de Cornelia de Lange (OMIM #122470), el cual es provocado por mutaciones autosómicas dominantes en los genes *NIPBL*, *SMC3* y *RAD21*, y ligadas al X en los genes *SMC1A* y *HDAC8* (13,15). Por último, el asociado a desórdenes mitocondriales, resultado de la segregación al azar de mitocondrias normales y mutantes durante la mitosis (3).

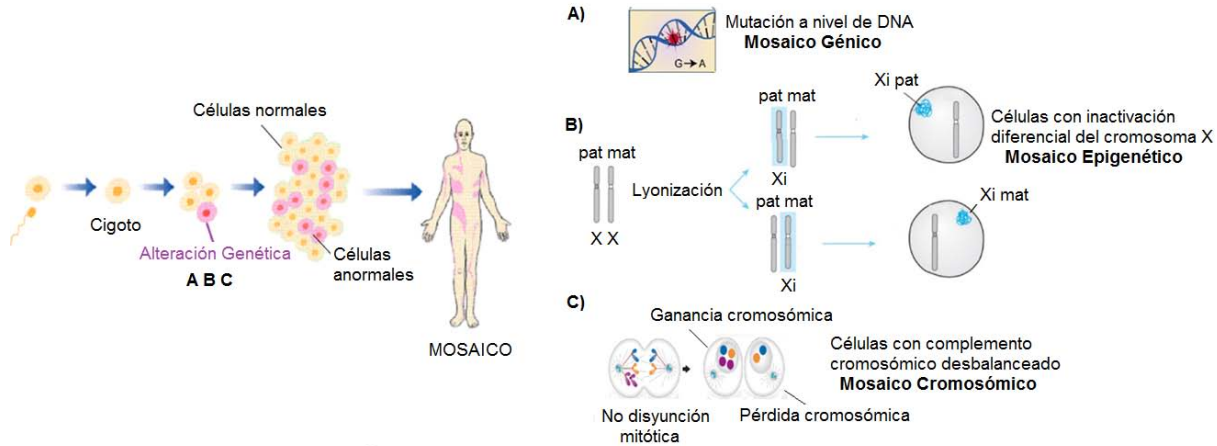


Figura 5. Origen del mosaicismo. La presencia de células en mosaico en un individuo puede ser resultado de diferentes alteraciones genéticas como: **A) Mosaico génico:** Mutaciones a nivel de la secuencia de DNA **B) Mosaico epigenético:** La presencia de poblaciones celulares con un patrón diferencial de inactivación del cromosoma X. paterno (pat), materno (mat), Xi pat cromosoma X paterno inactivo, Xi mat cromosoma X materno inactivo. **C) Mosaico cromosómico:** Segregación cromosómica anormal.

B) Mosaico epigenético

El mosaico epigenético (ME) o funcional se caracteriza por presentar poblaciones celulares homogéneas en cuanto a la estructura de su genoma, pero con diferencias funcionales inducidas por factores modificadores que provocan la activación o inactivación aleatoria de regiones del genoma (1,13,14). La activación o inactivación de genes puede ocurrir por varios mecanismos:

1) Modificaciones epigenéticas: metilación o desmetilación de islas CpG y acetilación o desacetilación de histonas entre otras.

2) La acción de segmentos de DNA de origen viral conocidos como transposones (42% del genoma humano) que pueden moverse a lo largo del genoma. Aquellos como los tipo *LINE 1*, pueden influenciar la actividad de genes cercanos mediante eventos de metilación y de este modo provocar la activación aleatoria de genes y como consecuencia mosaicismo funcional (1).

3) La inactivación del cromosoma X (Lyonización): es la forma más clásica de mosaicismo funcional. La inactivación del cromosoma X ocurre durante el estado de blastocisto y es regulada por el gen *XIST*, el cual codifica un RNA funcional, que mediante mecanismos epigenéticos inactiva al cromosoma X. Este proceso ocurre al azar, por lo tanto hay clones celulares con el cromosoma X de origen materno inactivo y otras que han inactivado el de origen paterno (Figura 5B), lo que resulta en una gran variabilidad fenotípica para las enfermedades ligadas al X. Una forma de mosaicismo funcional asociado al fenómeno de inactivación ocurre para las translocaciones X;autosoma, en las que habrá poblaciones celulares con el cromosoma X translocado inactivo y otras con el normal inactivo (9,13).

C) Mosaico cromosómico

El mosaicismo cromosómico (MC) está definido por la presencia de dos o más líneas celulares distintas, resultado de una falla en la segregación cromosómica durante la mitosis, lo que provoca desbalances en el número normal de cromosomas dentro de las células. Se ha reportado MC para desbalances numéricos (aneuploidías y poliploidías) y alteraciones estructurales (Figura 5C) (3, 7,16).

La ganancia o pérdida constitucional (en todas las células del organismo) de solo ciertos cromosomas es compatible con la vida, por ejemplo, trisomía para los cromosomas 13, 18, 21 y monosomía del cromosoma X han sido reportadas en nacidos vivos, sin embargo, existen aneuploidias como las trisomías para los cromosomas 7,8, 9, 14, y 22 que en nacidos vivos solo pueden presentarse en estado de mosaico, debido a su propia selección en un tejido específico o en una etapa del desarrollo (2,3,16)

El mosaicismo para un rearrreglo estructural es menos común que las aneuploidias en mosaico, sin embargo, se ha reportado mosaicismo para muchos tipos de anomalías estructurales como translocaciones balanceadas y desbalanceadas, deleciones, duplicaciones, inversiones, anillos cromosómicos e isocromosomas, entre otras. Con un cariotipo estructuralmente desbalanceado el estado de mosaico es menos severo que la forma constitutiva, por lo cual las alteraciones estructurales severas solo se presentan en mosaico. La alteración mejor estudiada en mosaico, es el isocromosoma 12p asociado con el síndrome de Pallister Killian (OMIM #601803), el cual se caracteriza por múltiples dismorfias, daño intelectual y mosaicismo limitado a ciertos tejidos (4,11).

1.4 Mecanismos de origen del mosaico cromosómico.

Durante el proceso de división celular (mitosis), la información genética contenida en los cromosomas se duplica y las copias segregan con precisión en dos células hijas genéticamente idénticas. Antes de iniciar la mitosis, durante la interfase (G1, S y G2), la célula aumenta de tamaño y los puntos de control interfásicos, aseguran que el material genético no contenga ningún tipo de daño. Al inicio de la mitosis, en profase, los cromosomas duplicados se condensan y comienza la formación del huso mitótico a partir de los centrosomas, localizados en polos opuestos de la célula; en prometáfase, desaparece la envoltura nuclear y los cromosomas se anclan a los microtúbulos del huso mediante el cinetocoro (ensamblado alrededor de la cromatina centromérica) (Figura 6A); en metafase, los cromosomas se alinean en el ecuador del huso mitótico, en donde cada cromátida hermana se une a microtúbulos de polos opuestos del huso (Figura 6B); en anafase, las cromátidas hermanas se separan de forma sincrónica y son arrastradas lentamente hacia el polo del huso al que están adheridas (Figura 6C); en telofase, los cromosomas se descondensan y se reorganiza la envoltura nuclear alrededor de cada set cromosómico, lo que marca el final de la mitosis. El citoplasma se divide y se forman dos células hijas, cada una con un núcleo (citocinesis) (17).

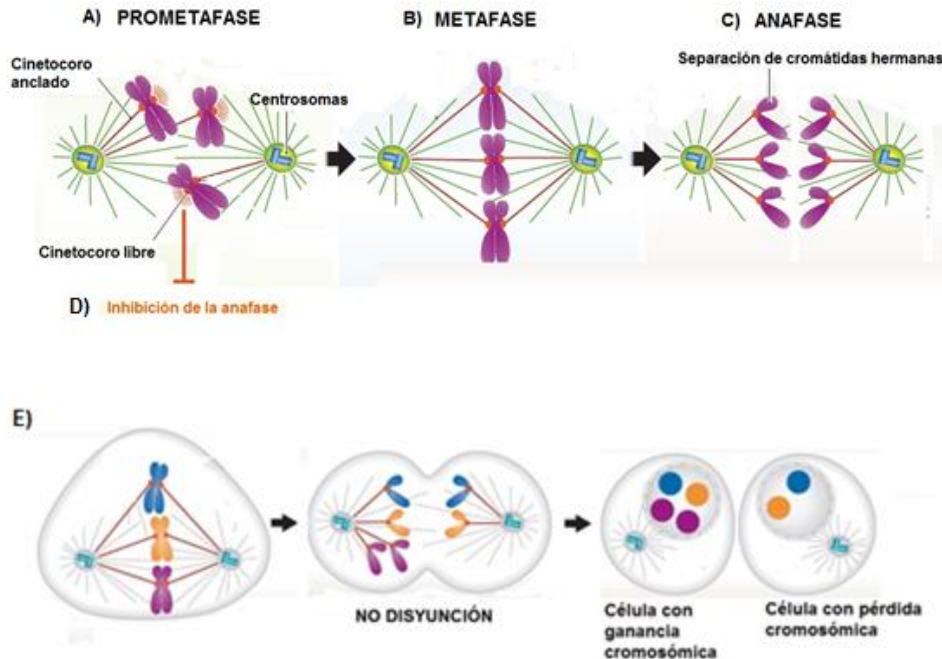


Figura 6. Segregación cromosómica correcta durante la mitosis y No disyunción mitótica. **A)** En prometafase cada cinetocoro se ancla a los microtúbulos del huso; **B)** En metafase, todos los cromosomas se alinean en el ecuador del huso mitótico; **C)** En anafase ocurre la separación de las cromátidas hermanas hacia polos celulares opuestos; **D)** Los cinetocoros libres mantienen señales que inhiben la anafase; **E)** No disyunción mitótica: Ambas cromátidas de un cromosoma (cromosoma morado) migran hacia el mismo polo celular, formando una célula con una ganancia cromosómica y otra con una pérdida (Tomada y modificada de Holland et al., 2014).

Durante la mitosis, los diferentes puntos de control pueden inhibir la migración anafásica hasta que cada cromátida hermana se haya anclado de forma correcta a los microtúbulos, de lo contrario, los cinetocoros no anclados, emiten señales para impedir la anafase (Figura 6D). Sin embargo, existen mecanismos que pueden alterar el funcionamiento de los puntos de control del ciclo celular y generar fallas en la segregación, lo que puede generar un MC. Estos mecanismos son:

1) No disyunción mitótica (ND) y Rezago Anafásico (RA): La ND se define como la falla en la separación adecuada de las cromátidas hermanas durante la anafase, de tal forma que un cromosoma completo migra hacia el mismo polo celular, creando una célula con una ganancia y otra con una pérdida cromosómica (Figura 6E). El RA es una falla de las cromátidas hermanas para incorporarse al núcleo, lo que genera una célula con un complemento cromosómico normal y una con una pérdida cromosómica. La ND y el RA son los mecanismos más frecuentes en la generación de MC en el embrión humano (9,18).

Un mecanismo asociado con los puntos de control mitótico y que puede causar ND o RA, es el ataque merotélico, el cual ocurre cuando un cinetocoro es anclado por microtúbulos de ambos polos del huso (Figura7A), estos microtúbulos son similares a los que están orientados en los cinetocoros de cada cromátida durante una división normal, por lo tanto el punto de control mitótico no los detecta como

aberrantes y la anafase prosigue de manera normal, lo que provoca la formación de un puente anafásico (Figura 7B). El puente anafásico se romperá por la fuerza de arrastre de la red bipolar de microtúbulos y el cromosoma puede segregarse de manera normal, sufrir ND o RA (Figuras 7B1, B2 y B3), generando MC. Si ocurre un RA, el cromosoma queda en el citoplasma en forma de micronúcleo y puede perderse o volver a integrarse al núcleo en la siguiente división celular (18).

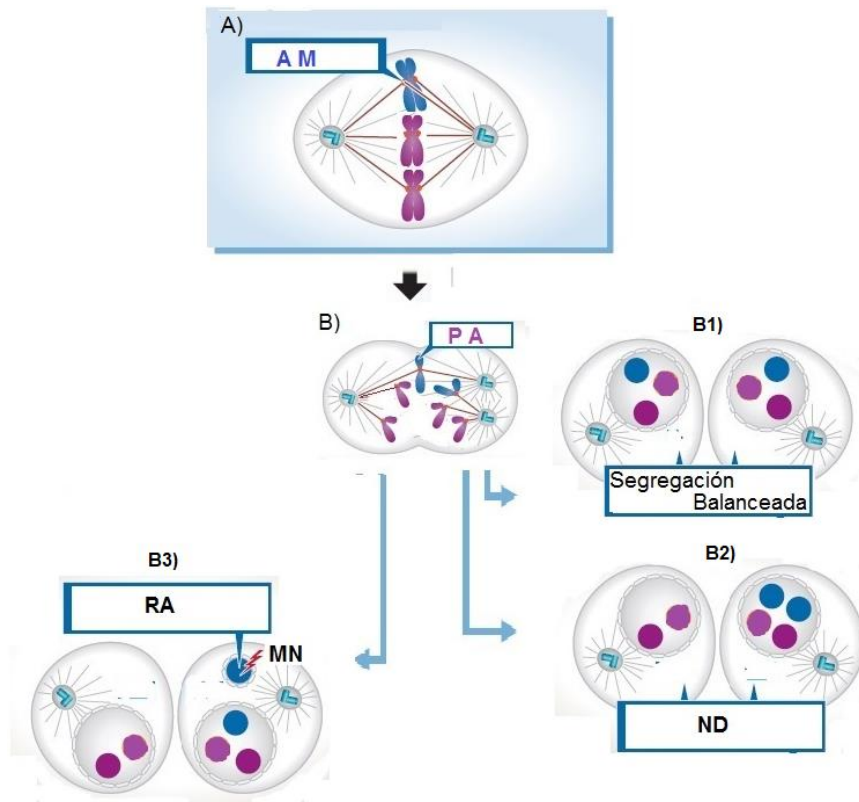


Figura 7. Mecanismo de origen de ND y RA. A) Ataque merotético (AM), ocurre cuando microtúbulos de polos opuestos se asocian al mismo cinetocoro. **B)** Puente Anafásico (PA), la progresión de la anafase provoca su ruptura generando: **B1)** Segregación cromosómica normal; **B2)** No disyunción (ND) y **B3)** Rezago anafásico (RA), en donde el cromosoma rezagado queda en forma de micronúcleo (MN). (Tomada y modificada de Holland et al., 2014).

2) Rescate trisómico (RT): Se define como la reversión de un estado trisómico a uno disómico durante las mitosis post-cigóticas, esto puede ocurrir mediante ND o RA y generar MC con células disómicas (“rescatadas”) y células trisómicas. Este fenómeno ha sido reportado en etapas embrionarias pre y post implantación (Figura 8A) (9). Si el RT ocurre durante la primera mitosis del cigoto, la línea monosómica desaparece por selección y solo queda la línea disómica, sin embargo, existe el riesgo de que las células disómicas presenten disomía uniparental (presencia de un par cromosómico que comparte el mismo origen parental) (Figura 8B), lo cual podría provocar fenotipos patológicos al alterar la expresión de genes improntados (4,7).

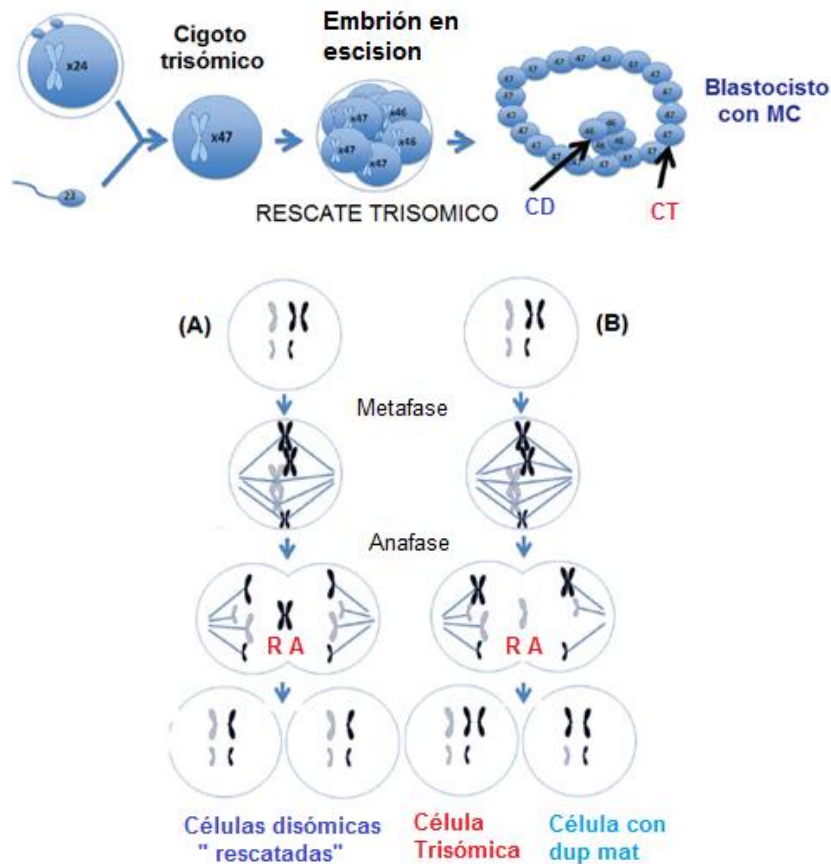


Figura 8. Rescate trisómico. El RT genera un blastocisto con MC formado por células disómicas (CD) y trisómicas (CT). **A)** En anafase, el cromosoma trisómico sufre RA, lo que genera células en estado disómico. **B)** El RT genera una célula disómica con disomía uniparental materna (dup mat). Cromosomas maternos en negro y cromosomas paternos en gris (Tomada y modificada de Taylor et al., 2014).

3) Rearreglos cromosómicos estructurales: Machiela et al., en 2015 reportaron una frecuencia para alteraciones estructurales en mosaico de 0.68% en una población de 24,849 individuos analizados (19). Por otro lado, la presencia de mosaico dinámico resultado de rearrreglos cromosómicos inestables como cromosomas dicéntricos o anillos cromosómicos, que por su inestabilidad durante la migración anafásica, pueden generar pérdidas, ganancias, deleciones o duplicaciones, es un evento que se presenta de manera frecuente (20).

1.5 Frecuencia del mosaico cromosómico.

El MC se ha observado en 15-90% de los embriones obtenidos por fertilización in vitro (FIV). Sin embargo, estos datos pueden ser muy heterogéneos debido al tipo y estado del desarrollo del embrión, así como al método de análisis utilizado para detectar el MC (7,21).

Durante las primeras divisiones del cigoto, existe una mayor susceptibilidad a la aparición de MC de tipo transitorio debido a que en el embrión, el proceso de transcripción se activa completamente hasta el estadio de 8 células (2 a 3 días después de la fecundación), por lo que durante este tiempo, la regulación del ciclo celular depende de los derivados citoplasmáticos maternos, hasta que se produce la nueva maquinaria de

transcripción y traducción, que genera las proteínas necesarias para el control del ciclo celular. A su vez, durante este periodo existen mecanismos de presión selectiva, los cuales permiten corregir y/o eliminar a las células anormales y asegurar que solo las normales se establezcan en mayor proporción en el embrión (21).

En los embriones, se pueden observar mosaicos euploides-aneuploides, compuestos por células con contenido cromosómico normal (euploidía) y por células en las que hay ganancia o pérdida de un cromosoma (aneuploidía), así como mosaicos aneuploides, compuestos por células con múltiples aneuploidías. Van Echten et al., 2010, en un estudio de análisis cromosómico para determinar MC en embriones pre-implantación obtenidos por FIV, encuentran que el 73% de los embriones fueron mosaico para alguna alteración cromosómica, 22% no presentaron mosaicismo y el 5% restante tenía otras anormalidades (haploidía, poliploidía, aneuploidia y rearreglos complejos en todas las células). El 59% de los embriones analizados fueron mosaicos euploides-aneuploides y el 14% eran mosaicos aneuploides (22). Los cromosomas sexuales son los involucrados con mayor frecuencia (24.1%), después los cromosomas 8 (12.1%), 2 (8.6%), 16 (8.6%) y 7,13,18,20 y 21 con un 5.2% (22).

En los embriones pre-implantación, la frecuencia así como los cromosomas que están involucrados en el MC, son diferentes a los encontrados en embriones post-implantación y en nacidos vivos, lo que sugiere la presencia de una presión selectiva contra blastómeros o embriones aneuploides. Para que esto se lleve a cabo, se han propuesto los siguientes mecanismos (21) (Figura 9):

- 1) Autocorrección:** Las células con aneuploidías pueden corregirse mediante ND o RA (Figura 9A).
- 2) Arresto celular y apoptosis:** Los programas de arresto del ciclo celular y apoptosis se inician después de la activación transcripcional del embrión para prevenir el desarrollo de blastómeros y/o embriones con alteraciones cromosómicas (Figura 9 B y C).
- 3) Localización preferencial:** Debido a la localización preferencial de blastómeros aneuploides en el trofotodermo, los embriones pueden tolerar la alteración cromosómica y desplazar a los blastómeros euploides a la masa celular interna. El hallazgo de MC confinado a placenta (MCP), es una clara evidencia de este fenómeno (21). Mantikou et al., 2012, explican que el hecho de que el 76% de los cariotipos anormales en biopsias de vellosidades coriónicas (BVC), resulten normales en líquido amniótico, es prueba de que las células anormales, pueden ser forzadas a aislarse a linajes celulares extraembrionarios para evitar que formen parte de los linajes celulares embrionarios. Se reporta que el 10% de los MCP, pueden reflejar un mosaicismo fetal críptico que no tendrá consecuencias fenotípicas en el embrión, lo cual evidencia un sistema de presión selectiva durante el desarrollo. En general, el MC tiene una frecuencia del 1-2% en estudios prenatales de BVC y del 0.1-0.3 % en estudios de líquido amniótico (23).

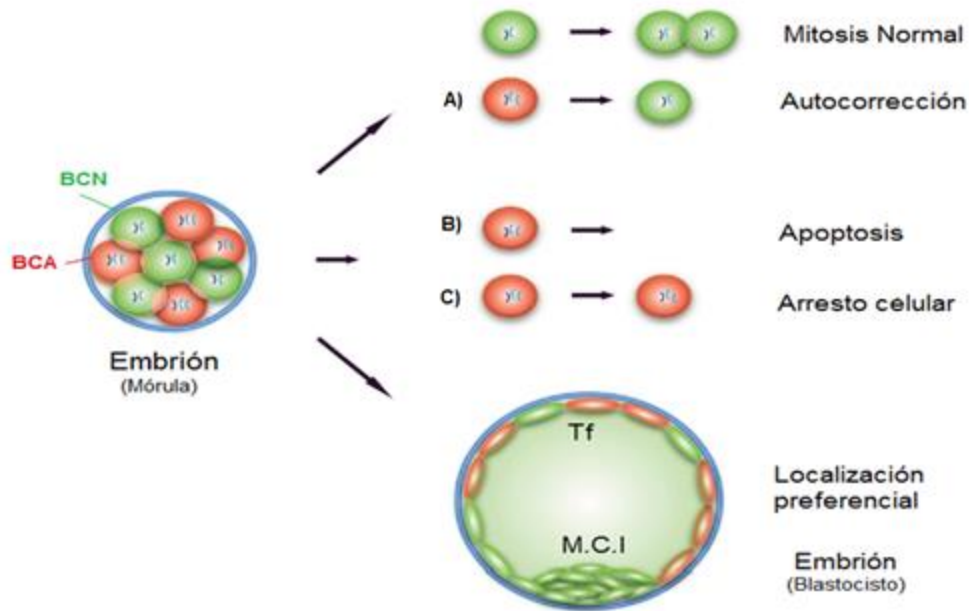


Figura 9. Mecanismos de presión selectiva contra embriones aneuploides. El embrión con MC tiene blastómeros normales (BCN) y anormales (BCA), los cuales pueden: **A)** Tener autocorrección; **B)** Ser eliminados mediante apoptosis y **C)** Sufrir arresto del ciclo celular para reparar el daño. Los blastómeros que escapen a cualquiera de estos mecanismos pueden ser desplazados al trofoblasto (localización preferencial) y no formar parte de la masa celular interna (M.C.I.), de la cual se derivan los linajes celulares embrionarios. (Tomada y Modificada de Mantikou et al., 2012).

1.6 Consecuencias fenotípicas del mosaico cromosómico.

Las consecuencias fenotípicas del MC pueden verse influenciadas por varios aspectos:

1) La distribución de la línea celular anormal: Como ya se mencionó, la distribución de las clonas celulares anormales depende del periodo del desarrollo embrionario en el cual haya surgido la alteración. Las regiones anatómicas que contengan una gran proporción de células cromosómicamente anormales, presentarán características anormales (3,6).

2) Presión selectiva: Para que la alteración cromosómica pueda provocar un fenotipo alterado, las células que la contienen deben establecerse en suficiente proporción y expresar el fenotipo patológico, para sobrepasar los mecanismos de selección, al mismo tiempo que la alteración cromosómica debe permitir la supervivencia de la célula, incluso puede proveer una ventaja proliferativa con respecto a las células normales lo que permitiría la evasión de los procesos selectivos (3).

3) El tipo de célula que contiene la anomalía cromosómica: La alteración puede ocurrir de manera temprana en el desarrollo e involucrar a células somáticas y germinales, sin embargo puede que ciertas células somáticas sean seleccionadas, debido a que requieren un cariotipo normal para continuar con el desarrollo, mientras que la misma alteración podría ser tolerada en otras células somáticas o en células germinales (5).

4) Tipo de tejido: Las clonas anormales deben encontrarse en el tejido específico en el que la alteración cromosómica provoque el fenotipo patológico (8).

5) El cromosoma que se encuentra en estado de mosaico: El mosaicismo para un cromosoma en particular puede afectar el desarrollo de diferentes órganos (7).

6) El tipo de anomalía cromosómica presente en estado de mosaico: La capacidad para provocar un fenotipo patológico, está directamente influenciada por la naturaleza del material genético involucrado en la alteración. Se sabe que las ganancias de material cromosómico impactan menos al fenotipo que las pérdidas y en cuanto a alteraciones estructurales, los rearrreglos balanceados son mejor tolerados que aquellos desbalanceados (2).

1.7 Mosaicismo Pigmentario

El mosaicismo pigmentario (MP) es un desorden que se presenta con una frecuencia de 1 en 7805 nacidos vivos y describe alteraciones de pigmentación de la piel que se caracterizan por seguir un patrón de mosaicismo cutáneo (MCut), el cual describe un fenotipo en el que la piel tiene zonas de pigmentación clara y oscura, con un patrón particular denominado líneas de Blaschko (LB) (24, 25).

La migración de células del ectodermo durante la embriogénesis, es lo que genera el patrón de LB (26,27). Estas células nacen y se desarrollan a partir de la línea media primitiva, al inicio de la gastrulación y después de la diferenciación del ectodermo, se convierten en precursores melanocitos que migran hacia su destino en dirección transversal (Figura 10A). Como resultado de la flexión natural del embrión en crecimiento, las LB toman un trayecto en forma de V en la espalda, de S en la cara anterior del tórax, en espiral en la cara posterior de la cabeza y un carácter lineal discretamente incurvado en las extremidades (Figura 10B) (26-28).

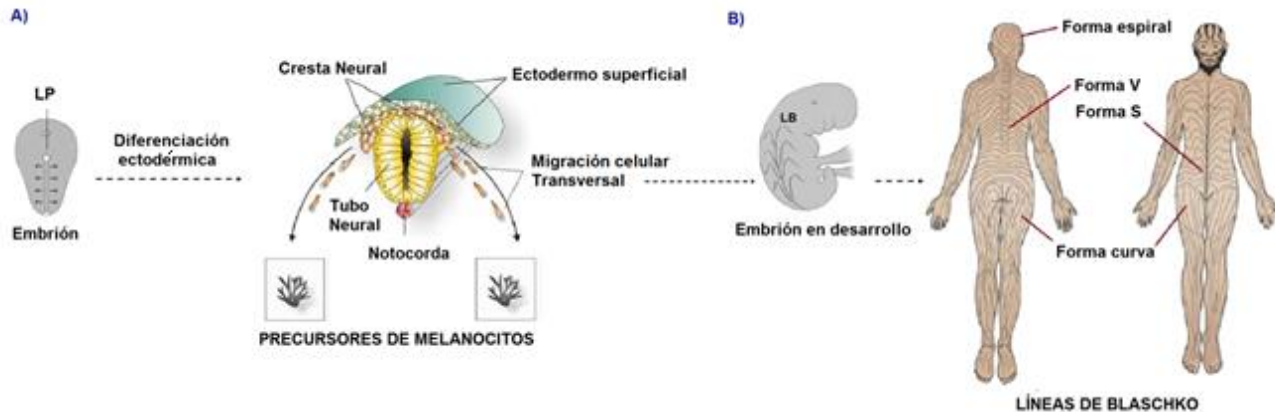


Figura 10. Origen de las Líneas de Blaschko. **A)** Las células ectodérmicas nacen a partir de la línea media (LP) y después de la diferenciación del ectodermo migran en dirección transversal; **B)** La flexión del embrión provoca que las LB tomen un trayecto en forma de V en la espalda, S en el tórax, curva en las extremidades y espiral en la cabeza (Tomada y Modificada de Molho y Shaffer 2011, Taibjee et al., 2009 y Cichorek et al., 2013) .

En individuos sanos, las LB no son visibles y no siguen ningún trayecto linfático, vascular o nervioso. Si durante la embriogénesis, se presenta alguna alteración genética que haga evidente un fenotipo de pigmentación clara y/o oscura, las LB entonces se volverán visibles y se observarán como líneas de color café oscuras o claras alrededor de las rutas de migración de las células anormales. En los pacientes con MP que siguen este patrón, se asume que las células que componen cada tipo de piel, tengan dos genotipos distintos (26).

En dermatología, el termino MP se utiliza para describir un grupo de síndromes clínicos que cumplen con alteraciones pigmentarias que siguen las LB, la Hipermelanosis Nevoide Lineal (OMIM#614323) y Espiralizada y la Hipomelanosis de Ito (OMIM#300337). Los pacientes con MP, además de presentar el patrón clásico de MCut en forma de LB, pueden presentar otros, dependiendo de la etapa del desarrollo embrionario en el cual se genere la clona celular anormal (14,25,26):

A) El primer patrón se divide en dos subgrupos en función del grosor de las lesiones: el grupo 1A compuesto de LB finas (Figura 11A) y el grupo 1B compuesto de LB gruesas (Figura 11B).

B) La presencia de cuadros de piel afectada que alternan con cuadros de piel sana, se conoce como patrón en tablero de ajedrez. Las lesiones se pueden localizar en el tronco y estar bien delimitadas en la línea media (Figura 11C).

C) La combinación de lesiones hipo e hiperpigmentadas en forma de hoja y lesiones oblongas que recuerdan a un adorno floral, se conoce como patrón filoide (Figura 11D).

D) Por último, el patrón que con frecuencia siguen los nevos melanocíticos congénitos, en forma de parches sin separación en la línea media (Figura 11E).

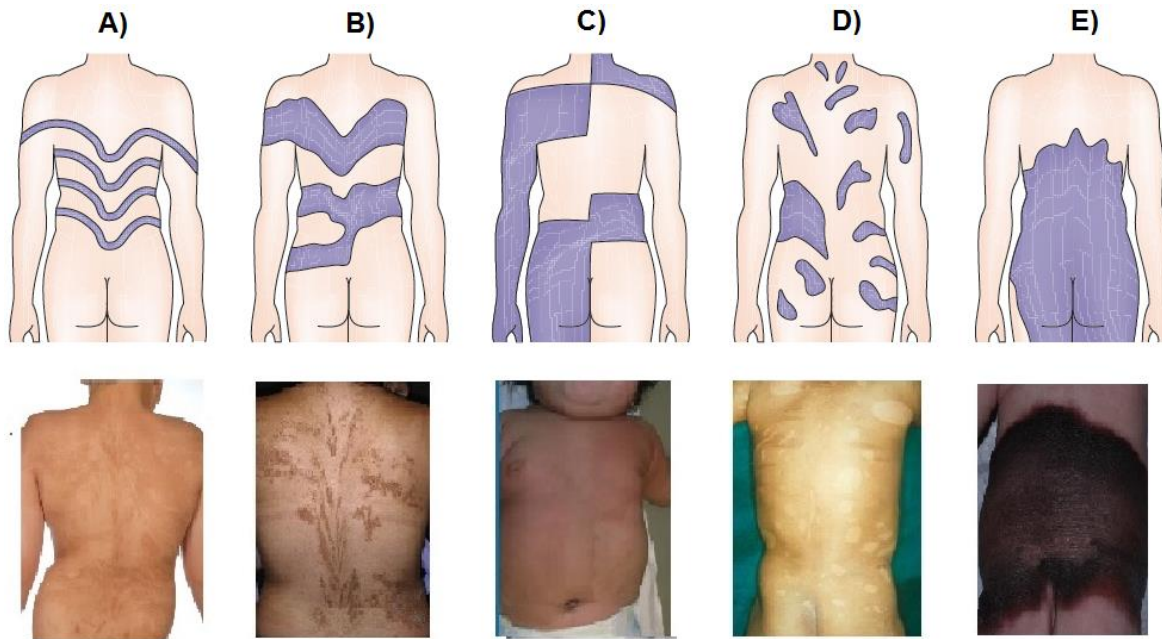


Figura 11. Patrones de Mosaico cutáneo en individuos con MP. A) LB delgadas; B) LB gruesas; C) Tablero de ajedrez; D) Patrón filloide; E) Parche sin separación de la línea media (Tomada y modificada de Biesecker LG y Spinner NB, 2014).

El MP se considera un desorden esporádico, con predominio en pacientes femeninos. Las lesiones están presentes desde el nacimiento y pueden incrementarse durante la infancia y persistir durante toda la vida (24). En el 30-90% de los pacientes con MP, se han reportado distintos tipos de manifestaciones extra-cutáneas, principalmente en los sistemas nervioso central (SNC), músculo esquelético, oftalmológico y cardíaco (Tabla 1). El pronóstico de estos pacientes está directamente relacionado con la severidad de las alteraciones extra-cutáneas (24,25,29,30).

Tabla 1. Anormalidades extra-cutáneas asociadas al MP	
Sistema Involucrado	Manifestaciones
Sistema Nervioso Central	Retraso del Neurodesarrollo Microcefalia Hipotonía Crisis convulsivas
Músculo esquelético	Escoliosis Dismorfias cráneo-faciales Asimetría corporal
Oftalmológico	Cataratas congénitas Microftalmia
Cardíaco	Defecto septal-ventricular Tetralogía de Fallot

1.8 Mosaicismo Pigmentario y Mosaico cromosómico.

La presencia de alteraciones cromosómicas en mosaico como probable base patogénica del MP, ha permitido explicar la variabilidad del cuadro clínico en estos pacientes, por lo que para detectar MC asociado a MP, es necesario considerar la relación entre el tipo celular analizado y las diversas manifestaciones cutáneas y extra-cutáneas presentes en estos pacientes (4).

Así por ejemplo, las alteraciones a nivel dermatológico, podrían sugerir la búsqueda de MC en piel, el cual es un tejido del que puede obtenerse material cromosómico de diferentes tipos celulares (melanocitos, queratinocitos y fibroblastos), que pueden asociarse con el fenotipo anormal de pigmentación. Se sabe que el patrón de MCut en los pacientes con MP depende del tipo de célula afectada. Los melanocitos y queratinocitos son células de origen ectodérmico asociadas al MP, debido a que la migración de estas estirpes celulares da origen a las LB. Las células de la cresta neural dan origen a los precursores de melanocitos (melanoblastos), los cuales migran e invaden la epidermis y algunas estructuras del SNC; mientras que los queratinocitos provienen del ectodermo superficial (Figura 12). Las células dérmicas asociadas al MP son los fibroblastos, los cuales se originan del mesodermo paraxial y se asocian con los patrones de MCut no lineales o segmentales (Figura 12) (6, 31-34).

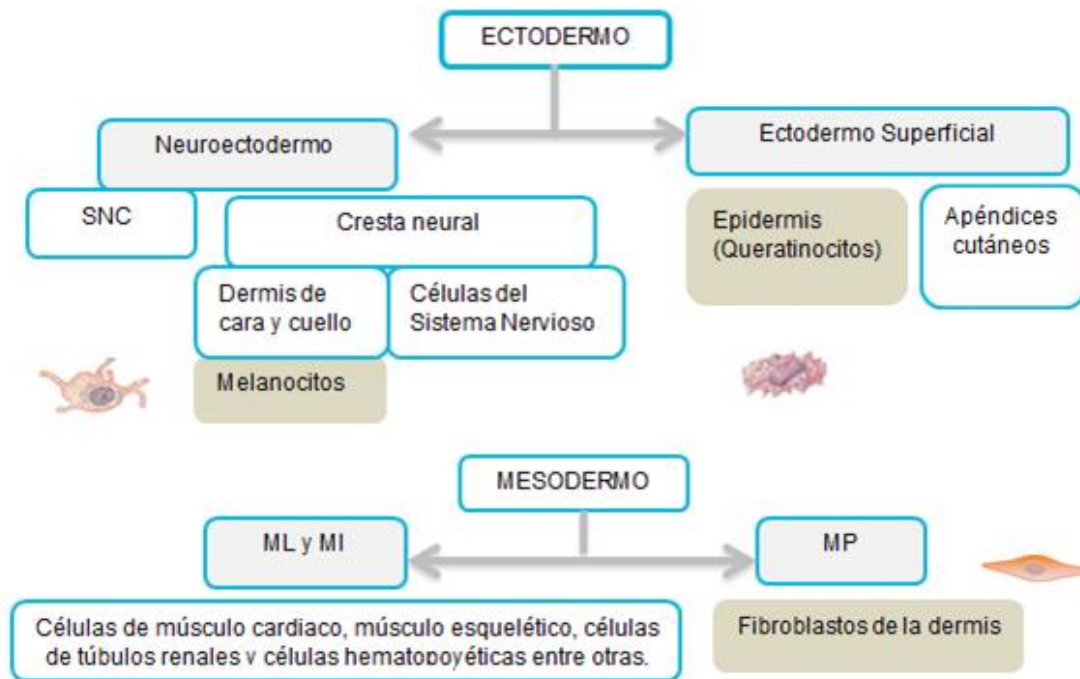


Figura 12. Origen embrionario de las células de la piel asociadas a MP. El ectodermo superficial da origen a los queratinocitos y al neuroectodermo que produce los melanocitos; el mesodermo paraxial (MP) da origen a los fibroblastos de la dermis (Tomada y Modificada de Zerrucha, 2009 y Wolf, 2003).

En general, el análisis cromosómico que se ha hecho hasta ahora en la mayoría de los pacientes con MP, se ha realizado en fibroblastos de algún tipo de piel. Taibjee et al., en 2009, realizó la búsqueda de MC mediante citogenética convencional (CC), tanto en queratinocitos como en fibroblastos de PC y PO en 10 pacientes con MP, encontrando en 9/10, un cariotipo normal y solo en un paciente se observó una trisomía del cromosoma 20 en mosaico en queratinocitos de PC (46,XX,+20 [9]/ 46,XX [6]). El resultado se corroboró utilizando FISH (Hibridación in situ con fluorescencia), observando la misma alteración en queratinocitos de PO, pero no así en fibroblastos y linfocitos de SP. Por lo que se observa en este estudio, en el 90% de los casos, el resultado fue el mismo tanto en queratinocitos como en fibroblastos (27). A nivel embriológico, se ha demostrado que los fibroblastos migran de manera similar a las células ectodérmicas, por lo que otros órganos pueden presentar anomalías análogas a las que pueden observarse gracias a las LB (4,5).

La detección de MC tanto en fibroblastos de piel como en linfocitos de sangre periférica (ambos tipos celulares de origen mesodérmico), podría explicar ciertas características asociadas al MP como la presencia de alteraciones en sistemas que comparten el mismo origen embrionario (p ej: alteraciones músculo esqueléticas) (Figura 12) (27). Tomando en cuenta el origen de las células del tejido que se va a analizar, la presencia de MC en fibroblastos por ejemplo, y no en células de origen ectodérmico, se puede asociar con un mejor pronóstico neurológico, sin embargo en los que se presentan solo alteraciones pigmentarias con patrón de LB y un daño severo del SNC, el MC podría ser confirmado en células de origen ectodérmico y no presentarse en células de origen mesodérmico (27, 31,34-36).

Se estima que entre el 30-60% de los pacientes con MP pueden presentar alteraciones cromosómicas y de estas, hasta un 80% se presentan en estado de mosaico (24,25,37). El amplio rango de anomalías citogenéticas que ha sido reportado para el MP incluyen mixoploidías, aneuploidías, deleciones, inserciones y translocaciones (principalmente X;autosoma) entre otras. Se ha observado que los cromosomas X, 8, 13, 14, 18 y 22, se involucran de manera frecuente en estas alteraciones (31,36-39). Sin embargo, a la fecha no existe un genotipo particular asociado al fenotipo del MP, a excepción del MCut de tipo filloide, en el cual se han observado con mayor frecuencia alteraciones del cromosoma 13 (trisomía parcial en mosaico) y del cromosoma 5 (tetrasomía 5p en mosaico) (29).

En el 40-70% de los casos de MP en los que no se detecta alguna alteración cromosómica, sería razonable asumir que se trate de una alteración que pase desapercibida por CC o de un mosaico a nivel molecular, ya que en estos pacientes se han reportado mutaciones puntuales en genes involucrados en procesos de pigmentación (migración celular, metabolismo de melanina y síntesis de factores de crecimiento entre otras) (37,40). Taibjee et al., en 2004, reportó 76 genes pigmentarios que podrían relacionarse con este fenotipo y encontró, que de una base de datos de pacientes con MP y alteraciones citogenéticas, el 88% sobrelapan con uno o más de estos genes involucrados en la pigmentación (37).

2. ANTECEDENTES DIRECTOS

En la literatura existen cuatro series de pacientes (Tabla 2) y alrededor de 113 casos únicos en los que se han analizado por citogenética con bandas GTG, tanto linfocitos de SP como fibroblastos y/o queratinocitos de piel. El número de metafases analizadas por individuo en cada estudio, tuvo un rango de entre 10 y 200 metafases. Los resultados mostraron pacientes con cariotipo normal así como con MC, con un amplio espectro de alteraciones cromosómicas que incluyen aneuploidías, mixoploidías, translocaciones (principalmente X;autosoma), anillos y deleciones entre otras; los cromosomas involucrados fueron: X, 8, 13, 14, 18 y 22 (31,36,38,39).

Tabla 2. Hallazgos citogenéticos en cuatro series diferentes de pacientes con MP					
Número de pacientes		Tejido (s) Estudiado (s)	Alteraciones detectadas por paciente	Referencia	
Pacientes analizados	Con alteración		Numéricas	Estructurales	
6	6	SP, Piel normal, PC, PO	+mar* +22 69,XXY	r(22) del(8)(q21q24) del(18)(q21q23)* t(4;5)(q31;q35),** inv(7)(p14q36),** t(11;19)(q21;p13.1)**	31
4	3	PC,PO,Q	-13,+mar +7 45,X		36
8	8	SP,PC,PO	-14* 45,X* XYYY,+8 45,X 45,X	r(14),rob(14;14)(q10;q10)* del(X)(q21),inv(9)(p13q12)* add(4p) del(18p) r(Y)	38
13	8	SP, Piel	+r(?) +18 69,XXY +i(12p)	t(X:22) r(10) t(15:22) del(13)(q11)	39

Cada renglón corresponde a un paciente.

*Alteración numérica y estructural detectada en el mismo paciente.

**Alteraciones estructurales detectadas en el mismo paciente.

SP sangre periférica; PC piel clara; PO piel oscura; Q queratinocitos.

Además de las series mencionadas, dentro del laboratorio de Genética y Cáncer del Instituto Nacional de Pediatría desde 2002 se trabaja con una línea de investigación basada en la caracterización citogenética y molecular de pacientes con MP, de la cual se desprende este trabajo de tesis. El estudio citogenético en 50 pacientes, detectó alteraciones cromosómicas en 15 de ellos, las cuales incluyen deleciones, translocaciones X;autosoma, cromosomas marcadores y anillos, con participación de los cromosomas X, 7, 12, 14, 16, 18 y 22 (41,42).

3. JUSTIFICACIÓN

Como ya se ha mencionado, del 30-60% de los pacientes con MP presentan muy diversas alteraciones citogenéticas y de estas, hasta el 80% se presentan en estado de mosaico. Además, a nivel clínico el 30-90% de estos pacientes presentan alteraciones extra-cutáneas, principalmente en SNC, sistema músculo esquelético, oftalmológico y cardiaco, por lo que se piensa que dichas alteraciones cromosómicas pueden ser la base patogénica de estas manifestaciones. Debido a esto, la búsqueda de MC en este grupo de pacientes es de gran importancia para obtener una caracterización genética precisa que pueda ayudar al diagnóstico del paciente.

En estudios previos en donde se hace la búsqueda de alteraciones cromosómicas en pacientes con MP, el abordaje citogenético solo se ha hecho en uno o dos tipos de tejidos: ya sea SP o un tipo de piel, PC o PO, y en muy pocos casos se han estudiado los tres tejidos en un mismo paciente. Considerando que la distribución de las alteraciones en mosaico en un individuo puede ser variable y la clona celular anormal puede estar presente en SP, o solo en un tipo de piel, esta estrategia de análisis en conjunto con el número tan variable de células analizadas (10 a 200 metafases), podría sesgar la detección del MC (2,6). Tomando en cuenta además, que los pacientes con MP presentan con frecuencia otras manifestaciones clínicas en conjunto con las alteraciones pigmentarias, es poco probable que el MC quede confinado a células solo de origen ectodérmico, por lo que la búsqueda de MC en pacientes con MP se debe realizar de manera rutinaria en linfocitos de SP y fibroblastos de piel (35).

Debido a estas limitaciones, es necesario implementar una estrategia de análisis que permita detectar con mayor precisión las alteraciones citogenéticas en estos pacientes. Un análisis citogenético en 50 metafases de SP, PC y PO de un mismo paciente, incrementa la probabilidad de detectar MC superior al 5%, de acuerdo a los criterios de Hook (43), además de permitir establecer la proporción de las alteraciones entre tejidos y detectar aquellas alteraciones que pudieran estar confinadas a un solo tipo de tejido (2,6). La combinación del análisis citogenético y metodologías moleculares como FISH y microarreglos (aCGH), permitirá confirmar y/o caracterizar completamente alteraciones observadas por CC (6,44).

Utilizar la estrategia de análisis planteada en este trabajo, que involucra un análisis citogenético en 50 metafases de SP, PC y PO de cada paciente y en los casos que la CC no es concluyente, realizar estudio molecular, permitirá: 1) Incrementar la probabilidad de detectar MC en pacientes con MP y 2) Poder obtener una correlación genotipo-fenotipo en aquellos pacientes en los que la alteración este caracterizada

completamente. Los resultados obtenidos ayudarán al médico genetista a establecer un diagnóstico integral para los pacientes con MP.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Detectar mosaico cromosómico en linfocitos de sangre periférica y fibroblastos de piel clara y de piel oscura en pacientes con mosaicismo pigmentario.

4.2 Objetivos Particulares

1. Caracterizar a nivel citogenético las alteraciones encontradas en pacientes con MP.
2. Caracterizar por métodos moleculares las alteraciones cromosómicas en aquellos casos en los que la citogenética convencional no sea concluyente.
3. Obtener en los casos en que se pueda, una correlación genotipo-fenotipo, que permita junto con el médico especialista brindarle al paciente un consejo genético adecuado.

5. HIPÓTESIS

Se detectarán alteraciones cromosómicas en al menos 30% de la población analizada.

6. METODOLOGÍA

6.1 Población de Estudio

En el presente trabajo se analizaron muestras de SP, PC y PO de 12 pacientes en edad pediátrica con diagnóstico de MP asociado a retraso psicomotor y/o dismorfias, que acudieron a los servicios de Genética Humana y Dermatología del Instituto Nacional de Pediatría entre el periodo 2014-2015.

6.2 Criterios de Inclusión

1. Pacientes que cumplen con los criterios clínicos de MP: Dermatitis localizada o diseminada, caracterizada por la presencia de máculas hiperocrómicas o hipocrómicas que sigan el patrón de las líneas de Blaschko. Las máculas deben estar presentes al nacimiento, durante el primer año de vida.
2. Que acepten participar en el estudio y firmen carta de consentimiento informado (Anexo 1).

6.3 Criterios de Exclusión

1. Pacientes con los que no se cuente con el material necesario para el estudio citogenético y/o molecular, ya sea de SP o fibroblastos.

2. Pacientes con otra dermatosis que siga el patrón de líneas de Blaschko como vesículas, ampollas o neoformaciones.

3. Pacientes con alteraciones pigmentarias relacionadas con desórdenes monogénicos con herencia autosómica dominante o recesiva, como síndrome de Waardengburg y con herencia ligada al X, como incontinenencia pigmenti.

6.4 Estudio Citogenético

6.4.1 Estudio citogenético en linfocitos de sangre periférica

De cada paciente se obtuvieron 5ml de sangre periférica con anticoagulante. Se realizó un cultivo celular para obtener el material cromosómico necesario para el análisis citogenético.

6.4.2 Siembra, cosecha, obtención de laminillas y bandas GTG

Bajo condiciones de esterilidad se colocaron 15 gotas de muestra en un tubo con 8ml de medio de cultivo RPMI 1640 y se adicionaron 0.2ml de fitohemaglutinina como agente mitógeno. Se incubó a 37°C durante 72 hrs. Durante la cosecha, se añadió al cultivo 0.2ml de colchicina (0.02 µg/ml) y se incubó durante 2 hrs/37°C, posteriormente se centrifugó a 1500 rpm/10 min y se añadieron 8ml de solución hipotónica de KCl (0.075M) a 37°C/15 min. Se realizó una prefijación con 2ml de solución de Carnoy (metanol:ácido acético 3:1) y se realizaron lavados posteriores con la misma solución hasta que se obtuvo un paquete celular limpio (45).

A partir del paquete celular obtenido, se hicieron laminillas dejando caer dos gotas del material sobre un portaobjetos frío y se dejó secar sobre una parrilla caliente hasta evaporar completamente el fijador. Se evaluó la calidad de las laminillas bajo el microscopio y se sometieron a un proceso de maduración a 60°C/24hrs. El bandedo GTG se realizó mediante una degradación enzimática con tripsina-EDTA (0.015g-0.01g), tratamiento con buffer Sørensen (KH₂PO₄, Na₂HPO₄) y se tiñeron con colorantes Wright (50%) y Giemsa (5%) (43). Para los casos que fuera necesario, se obtuvieron laminillas para FISH que se mantienen hasta su uso a 4°C.

6.4.3 Estudio citogenético en fibroblastos de piel

De cada paciente se obtuvieron biopsias de PC y PO (4mm) y se realizó un cultivo de fibroblastos.

6.4.4 Siembra de biopsia de piel, cosecha de fibroblastos y bandas GTG

Bajo condiciones de esterilidad, se disgregó el tejido en presencia de tripsina-EDTA (0.05%), obteniéndose pequeños explantes que se colocaron manualmente en una caja falcon. A cada explante se le adicionaron 1-2 gotas de medio completo Amniomax y se incubó a 37°C con 5% de CO₂. El cultivo se mantuvo en constante revisión para observar su evolución. Una vez que la monocapa de fibroblastos alcanzó un 70-75% de confluencia, se realizó el subcultivo celular en cubreobjetos de 22X22mm dentro de cajas Petri y se

incubaron a 37°C/48 horas. Para la cosecha, Se agregaron 9µl de colcemida (1µg/ml) a cada cultivo y se incubaron a 37°C/20 minutos. Se retiró sobrenadante y se adicionaron 3ml de solución hipotónica (KCl 0.75M) a 37°C/20 minutos. Se retiró sobrenadante y se agregaron 2ml de solución de Carnoy fría (metanol-ácido acético 3:1). Se realizaron 3 lavados sucesivos con la misma solución hasta obtener preparaciones limpias. Posteriormente se sometieron a un proceso de maduración a 60°C/24hrs para después realizar el bandeo GTG, siguiendo el mismo protocolo de degradación y tinción que para linfocitos. A la par se obtuvieron preparaciones para FISH, que se mantienen a temperatura ambiente hasta su utilización en caso necesario.

6.5 Estudio Molecular

6.5.1 Extracción de DNA

Para sangre periférica, se obtuvieron 3ml de SP con anticoagulante y se utilizó un kit comercial para extracción de DNA a partir de sangre total (QIAamp DNA Blood Midi, QIAGEN).

Para fibroblastos, al mismo tiempo en que se realizó el subcultivo de células, se obtuvo un cultivo secundario de cada tipo de piel. La extracción de DNA se hizo mediante un kit comercial (Blood & cell culture DNA Mini Kit, QIAGEN).

El DNA se cuantificó mediante espectrofotometría y se determinaron los cocientes A260/280 y A230/260 para conocer la pureza de la muestra. Se realizó un gel de agarosa al 1% en buffer TBE, se tiñó con red gel (10,000X en DMSO) y se observó en una cámara con luz UV para valorar integridad.

6.5.2 Microarreglos de aCGH

Para el análisis por microarreglos de aCGH 60K y 1000K versión hg19, se analizaron 500 ng y 1000 ng de DNA genómico purificado, marcado con fluorescencia y se comparó con respecto a un DNA control femenino. Los DNAs se hibridaron con un microarreglo genómico humano de 60.000 sondas (Agilent 60K) y de 1.000.000 sondas (Agilent, 1M) respectivamente, mediante hibridación genómica comparativa.

6.6 Análisis de Resultados

6.6.1 Análisis citogenético

Se analizaron 50 células en metafase de cada tipo de tejido para poder descartar MC superior al 5%, con base en los criterios de Hook, y utilizando los criterios del Sistema Internacional de Nomenclatura de Citogenética Humana (ISCN) 2013 (43,46).

6.6.2 Análisis molecular

Para el análisis molecular se eligieron aquellos pacientes que presentaron alteraciones cromosómicas que no pudieron ser completamente caracterizadas por técnicas de citogenética convencional.

La técnica utilizada para la caracterización de estas alteraciones, fue el microarreglo de aCGH, el cual basa su fundamento en el uso de cantidades iguales de un DNA genómico (DNAg) problema y un DNAg de referencia (el cual se sabe que proviene de células humanas diploides normales). Ambos juegos de DNAg son fragmentados y posteriormente marcados con fluoróforos diferentes (p ej: Cy3, un fluoróforo verde para el DNAg control y Cy5, un fluoróforo rojo para el DNAg problema), posteriormente estos DNA son combinados para hibridar de manera competitiva con sondas de DNA que están presentes en el microarreglo, las cuales contienen secuencias de los 23 cromosomas humanos (Figura 13) (44,47,48).

Los resultados son procesados en un equipo que mide fluorescencia y se analizan mediante técnicas bioinformáticas y análisis estadístico. Cuando las muestras de DNAg problema o control hibridan con las sondas del microarreglo, la intensidad de fluorescencia es medida y será proporcional al número de copias de secuencias de DNA en los genomas problema y control (49,50). La intensidad de fluorescencia emitida por cada fluoróforo es reportada como *Log R*, el cual representa el logaritmo base 2 del cociente:

$$\text{LogR: } \frac{R \text{ problema}}{R \text{ control}}$$

En donde R problema es la intensidad de fluorescencia del DNAg problema y R control es la intensidad de fluorescencia del DNAg control. Este valor se grafica para cada locus cromosómico, lo que permite observar variaciones en el número de secuencias de DNA de cada cromosoma. Así, un LogR cercano a 0 indica que ambos juegos de DNA hibridaron en la misma proporción, por lo tanto el número de copias de secuencias de DNA en el DNAg problema y control es el mismo; valores superiores a 0 indican una ganancia en el número de copias de secuencias de DNA en el DNAg problema y valores inferiores a 0 indican una pérdida (Figura 13) (49,51).

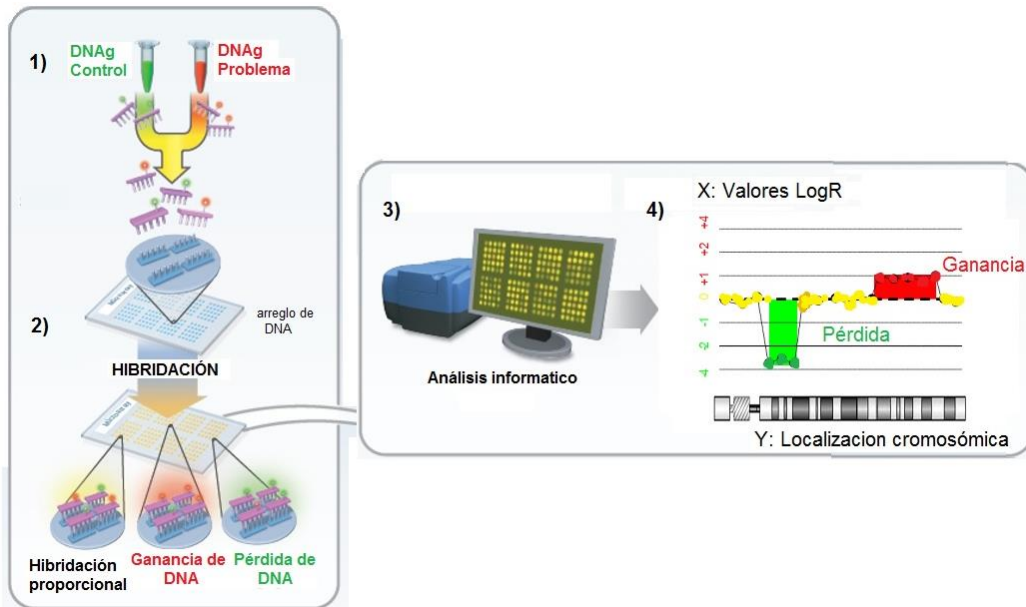


Figura 13. Principio e interpretación de un microarreglo de Hibridación Genómica Comparativa. (Tomado y Modificado de Theisen A, 2008).

Las alteraciones caracterizadas o detectadas por los microarreglos de aCGH, fueron analizadas con la base de datos UCSC Genome Browser (GB), la cual contiene enlaces a distintas bases de datos (p ej: OMIM, ClinVar y DECIPHER entre otras), que permiten obtener información génica y fenotípica útil para la interpretación de las alteraciones (52).

6.6.3 Correlación Genotipo-Fenotipo.

Con la finalidad de poder obtener una asociación genotipo-fenotipo, se tomaron en cuenta las alteraciones cromosómicas completamente caracterizadas y con la ayuda de un médico especialista, se utilizó una descripción de las características fenotípicas más relevantes de los pacientes. Con esta información, y la búsqueda en diversas fuentes bibliográficas, se estableció una correlación genotipo-fenotipo para los pacientes. El resultado de este análisis, ayudará al médico genetista a brindarle al paciente un diagnóstico certero, relacionado a las alteraciones genéticas que presentaron.

7 RESULTADOS

7.1 Análisis citogenético

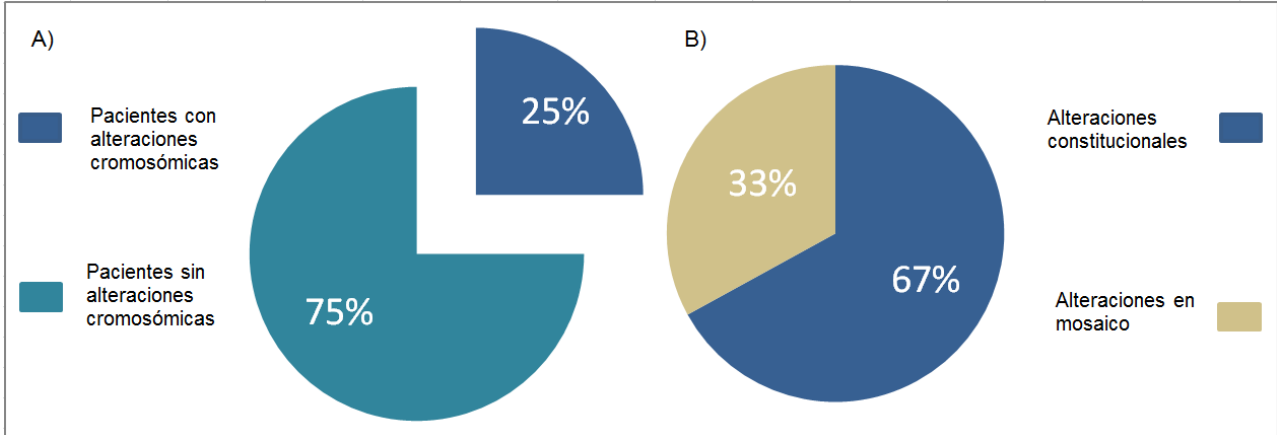
En este estudio se analizaron muestras de SP, PC y PO de una serie de 12 pacientes pediátricos con diagnóstico de MP asociado a retraso psicomotor y/o dismorfias (Tabla 3).

Tabla 3. Características de la población de Estudio

Clave del paciente	Edad y Genero (F/M)	Diagnóstico Genético	Diagnóstico Dermatológico
MP-45	3 años 7 meses (F)	RPM, microsomnia hemifacial derecha , microftalmia , microcefalia , ano inperforado y MP Dx: Probable Síndrome de MIDAS	Dermatosis diseminada a tronco, cabeza y extremidad inferior que afecta al hemicuerpo derecho con manchas HP e HPO que siguen LB.
MP-46	6 años 2 meses (F)	RPM,DFM, hipoplasia de nervios ópticos, atrofia y heterocromía del iris y MP Dx: Probable Síndrome de deleción 13q31 y Síndrome de Waardenburg-Shah	Dermatosis caracterizada por lesiones HP en la parte posterior de los muslos y en extremidades que siguen LB.
MP-47	3 años 9 meses (F)	DFM, cabello con implantación baja en región frontal, hipertricosis y MP	Dermatosis diseminada a tronco, extremidades superiores y abdomen con manchas HPO (ovales, longitudinales y lanceoladas) que siguen LB.
MP-48	3 años 7 meses (F)	DFM, hemihipertrofia, microtia grado I y MP	Dermatosis diseminada a ambos miembros pélvicos con manchas lineales HP e HPO que siguen LB.
MP-50	10 años 6 meses (F)	DFM, alteraciones dentales, cuello y torax anchos, hiperlaxitud en codos bilateral y MP	Dermatosis bilateral localizada a abdomen con manchas HP que siguen LB y presencia de 2 nevos en el dorso.
MP-51	15 años 8 meses (F)	RM, DFM, antecedente de retinoblastoma y MP	Manchas HP en extremidades superiores e inferiores que siguen LB.
MP-52	8 años 8 meses (F)	Discapacidad intelectual, DFM, disquitiiasis bilateral y MP	Dermatosis diseminada a tórax, abdomen y extremidades con maculas HP e HPO que siguen LB.
MP-53	11 años 6 meses (F)	RPM, DFM, discapacidad intelectual leve, microcefalia, frente estrecha con hipertricosis y MP	Dermatosis diseminada a tronco y extremidades con manchas HP que siguen LB.
MP-54	2 años 9 meses (F)	RPM leve, DFM, clinodactilia, MARA post-operatoria y MP	Mosaico pigmentario que sigue LB.
MP-55	2 años 9 meses (M)	Microcefalia, RPM, DFM, polidactilia preaxial con pulgar trifalangico y pliegues plantares aberrantes	Dermatosis diseminada a extremidades inferiores que sigue LB
MP-56	1 año (F)	Retraso global del Neurodesarrollo, peso y talla bajos, dolicocefalia, extremidades hipotróficas, DFM, retrognatia, Síndrome colestasico y MP	Dermatosis localizada a tronco que afecta a hemicuerpo izquierdo (tórax, abdomen y espalda) con manchas HP que respetan la línea media y siguen LB.
MP-57	7 años 5 meses (F)	Craneo con tendencia a dolicocefalia, DFM, Hipotonia generalizada, pies en forma de mecedora bilateral con calcáneo prominente.	Dermatosis diseminada a abdomen y cara interna de muslos con manchas HP que siguen LB, además, mancha café claro en dorso.

Dx: Diagnóstico; F: Femenino; M: Masculino; MP: Mosaico pigmentario; LB: Líneas de Blaschko; RPM: Retraso psicomotor; DFM: Dismorfias faciales menores; RM: Retraso mental; MARA: Malformación ano-rectal alta; HP:hiperpigmentación HPO: Hipopigmentación

En el 75% de los pacientes (9/12), se observó un cariotipo normal y el 25% restante (3/12) tuvo un cariotipo con alteraciones cromosómicas. Del grupo con alteraciones, en el 67% la alteración se presentó en todas las células y en el 33% en estado de mosaico (Gráficas 1A y 1B).



Gráfica 1. Proporción de pacientes con alteraciones cromosómicas A) 25% de los pacientes tuvieron alguna alteración cromosómica y B) 33% de estas alteraciones cromosómicas, se presentan en estado de mosaico.

En la tabla 4 se muestran los resultados del análisis citogenético en SP, PC y PO de cada uno de los pacientes con MP. Para cada paciente, se analizaron 50 metafases de cada tejido (excepto SP de MP-45, MP-51 y MP-54 con 15 metafases), con un nivel de resolución de 300-600B.

Tabla 4. Análisis Citogenético en pacientes con Mosaicismo Pigmentario	
Clave del paciente	Cariotipo en los 3 tejidos analizados
MP-45	** SP: 46,XX [15] PC: 46,XX,22pstk- [50] PO: 46,XX,22pstk- [50]
MP-46	SP: 46,XX,del(13)(q21q32) [50] PC: 46,XX,del(13)(q21q32) [50] PO: 46,XX,del(13)(q21q32) [50]
MP-47	SP: 46,XX,9qh+ [50] PC: 46,XX,9qh+ [50] PO: 46,XX,9qh+ [50]
MP-48	SP: 46,XX [50] PC: 46,XX [50] PO: 46,XX [50]
MP-50	SP: 46,XX [50] PC: 46,XX [50] PO: 46,XX [50]
MP-51	** SP: 46,XX [15] PC: 46,XX,1qh+ [50] PO: 46,XX,1qh+ [50]
MP-52	SP: 46,XX,22pstk-ps- [50] PC: 46,XX,22pstk-ps- [50] Rupturas cromatídicas y cromosómicas en diferentes células: chrb(9)(q?); chtb(10)(q23) PO: mos 47,XX,+12,22pstk-ps- [44]/ 46,XX,22pstk-ps- [6] Rupturas cromatídicas y cromosómicas en diferentes células: chrb(X)(p10); chtb(1)(q22); chtb(2)(p32); chrb(3)(q27); chrb(11)(q24); chtb(12)(q24); chrb(16)(q?); tr(1q;10q)
MP-53	SP: 46,XX,del(4)(p16.1p15.3),16qh+ [50] PC: 46,XX,del(4)(p16.1p15.3),16qh+ [50] PO: 46,XX,del(4)(p16.1p15.3),16qh+ [50]
MP-54	SP: 46,XX [15] PC: 46,XX [50] PO: 46,XX [50]
MP-55	** SP: 46,XY [15] PC: 46,XY,1qh- [50] PO: 46,XY,1qh- [50]
MP-56*	PC: 46,XX [50] PO: 46,XX [50]
MP-57	SP: 46,XX,13ps- [50] PC: 46,XX,13ps- [50] PO: 46,XX,13ps- [50]

SP: Sangre periférica; PC: piel clara; PO: piel oscura. *Pacientes en los que solo realizó el análisis en PC y PO. ** El estudio citogenético en SP fue realizado por una persona independiente al estudio

De los tres pacientes con alteraciones, en el paciente MP-46, se detectó en los tres tejidos una deleción intersticial en el brazo largo (q) del cromosoma 13: 46,XX,del(13)(q21q32) (Tabla 4 y Figura 14). El análisis cromosómico en los padres fue normal.

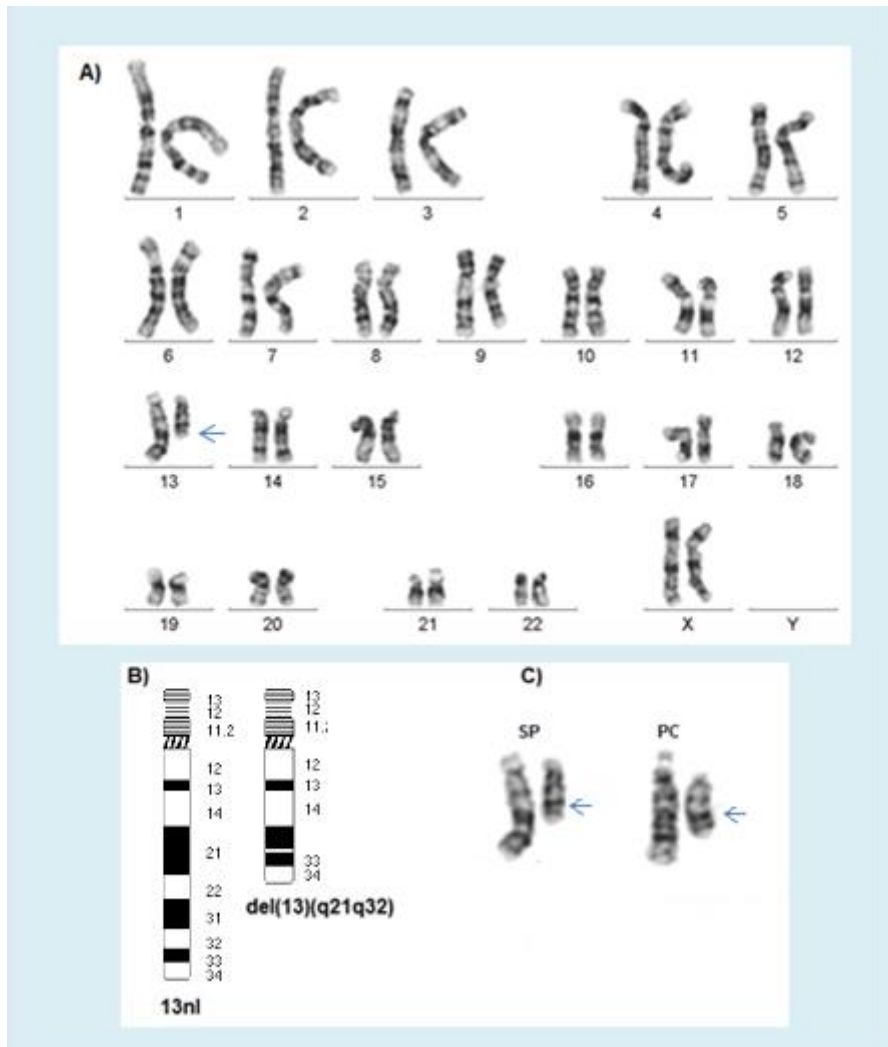


Figura 14. Cariotipo del paciente MP-46. A) Cariotipo en SP: 46,XX,del(13)(q21q32) [50]; **B)** Ideograma del cromosoma 13 normal (13nl) y delecionado. **C)** Cariotipo parcial en SP y PC donde se muestra el cromosoma 13 normal (izq) y el cromosoma 13 delecionado (flecha azul).

En la paciente MP-53, se detectó una deleción intersticial en el brazo corto del cromosoma 4 (p): 46,XX,del(4)(p16.1p15.3),16qh+ en SP,PC y PO (Tabla 4 y Figura 15). No se tiene cariotipo de los padres.

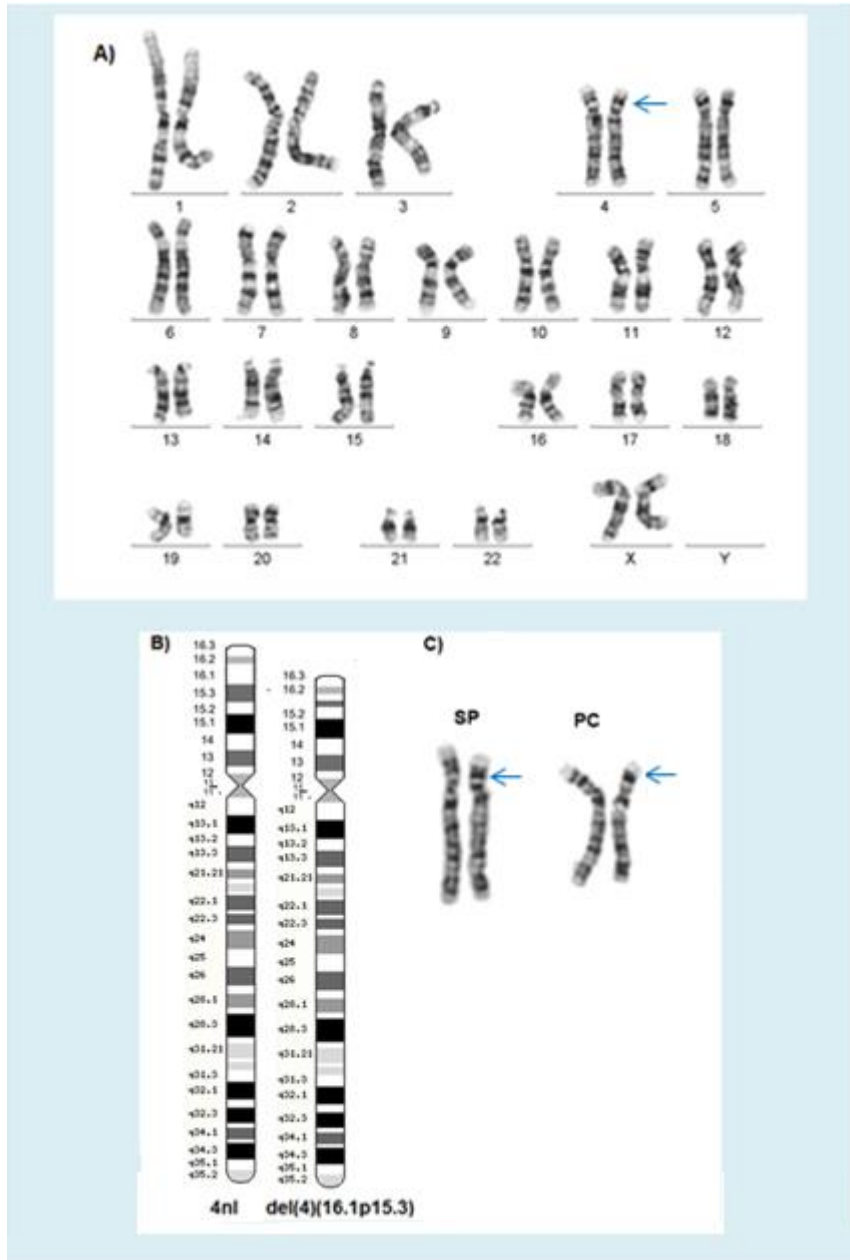


Figura 15. Cariotipo del paciente MP-53. A) Cariotipo en SP: 46,XX,del(4)(p16.1p15.3),16qh+; **B)** Ideograma del cromosoma 4 normal (4nl) y delecionado. **C)** Cariotipo parcial en SP y PC donde se muestra el cromosoma 4 normal (izq) y el cromosoma 4 delecionado (flecha azul).

El paciente MP-52, presentó un cariotipo normal en SP y PC (Tabla 4 y Figura 16 A y B), y en PO se detectó un MC compuesto por las siguientes líneas celulares: mos 47,XX,+12,22pstk-ps- [44]/46,XX,22pstk-ps- [6] (Tabla 4 y Figura 16 C). En este paciente, además del hallazgo de MC confinado a PO, en ambos tipos de piel se detectaron rupturas cromosómicas y cromátidicas en diferentes células (Tabla 4).



Figura 16. Cariotipo parcial del paciente MP-52. A y B) Cariotipo parcial normal de SP y PC; **C)** Mosaico cromosómico: mos 47,XX,+12,22pstk-ps- [44]/46,XX,22pstk-ps- [6] (flecha azul).

7.2 Análisis molecular

El análisis molecular mediante microarreglos de aCGH, se realizó en los 2 pacientes con deleciones intersticiales (MP-46 y MP-53) detectadas por CC, con la finalidad de obtener los puntos de ruptura con mayor precisión y conocer los genes involucrados en las deleciones.

En el paciente MP-46, el análisis con el microarreglo de 60K de Agilent, confirmó una delección observada mediante bandas GTG, y con certeza indicó que se trata de una delección monoalélica de 32.7 Mb en donde las bandas 13q21.31-q32.1 están delecionadas (Figura 17).

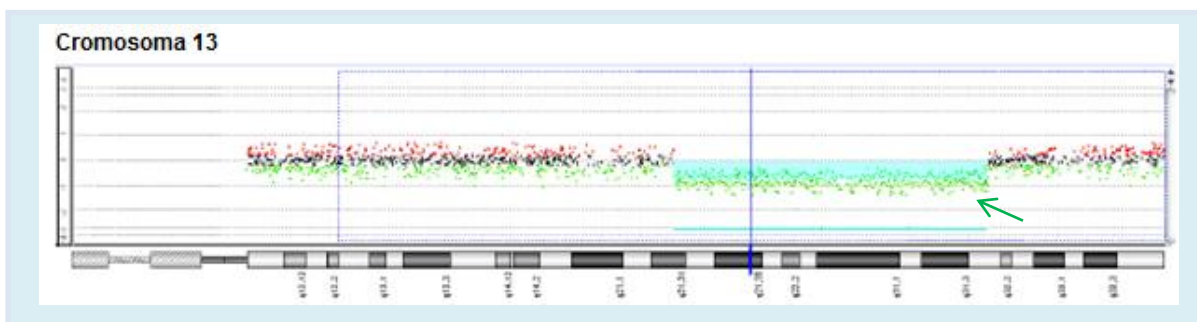


Figura 17. Análisis molecular (microarreglos de aCGH Agilent 60K, hg19) en el paciente MP-46. Delección de 32.7Mb en las bandas 13q21.31-q32.1 (Flecha verde).

En la paciente MP-53, el análisis con el microarreglo de 1000K de Agilent, permitió corroborar y delinear con precisión una delección monoalélica de 7.5 Mb, en las bandas 4p16.1-p15.32 (Figura 18A) y en este caso, además permitió identificar una microduplicación monoalélica de 0.81Mb a nivel de las bandas 8p22-p21.3, no detectada previamente mediante el análisis cromosómico, debido a que se trata de una delección por debajo del nivel de detección de la CC (>5Mb) (Figura 18B) (44).

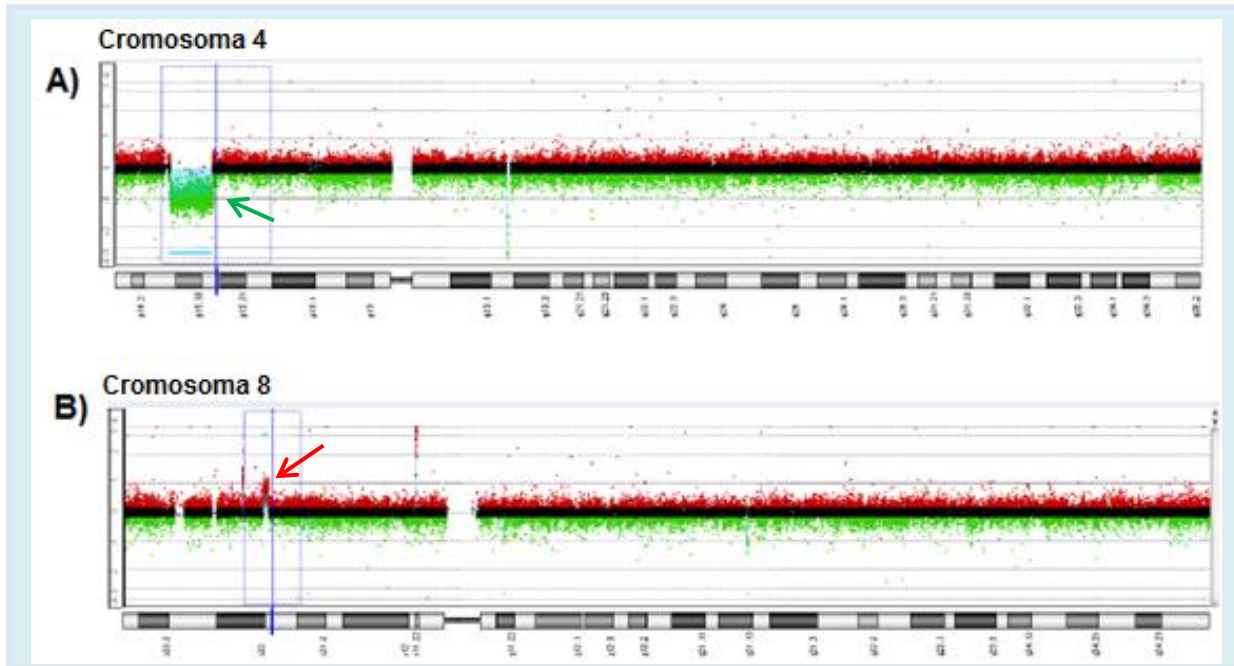


Figura 18. Análisis molecular (microarreglos de aCGH Agilent 100K, hg19), en el paciente MP-53 **A)** Delección de 7.5Mb que involucra las bandas 4p16.1-p15.32 (Flecha verde) y **B)** Microduplicación de 0.81Mb en las bandas 8p22-p21.3 (Flecha roja).

En la tabla 5 se muestran los resultados del análisis mediante aCGH, así como el número de genes involucrados en cada una de las alteraciones para la posterior correlación genotipo-fenotipo.

Tabla 5. Caracterización molecular de las pacientes MP-46 y MP-53
PACIENTE MP-46
46,XX,arr[hg19]13q21.31q32.1(63,958,459-96,671,274)x1 La región delecionada mide 32.7Mb y afecta a 111 genes y 116 pseudogenes.
PACIENTE MP-53
46,XX,arr[hg19] 4p16.1p15.32(10.047.354-17.614.303)x1, 8p22p21.3(18.712.712-19.523.339)x3 La región delecionada mide 7.5Mb y afecta a 30 genes. La región duplicada mide 0.81Mb y afecta a 3 genes: <i>PSD3</i> , <i>SH2D4A</i> y <i>GSGALNACT1</i>

Con la información obtenida mediante el análisis de microarreglos, ambos pacientes pudieron ser caracterizados a nivel genético y utilizando la base de datos UCSC Genome Browser se obtuvo la siguiente información:

Para las deleciones en 13q y 4p, en la base datos ClinVar y mediante la búsqueda en diferentes fuentes bibliográficas, no se encontraron reportes de deleciones que compartan los mismos puntos de ruptura, sin embargo en ClinVar y DECIPHER si se tiene registro de deleciones cuyos puntos de ruptura se traslapan o cubren la región de las deleciones detectadas en lo pacientes que se describen en este trabajo. Con relación a la microduplicación en 8p, en ClinVar existe el registro de dos pacientes que comparten los mismos puntos de ruptura a nivel cromosómico que la detectada en este trabajo, con variaciones moleculares a nivel de posición de nucleótidos involucrados y tamaño (Mb) de la duplicación (Tabla 6) (53).

Tabla 6. Microduplicaciones en 8p22-21.3 registradas en ClinVar.			
	(8p22-21.3x3)	(8p22-21.3x3)	MP-53 (8p22-21.3x3)
Número de registro	RCV000135831	RCV000142194	-
Posición de nucleótidos	chr8:18845845-19456780	chr8: 18852451-19355561	chr8:18712712-19523339
Tamaño	0.61Mb	0.50 Mb	0.81Mb
Significado Clínico	Benigna (Evaluada por última vez en Enero 30,2010)	Significado desconocido (Evaluada por última vez en Noviembre 27,2013)	-
Genes involucrados	<i>PSD3, SH2D4A, GSGALNACT1 y LOC100128993</i>	<i>PSD3, SH2D4A y LOC100128993</i>	<i>PSD3, SH2D4A y GSGALNACT1</i>

En ClinVar y DECIPHER se tienen registradas otras duplicaciones en 8p clasificadas como patológicas y que traslapan tanto con la microduplicación detectada en nuestro paciente como con las descritas en la tabla 6, sin embargo ninguna está delimitada a la región 8p22-21.3 y todas involucran a más de 4 genes.

7.3 Descripción fenotípica de los pacientes con alteraciones cromosómicas

Con ayuda del médico genetista, a continuación se describen las características fenotípicas de los pacientes con alteraciones cromosómicas, en los que tomando en cuenta los resultados tanto del análisis citogenético como molecular, se podrá obtener una adecuada correlación genotipo-fenotipo.

Paciente MP-46: Paciente femenino de 4 años 10 meses de padres sanos no consanguíneos que presenta retraso psicomotor leve, mosaico pigmentario, dismorfias faciales menores y alteraciones digitales (Figura 19).

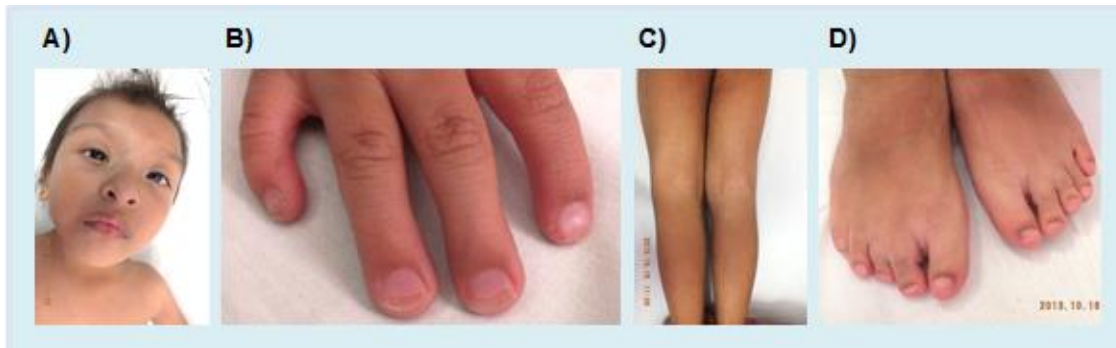


Figura 19. Características fenotípicas de la paciente MP-46. A) Dismorfias faciales (cejas separadas, puente nasal aplanado y nariz bulbosa); alteraciones oftalmológicas (heterocromía y atrofia del iris); **B)** Clinodactilia del 5º dedo; **C y D)** Lesiones hiperpigmentadas en la parte posterior de los muslos y en extremidades inferiores que siguen LB.

Paciente MP-53: Femenina de 10 años 8 meses proveniente de casa hogar, no se cuentan con antecedentes familiares, perinatales ni obstétricos y presenta dismorfias faciales leves, microcefalia, discapacidad intelectual leve y mosaico pigmentario con lesiones hiperpigmentadas en extremidades que siguen LB.

Paciente MP-52: Paciente femenino de 8 años 8 meses de padres sanos no consanguíneos que presenta discapacidad intelectual, mosaico pigmentario, dismorfias faciales menores y cardiopatía. La madre niega exposición a agentes teratógenos y toxicomanías (Figura 20).

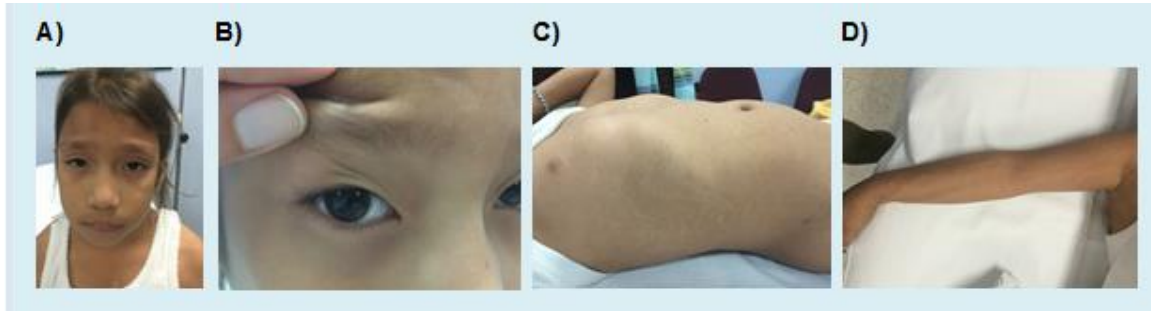


Figura 20. Características fenotípicas de la paciente MP-52. A) Dismorfias faciales (asimetría facial con hipoplasia derecha, cejas muy separadas, ptosis palpebral y puente nasal deprimido); **B)** Triple hilera de pestañas superiores bilateral; **C y D)** Dermatitis diseminada a tórax y extremidades con máculas hipercrómicas e hipocrómicas que siguen LB.

7.3.1 Correlación Genotipo-Fenotipo

Con la información obtenida a partir del análisis molecular y considerando la descripción fenotípica en los pacientes MP-46 y MP-53, se obtuvo una lista de genes candidatos que están involucrados tanto en la delección en 13q21.31q32.1 como en la delección en 4p16.1-p15.32, que de alguna manera pudieran asociarse con los hallazgos fenotípicos de ambos pacientes (Tabla 7A y 7B) (54-57).

Tabla 7. A) Correlación Genotipo-Fenotipo en el paciente MP-46		
Locus	Gen	Características fenotípicas en el paciente
13q22.3	<i>EDNRB</i>	Asociado a características clínicas del Síndrome de Waardenburg-Shah como heterocromía del iris.
13q32.1	<i>GPR180</i>	Asociado a Síndromes que causan atrofia de iris debido a su implicación en el desarrollo de las células del músculo liso.
13q31.3	<i>MIR17HG</i>	Delecciones heterocigotas de este gen se asocian con características clínicas del Síndrome de Feingold 2: clinodactilia del quinto dedo.
B) Correlación Genotipo-Fenotipo en el paciente MP-53		
4p16.1	<i>PPP2R2C</i>	La interrupción de este gen se asocia con discapacidad intelectual.

Con respecto a la microduplicación en 8p22p21.3, los genes involucrados en la alteración no se relacionan con alguna de las características fenotípicas del paciente.

Para el paciente MP-52, al tratarse de una trisomía completa del cromosoma 12, donde varios o ninguno de los genes en triple dosis de todo el cromosoma, podrían estar asociados con alguna de las características fenotípicas del paciente, se decidió realizar una búsqueda bibliográfica de casos con trisomía 12 en mosaico y conocer si las características fenotípicas de los casos reportados en la literatura se comparten con las que presenta el paciente (Tabla 8) (58-61).

Tabla 8. Correlación genotipo-fenotipo en la paciente MP-52					
Referencia	Cariotipo ^a	Características clínicas			
		AP	DFM	CP	THPSB
Richer et al., 1977	SP: mos 47,XY,+12 [7%]/46,XY [93%]	-	-	-	-
Patil et al., 1983	SP: mos 47,XX,+12 [7]/46,XX [46]	-	+	+	-
English et al., 1994	PC: mos 47,XX,+12 [6]/46,XX [50]	+	+	+	-
Aughton et al., 1996	Piel ^b : mos 47,XX,+12 [19]/48,XX,+12,+20 [2]/ 46,XX [29]	-	+	-	-
De Lozier-Blanchet et al.,2000	PO: mos 47,XX,+12 [7]/46,XX [38]	+	+	+	-
Al Hertani et al., 2012	PO :mos 47,XX,+12 [4]/46,XX [17]	+	+	+	-
Paciente MP-52	PO :mos 47,XX,+12 [44]/ 46,XX [6]	+	+	+	+

a) Cariotipo en el tejido en donde se encontró la línea celular trisómica.

b) Se desconoce el tipo de piel analizada.

- característica ausente; + característica presente; AP: Alteraciones pigmentarias;

DFM: Dismorfias Faciales Menores; CP: Cardiopatía; THPSB: Triple hilera de pestañas superiores bilateral

Hasta ahora no existe un estudio en el cual se asocian las características fenotípicas de los pacientes con trisomía 12 en mosaico con la triple dosis de genes ubicados en dicho cromosoma.

A nivel fenotípico, como puede observarse en la tabla 8, las alteraciones pigmentarias, las dismorfias faciales menores y la cardiopatía, son características presentes en la mayoría de los casos con trisomía 12 en mosaico que han sido reportados en la literatura, las cuales también se observan en el paciente MP-52. Con respecto a la triple hilera de pestañas superiores bilateral, es una dismorfia que no se comparte con ninguno de los casos reportados.

8 Discusión

8.1 Análisis citogenético

El MP ha sido asociado a la presencia de MC y de acuerdo a lo reportado en la literatura, del 30-60% de estos pacientes presentan alteraciones cromosómicas, de las cuales hasta un 80% se presentan en forma de mosaico (24,25,37); en nuestro grupo de estudio, el análisis citogenético reveló un 25% de pacientes con alteraciones cromosómicas de los cuales, 2 pacientes presentaron deleciones intersticiales del cromosoma 13 y 4 en todas las células analizadas y en un paciente se detectó una trisomía completa del cromosoma 12 en mosaico, confinada a un solo tejido.

En la literatura existen reportes de pacientes con MP en los que se describen alteraciones del cromosoma 13 en mosaico, estas incluyen monosomías, trisomías completas, trisomías parciales asociadas a la presencia de cromosomas marcadores, anillos y tetrasomías parciales asociadas a isocromosomas de brazos largos, todas estas encontradas principalmente en pacientes con MP de tipo filoide (62-64). En general, en pacientes con MP, las deleciones en 13q son un hallazgo poco común. Existen 4 reportes: dos casos con deleción en 13q11 (63,65), un caso con deleción en 13q13.3 (39) y un caso con cariotipo 45,XX,-13,+frag (64), los cuales describen MP asociado a deleciones terminales del cromosoma 13 en mosaico, pero hasta ahora no existen reportes de MP asociado a deleciones intersticiales del cromosoma 13 en todas las células. La presencia de esta alteración se ha asociado con otras anomalías pigmentarias (p ej: Síndrome de Waardenbug Shah) (54).

Las deleciones intersticiales en 4p son relativamente raras, hasta el 2015 se han descrito 36 casos (66-67). Existen solo 2 reportes que describen alteraciones del cromosoma 4 en pacientes con MP: un caso en el que se detectó material adicional en 4p y un caso con un anillo r(4)(p16.3q35.2), reportados por Thomas et al., en 1989 y Sigurdarodottir et al., en 1999, sin embargo, no hay reportes que asocien MP con deleciones intersticiales en 4p (38,70).

Con respecto a los mecanismos de origen de las alteraciones encontradas, para la deleción en 13q21q32 realmente se desconoce su mecanismo de origen, pero tomando en cuenta que los padres tienen cariotipo normal, se asume que es *de novo*. En la literatura se mencionan diferentes mecanismos que pudieran dar origen a este tipo de alteraciones, como la exposición a ciertos agentes químicos, físicos o biológicos (p ej; vincristina, radiación ionizante o algunos tipos de virus) que pueden producir rupturas de doble cadena en el DNA, actuando como base molecular de las rupturas cromosómicas necesarias para originar una deleción (71), además de esto, se sabe que eventos aberrantes de recombinación entre regiones cromosómicas no alélicas durante la meiosis, pueden originar cromosomas recombinantes portadores de deleciones (19).

Para la deleción 4p16.1p15.3, se desconoce si se trata de una alteración *de novo* o si fue resultado de algún rearrreglo cromosómico presente en alguno de los padres. Lo más frecuente reportado en los casos con deleciones intersticiales en 4p, son deleciones de novo (70). Pero por otro lado, si se asumiera que se trata

de una deleción asociada a un rearrreglo cromosómico presente en alguno de los padres, esto podría explicarse de la siguiente manera: los portadores de inserciones intercromosómicas contienen un homólogo normal de cada par cromosómico involucrado en la inserción, un homólogo de un par cromosómico con una pérdida (cromosoma donador) y un homólogo del otro par con una ganancia (cromosoma receptor), la segregación de ambos pares cromosómicos durante la meiosis, podría producir gametos normales, balanceados, con duplicaciones o con deleciones del segmento involucrado en la inserción, y de esta manera, si uno de los progenitores del paciente fuera portador de una inserción intercromosómica que involucrara al segmento entre 4p16.1-15.3, este pudo haber aportado al cromosoma 4 donador del segmento y en su descendencia, éste se observaría como un cromosoma 4 con una deleción intersticial en 4p16.1p15.3 (9).

Al hablar de pérdidas de material cromosómico, es importante conocer el grado de desbalance genético que producen estas deleciones y se debe considerar un enfoque cuantitativo y uno cualitativo.

1) En un enfoque cuantitativo, las deleciones intersticiales detectadas en los pacientes MP-46 y MP-53 son deleciones heterocigotas, es decir, solo un homólogo es portador de la deleción, lo que produce un estado de hemiciogidad para los genes incluidos en el segmento delecionado. Si estos genes son incapaces de funcionar en una sola dosis (haploinsuficientes), esto puede provocar un alto grado de desbalance (9,71,72). Las deleciones visibles a nivel citogenético, incluyen gran cantidad de genes, pero su letalidad dependerá del tipo de material genético involucrado (71).

2) En un enfoque cualitativo, si el desbalance ocasionado por la deleción incluye genes con funciones que no comprometen la viabilidad celular, como genes cuya secuencia de DNA esta repetida en otro cromosoma o si incluye segmentos cromosómicos de baja densidad génica, podrá ser tolerado. Así, la densidad génica de la cromatina delecionada, será menor si involucra bandas G+ que bandas G- o regiones teloméricas, las cuales se sabe que son regiones de alta densidad génica (71,72).

En el paciente MP-46, la deleción intersticial en el cromosoma 13 es visible a nivel citogenético e involucra 2 bandas G+ (13q21 y 13q31) y 2 bandas G- (13q22 y 13q32). Las deleciones intersticiales del cromosoma 13 permiten la viabilidad debido a su baja densidad génica (72). El cromosoma 13 es el autosoma de menor densidad génica con 3.6 genes por Mb, en comparación por ejemplo con el cromosoma 19, el cual con 22.6 genes por Mb es el autosoma de mayor densidad génica (72,73). En la literatura existen reportes de deleciones intersticiales a lo largo del cromosoma 13 en nacidos vivos (75-77), lo cual funciona como evidencia de que este tipo de deleciones no comprometen la viabilidad, aunque si pueden provocar manifestaciones fenotípicas severas dependiendo de la región delecionada (75).

En el paciente MP-53, la deleción intersticial en el cromosoma 4, involucra una banda G+ (4p15.3) y una banda G- (4p16.1); es una deleción de menor tamaño, además de que después de los cromosomas 13 y 18, es el siguiente autosoma con menor densidad génica, ya que contiene 4.17 genes por Mb (74). Debido a estas características es probable que la deleción intersticial en 4p, detectada en el paciente MP-53 provoque un desbalance menor y pueda ser tolerada; como evidencia, Tonk et al., en 2003 realizaron una recopilación

de 20 pacientes con deleciones intersticiales en el brazo corto del cromosoma 4 y todos presentan características fenotípicas variables, sin embargo ninguna compromete la viabilidad e incluso se conserva la capacidad reproductiva (78).

La tercera alteración cromosómica encontrada, corresponde al paciente MP-52, con una trisomía 12 en mosaico confinada a un solo tejido. De los 8 casos con trisomía 12 reportados a la fecha, la mayoría la presenta confinada a algún tipo de piel (58).

Como posible mecanismo de origen de las diferentes líneas celulares encontradas en el paciente, se propone la hipótesis en la que como resultado de un evento de no disyunción meiótica, se originó un cigoto trisómico para el cromosoma 12, el cual sufre un rescate trisómico durante las mitosis post-cigóticas y genera un embrión compuesto de células disómicas y trisómicas para el cromosoma 12 (9).

Es importante mencionar que el hallazgo citogenético en el paciente MP-52, es un claro ejemplo de la importancia de utilizar la estrategia de análisis citogenético que se propone en este trabajo: la lectura de 50 metafases de SP, PC y PO, permitió la detección del MC: mos 47,XX,+12,22pstk-ps- [44]/ 46,XX,22pstk-ps- [6]. Como ya se ha mencionado, en los estudios reportados en la literatura (31,36,38,39), la caracterización citogenética de los pacientes con MP incluye el análisis en un número reducido de metafases de SP y solo un tipo de piel (PC o PO), lo que hubiera evitado la detección de la alteración debido a las siguientes razones:

1) Los pacientes con MP pueden presentar patrones de MCut muy extensos y poco delimitados, por lo que la distinción entre la piel sana y afectada puede ser difícil (25), además, la distribución de la clona celular anormal en el organismo puede ser variable por lo que ésta podría encontrarse en ambos tipos de piel o solo en uno (6). Debido a lo anterior, si en el paciente MP-52 la PC y SP hubieran sido elegidos para el estudio citogenético, no se habría detectado la línea celular trisómica, ya que se encuentra confinada a la PO. Con respecto al número de metafases, de acuerdo con los criterios de Hook (41), en un análisis en 15 metafases se excluye MC superior al 14%, por lo que si alguna de las clonas representa el 12% de las células analizadas, como ocurre con la línea celular disómica en la PO del paciente, ésta podría haber pasado desapercibida.

En este mismo paciente se detectaron tanto rupturas cromátidicas y cromosómicas, así como una figura radial entre los cromosomas 1 y 10, todas en diferentes células de la PC y PO. Existen reportes en donde se observan valores basales para estas alteraciones; Mozardani et al., en 2011, reportaron una frecuencia de 0.025 rupturas cromosómicas por célula en 50 metafases analizadas de individuos sanos (79), por lo que si tomamos en cuenta estos valores, la frecuencia de rupturas detectadas en este paciente (PC: 0.04 y PO: 0.14), están ligeramente por encima de los valores reportados para población sana. Se ha reportado también que la exposición a agentes químicos, físicos o biológicos con actividad clastogénica, pueden generar un incremento en la frecuencia de estas alteraciones (80-82), sin embargo en este paciente se descarta tanto a nivel pre-natal como post-natal, la exposición a agentes clastogénicos. A nivel fenotípico, no se observaron

manifestaciones que pudieran dirigir a la asociación con algún síndrome de inestabilidad cromosómica, que de alguna manera podría explicar la elevada frecuencia de rupturas en este paciente.

Por último, con respecto al grupo de pacientes con cariotipo normal, es importante considerar que al tratarse de un grupo tan heterogéneo a nivel citogenético y fenotípico, cabe la posibilidad de que: 1) la alteración se presente en un número muy bajo de células que no se descarte con el análisis de 50 metafases; 2) que se presenten anormalidades citogenéticas no detectables mediante citogenética convencional y 3) que se presente un mosaico a nivel molecular (mosaico génico o epigenético) (5,37).

8.2 Análisis molecular

En los estudios en los que se han aplicado las técnicas de citogenética molecular para el estudio de alteraciones presentes en los pacientes con MP, se ha conseguido detectar mosaico de bajo nivel, de las alteraciones encontradas se han obtenido puntos de ruptura exactos, se puede conocer el mecanismo de origen y establecer correlaciones genotipo-fenotipo, por lo que el uso de estas metodologías representa una estrategia valiosa en el abordaje de estos pacientes (41,42,63).

A nivel de citogenética convencional, el análisis de cromosomas de alta resolución (700-850 Bandas), ayuda de manera importante en la obtención precisa de puntos de ruptura, sin embargo, en ocasiones no se pueden obtener cromosomas con ese nivel de resolución, por lo que el utilizar herramientas moleculares como aCGH, sirve como una estrategia de apoyo para obtener con exactitud los puntos de ruptura y a la par obtener información de las características moleculares de la alteración (genes involucrados) (44,83).

En los pacientes MP-46 y MP-53, mediante aCGH se caracterizaron a nivel molecular las alteraciones detectadas con bandas GTG: se obtuvieron puntos de ruptura exactos para las deleciones intersticiales en 13q y 4p (Figuras 17 y 18), se determinó el tamaño exacto de ambas deleciones (32.7Mb y 7.5Mb respectivamente) y además en el paciente MP-53, se pudo detectar la microduplicación en 8p de 0.81Mb, que por su tamaño, pasó desapercibida a nivel citogenético.

A nivel molecular, las alteraciones que involucran ganancia o pérdida de material genético mayor a 1Kb, se les conoce como variantes del número de copias (CNV's) y de acuerdo con esta definición, las alteraciones en 13q, 4p y 8p detectadas mediante aCGH, pueden ser consideradas como CNV's (44). Al conocer la presencia de una CNV, es de gran importancia conocer su significado clínico y saber si se trata de una variante normal o un cambio que puede generar consecuencias en el fenotipo del paciente (84). En las bases de datos no existen reportes de deleciones con las mismas características que las encontradas en los pacientes MP-46 y MP-53, por lo que no existe un registro que las defina como patológicas, sin embargo, presentan algunas características que pueden hacerlas compatibles con una CNV de este tipo:

- Son CNV's de tipo delección
- En ClinVar se traslapan con CNV's clasificadas como patológicas
- Son de alta densidad génica (111 y 30 genes) y contienen genes cuya haploinsuficiencia se asocia a un fenotipo patológico
- Contienen genes para los cuales OMIM reporta un fenotipo asociado a las características clínicas del paciente (54-57).

En el caso de la CNV de tipo microduplicación detectada en la paciente MP-53, Clinvar reporta dos CNV's de tamaño similar y con los mismos puntos de ruptura, una clasificada como benigna y una de significado desconocido (Tabla 6); tomando en cuenta que ambas son similares a la detectada en dicho paciente, se puede considerar de carácter benigno, además de cumplir con criterios compatibles con una CNV de este tipo (84):

- Es una CNV de tipo duplicación
- No contiene genes que en triple dosis provoquen un fenotipo patológico
- Existen reportes de CNV similares en individuos sanos
- Es heterocigota y de baja densidad génica (3 genes)
- No contiene genes relacionados con las características clínicas del paciente

Para completar su perfil como CNV benigna, la microduplicación detectada debería estar presente en alguno de los progenitores o parientes sanos, sin embargo este dato se desconoce.

Debido a que en la mayoría de los pacientes con MP no se lleva a cabo una técnica molecular que permita la detección de CNV's de tipo microduplicación o microdelección, es complicado conocer la frecuencia de este tipo de alteraciones en estos pacientes. En nuestra población de estudio, no se descarta que este tipo de alteraciones pueda estar presente en los pacientes con cariotipo normal (9/12 pacientes) y que puedan funcionar como base patogénica del MP. Debido a esto, la indicación del clínico en cuanto a la existencia de una fuerte relación entre el fenotipo del paciente y una cromosomopatía, puede ayudar a la búsqueda de este tipo de alteraciones en pacientes con el cuadro clínico de MP.

A pesar de las ventajas que ofrece el microarreglo de aCGH, es importante considerar que no permite la detección de alteraciones a nivel génico (p ej: mutaciones puntuales) (44), las cuales han sido reportadas en pacientes con MP (37), por lo que no puede descartarse la presencia de mutaciones en nuestro grupo de pacientes. Tampoco permite la detección de reareglos cromosómicos balanceados, por lo que no puede utilizarse como una técnica de análisis independiente al cariotipo con bandas GTG, ya que existen reportes de alteraciones de este tipo en pacientes con MP (31,37,44).

8.3 Correlación Genotipo-Fenotipo

Las alteraciones de pigmentación en la piel y extra-cutáneas observadas en pacientes con MP en los que se detectaron alteraciones citogenéticas, pueden relacionarse con la expresión alterada de genes involucrados en la pigmentación y/o en el funcionamiento normal de células del SNC, del sistema músculo esquelético y del oftalmológico (37). En combinación con la información fenotípica de los pacientes, los resultados moleculares y la información bibliográfica, se intentó obtener una certera correlación genotipo-fenotipo en el grupo de pacientes en los que se detectaron alteraciones citogenéticas.

En el paciente MP-46, la región delecionada en 13q incluye genes asociados a alteraciones oftalmológicas, pigmentarias y digitales (Tabla 7).

1) En 13q22.3 se encuentra el gen *EDNRB*, que codifica un receptor acoplado a proteínas G, cuyo ligando es la endotelina 3 (*EDN*) (20q13.2q13.3); estas proteínas activan la vía de señalización *END3/EDNRB* encargada de la migración de melanoblastos y de células nerviosas a partir de la cresta neural durante la embriogénesis (28). Las mutaciones homocigótas se asocian con manifestaciones clínicas del Síndrome de Waardenburg-Shah (SWS) (OMIM#277580), el cual se caracteriza por hipopigmentación de piel y cabello, heterocromía del iris, megacolon agangliónico y sordera congénita (85-88). En la paciente MP-46, la heterocromía del iris es una característica compatible con el SWS (Figura 19A). Tuysuz et al., en 2009, reportaron 3 pacientes con manifestaciones del SWS y deleciones intersticiales en 13q, donde hay pérdida del gen *EDNRB*, por lo que sugieren que la haploinsuficiencia de este gen se relaciona con este síndrome (54).

2) En 13q31.3 se encuentra el gen *MIR17HG*, el cual codifica para un RNA policistrónico que da origen a un cluster de 6 miRNA's (*MIR18A*, *MIR19A*, *MIR19A1*, *MIR19B*, *MIR20* y *MIR92*), que juegan un papel importante en el desarrollo de extremidades durante la embriogénesis (55). Las deleciones heterocigótas se asocian con el Síndrome de Feingold 2 (OMIM#614326), el cual se caracteriza por la presencia de malformaciones digitales (braquidactilia, sindáctilia y clinodactilia) y retraso del crecimiento (55). De Pontual et al., en 2011, reportaron 3 pacientes con deleciones en 13q31.3 con pérdida de *MIR17HG*. Mediante RT-qPCR, observaron 50% de expresión de los 6 miRNA's codificados por *MIR17HG* en comparación con individuos sanos, por lo que sugieren que las malformaciones digitales pueden deberse a la haploinsuficiencia del gen (89). Por otro lado, Sharaidin et al., en 2013, describieron a un paciente con una deleción en 13q31.3 (*MIR17HG*) con clinodactilia del quinto dedo (55) y Hemmant et al., en 2014, reportaron un paciente con retraso del crecimiento y clinodactilia del cuarto y quinto dedo asociado a una microduplicación en 13q31.3 que involucra al mismo gen (90). En ambos estudios se considera que la haploinsuficiencia o la dosis extra del gen, es la causa de las malformaciones digitales. En el paciente reportado en este trabajo, la pérdida de *MIR17HG* podría asociarse con la clinodactilia del quinto dedo (Figura 19B), lo cual ha sido reportado en pacientes con MP y alteraciones del cromosoma 13 que involucran la pérdida de la región 13q31.3 (30).

3) En 13q32.1 se encuentra el gen *GPR180*, que codifica para una proteína G involucrada en la regulación del crecimiento de las células del músculo liso. Mutaciones y deleciones que involucran todo el gen o interrumpen el marco abierto de lectura, se asocian con el síndrome de microcoria congénita (MCOR) (OMIM#156600), caracterizado por la incapacidad del iris de dilatarse a causa de la ausencia o atrofia del músculo dilatador de la pupila (56). Faries-Taie et al., en 2015, analizaron mediante aCGH a seis familias originarias de Francia, Japón y México, en quienes se detectaron microdeleciones en 13q32.1 que provocaban la pérdida o interrupción del gen (56). La haploinsuficiencia podría relacionarse con el síndrome MCOR, por lo que esta hipótesis permite pensar que existe una relación entre haploinsuficiencia de *GPR180* y atrofia del iris, la cual se presenta en el paciente MP-46, sin embargo esto tendría que comprobarse mediante alguna técnica molecular que permitiera evaluar su integridad.

A nivel de pigmentación, la región delecionada en 13q, contiene 2 genes pigmentarios, *EDNRB* (13q22.3) y *DCT* (*TYPP2*) (13q32.1). En pacientes con deleciones en 13q y características del SWS no se observan alteraciones de pigmentación en la piel con patrón de LB (54,88), por lo que es poco probable que la haploinsuficiencia del gen *EDNRB* sea la causa del MP en el paciente (Figura 19 C y D). Para el gen *DCT*, no existe evidencia de haploinsuficiencia, por lo que también se considera poco probable que esté involucrado en esta entidad. Es importante considerar que el MP no representa un desorden cromosómico aislado, es una entidad en la que podrían estar involucradas diferentes tipos de anomalías genéticas (25). Happle en 2006 y Taibjee et al., en 2004, propusieron que esta entidad podría ser resultado de mutaciones puntuales en genes de pigmentación o por la presencia de mosaico epigenético (activación o silenciamiento de genes por transposones de tipo LINE1) (5,37). Existen más de 100 loci que contienen genes relacionados con la pigmentación que podrían ser blanco de las alteraciones genéticas asociadas al MP (91).

Los pacientes con deleción en 13q pueden presentar un fenotipo muy variado dependiendo de la región delecionada, todas estas características se asocian como síndrome de deleción 13q y pueden incluir retraso psicomotor, dismorfias faciales (presentes en MP-46), alteraciones músculo-esqueléticas y oftalmológicas, entre otras (73-77). A la fecha, existen solo 9 reportes de pacientes en los que las características del síndrome de deleción 13q coexisten con manifestaciones del SWS, como es el caso del paciente MP-46 (54).

Las deleciones proximales en 4p son un hallazgo poco común y constituyen un síndrome clínico que no se traslapa con las características clínicas del síndrome de Wolf-Hirschhorn (OMIM #194190). El síndrome de deleción proximal 4p se caracteriza por dismorfias faciales menores, niveles variables de retraso mental y en algunos casos se presentan crisis convulsivas y anomalías cerebrales (66,78).

En la paciente MP-53, la región delecionada en 4p contiene genes asociados a alteraciones de SNC.

1) En 4p16.1 se encuentra el gen *PPP2R2C*, el cual codifica para la subunidad reguladora β de la proteína fosfatasa A, la cual está implicada en la plasticidad sináptica y la diferenciación neuronal. Las interrupciones de este gen se han asociado con discapacidad intelectual y problemas de conducta (Tabla 7) (57). Backx et al., en 2010, reportaron una familia con una t(4;6)(p16.1;q22) con interrupción del gen *PPP2R2C*, asociada a discapacidad intelectual leve, epilepsia y problemas de conducta, por lo que sugieren que la haploinsuficiencia de este gen, podría ser la causa de la discapacidad intelectual (57). La delección en 4p16.1 en el paciente MP-53 puede estar asociado a la interrupción del gen y ser causa de la discapacidad intelectual, lo cual tendría que comprobarse mediante alguna técnica molecular que permitiera evaluar su integridad.

2) En 4p15.31 se encuentra el gen *SLIT2* relacionado con migración neuronal; en 4p15.3-p15.2 se encuentra el gen *KCNIP4* el cual codifica un canal de potasio que contribuye a propagar el potencial de acción en las neuronas y en 4p15.2 el gen *LGI2* relacionado con la comunicación de las neuronas con otras células nerviosas. Moller et al., en 2007, sugirieron que la haploinsuficiencia de estos 3 genes en pacientes con deleciones intersticiales en 4p es responsable de las alteraciones de SNC (retraso mental, crisis convulsivas, malformaciones cerebrales y discapacidad intelectual) (66). Asociado esto a la microcefalia presente en el paciente MP-53, se sabe que los huesos del cráneo crecen en relación al desarrollo del cerebro por lo que este síntoma podría ser secundario a alteraciones de SNC (92).

En los casos reportados en la literatura con deleciones intersticiales en 4p, no se describe la presencia de MP por lo que es probable que esta entidad sea causada por otro tipo de alteración genética (67-69,78).

Como se pudo observar en la tabla 8, los pacientes con trisomía 12 en mosaico (confinada además a un solo tejido), presentan alteraciones pigmentarias (AP), dismorfias faciales menores (DFM) y cardiopatía (CP). Esta alteración ha sido reportada en varios casos de diagnóstico prenatal (93) y a la fecha existen solo 6 casos en los que esta alteración se ha encontrado en nacidos vivos (58-61). En estos reportes, se observan diferencias en cuanto al tejido en el cual se encontró la alteración, la proporción de células anormales y a nivel clínico, la presencia o ausencia de características fenotípicas (Tabla 8). Se ha considerado que la presencia de células trisómicas en ciertos tejidos y en cierta proporción, puede provocar alteraciones fenotípicas muy severas y hasta comprometer la viabilidad, por lo que eventos de presión selectiva durante el desarrollo embrionario, podrían permitir que la línea celular trisómica quede confinada a secciones del feto que puedan soportarla (3,4,8,9,23).

En 4 de los 6 casos reportados y en la paciente MP-52, se presenta la línea celular trisómica confinada a piel y AP, lo cual puede explicarse de la siguiente manera:

- A nivel pigmentario, en el cromosoma 12 existen 6 genes relacionados a la biogénesis de los melanosomas, por lo que la sobreexpresión de alguno de estos genes debido a la ganancia en el número de copias, podría explicar el MP en estos pacientes (37).
- A diferencia de los pacientes con trisomía 12 confinada a SP que no presentan AP, es probable que el mecanismo que dio origen a la trisomía 12 haya ocurrido en etapas diferentes de la diferenciación

mesodérmica ya que, aunque ambas células (piel y SP), pertenezcan a esta capa germinal, los fibroblastos de piel surgen exclusivamente del mesodermo paraxial mientras que los linfocitos de SP surgen del mesodermo lateral (12,32).

Con respecto a la presencia de DFM y CP en los casos con trisomía 12, puede explicarse de la siguiente manera:

- En relación a la CP, en el cromosoma 12 se localizan aproximadamente 31 genes relacionados con alteraciones cardíacas (94). Tanto las DFM como la CP, se han asociado a la presencia de dosis extra de genes del cromosoma 12 en pacientes con el síndrome de Pallister-killian y síndrome de duplicación 12p, por lo que la trisomía 12 en mosaico podría relacionarse también con estas manifestaciones (95).
- Al igual que los fibroblastos de piel y los linfocitos de SP, las células del músculo cardíaco, músculo esquelético y tejido óseo son de origen mesodérmico, por lo que es probable que la trisomía 12 se presente en este tipo de células y sea la causa de las DMF y la CP (12,32).

Tanto la proporción de células trisómicas como su distribución en los diferentes tejidos, puede asociarse con el grado de severidad en el fenotipo (3,4).

Por último, al existir la posibilidad de un rescate trisómico como mecanismo de formación de la trisomía 12 en mosaico, es posible que existan células rescatadas con disomía uniparental (UPD) para el cromosoma 12 y esto ser la causa de ciertas características fenotípicas en estos pacientes. En nuestro paciente, hasta ahora no se ha realizado un estudio que permita descartar la presencia de UPD (59).

El hallazgo de la triple hilera de pestañas superiores bilateral es una característica que no se compartió con ninguno de los casos reportados (Figura 20 A-D). Esta característica, se ha asociado a enfermedades genéticas que no involucran al cromosoma 12, y también puede no ser de etología genética (96,97), lo que podría explicar el hecho de que no sea un rasgo característico de los pacientes con trisomía 12 en mosaico.

9. Conclusiones

- La estrategia de análisis citogenético utilizado en este trabajo ha probado ser de gran utilidad para la caracterización de pacientes con MP ya que permitió: 1) descartar la presencia de alteraciones cromosómicas; 2) conocer la diferente proporción de las líneas celulares existentes; 3) hacer evidente ya sea la alteración o la línea celular normal en uno de los tres tejidos analizados.
- El apoyo de las técnicas moleculares permitió: 1) caracterizar de manera precisa las alteraciones cromosómicas; 2) conocer los genes involucrados en la alteración; 3) detectar alteraciones que pasaron desapercibidas a nivel citogenético y 4) en los pacientes con fuerte sospecha clínica de cromosopatía, permitiría descartar la presencia de alteraciones.
- La caracterización precisa de las alteraciones encontradas en pacientes con MP, es una estrategia valiosa que permite al médico genetista llevar acabo un diagnóstico integral basado en una mejor correlación genotipo-fenotipo, al poder realizar una asociación entre los genes involucrados en las alteraciones y las características fenotípicas de los pacientes.
- Los resultados de este estudio permitieron describir alteraciones citogenéticas que no se han reportado previamente o que se han descrito en un número limitado de pacientes con MP, por lo que su hallazgo podría contribuir a describir un nuevo fenotipo de pigmentación anormal.
- Por último, el MP es una entidad en la que podrían estar involucrados diferentes tipos de anomalías genéticas, por lo que el estudio de alteraciones génicas y epigenéticas en genes de pigmentación, en combinación con la estrategia de análisis citogenético y molecular utilizada en este estudio, permitiría conocer con mayor precisión las causas de esta enfermedad.

10. Anexo 1

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

México, D.F. a ____ de _____ de 20____.

Por medio de la presente hacemos constar que nuestro hijo, el paciente: -----
con registro INP _____ y con diagnóstico clínico de mosaicismo pigmentario, participe en el proyecto
"CARACTERIZACIÓN DE ALTERACIONES CITOGENÉTICAS Y MOLECULARES EN PACIENTES CON
MOSAICISMO PIGMENTARIO", que se desarrolla en el Instituto Nacional de Pediatría. Se me ha explicado
que a mi hijo (a) se le tomará una muestra de 5 a 10ml de sangre periférica, así como biopsias de piel sana y
pigmentada, tomada por personal calificado y bajo todas las medidas de seguridad, como son el uso de
equipo estéril y desechable para la obtención de la muestra. Se nos ha informado que al tomar estas
muestras puede haber dolor leve o molestia en el sitio de la toma y complicaciones como: hematoma, dolor o
infección del sitio de la toma. De igual forma, nos han informado que el material genético obtenido, servirá
para realizar la determinación de alteraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica y fibroblastos
de piel, pudiéndose extender el análisis a otras técnicas moleculares como FISH y/o hibridación genómica
comparativa en microarreglos por medio de polimorfismos de nucleótido sencillo (SNP array) con la finalidad
de obtener un diagnóstico de certeza en nuestro hijo.

Se nos ha informado que dicho estudio se realizará sin costo alguno y seremos informados del resultado en
la consulta de Genética, asimismo que estos resultados serán confidenciales y que nuestra participación es
completamente voluntaria, por lo que si no deseamos participar, ello no repercutirá en la atención de mi hijo
(a). _____ estamos de acuerdo en su difusión en congresos y revistas médicas con finalidad
exclusivamente científica y con respeto a nuestra privacidad. _____ estamos de acuerdo en que se
almacenen las muestras sobrantes para nuevos estudios

Hemos tenido la oportunidad de hacer preguntas que fueron contestadas. La dirección y teléfono para
nuestra _____ localización _____ son:
Dirección _____ Teléfono _____

Referencias

1. Happle R, Boeckler P y Lipsker D (2006). Mosaicismo. EMC Dermatología 98:1-12.
2. Spinner NB y Conlin LK (2014). Mosaicism and Clinical Genetics. Am J Med Genet 4:1-7.
3. Youssoufian H y Pyeritz R (2013). Mechanisms and consequences of somatic mosaicism in humans. Nat Rev Genet 2: 748,749,754-758.
4. Biesecker LG y Spinner NB (2014) .A genomic view of mosaicism and human disease. Nat Rev Genet 14:307-317
5. Happle R. Mosaicism in Human Skin Understanding Nevi, Nevoid Skin Disorders and Cutaneous Neoplasia (2014), Primera Edición, Springer. Nueva York , pp. 5-27.
6. Freed D, Stevens E y Pevsner J (2008). Somatic Mosaicism in the Human Genome. Genes 5: 1064-1094
7. Taylor TH, Gitlin SA, Patrick JL, Crain JL, Wilson JM y Griffin DK (2014). The origin, mechanisms, incidence and clinical consequences of chromosomal mosaicism in humans. Hum Reprod Update 20:571-581
8. Campbell IM, Shaw CA, Stankiewicz P y Lupski JR (2015). Somatic mosaicism: implications for disease and transmission genetics. Trends Genet 7:1-3.
9. Gardner R y Sutherland G .Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling (2004). en: The origin and consequences of chromosome pathology, Tercera Edición, Oxford, Nueva York, pp. 42-49,112-15,183,184
10. William JL. Embriología Humana (2003), Tercera Edición. Elsevier. Madrid, pp. 18-22.
11. Carlson MB. Embriología Humana y Biología del Desarrollo (2009). Cuarta Edición, Elsevier. Barcelona, pp. 43-45.
12. Zerrucha T. The Human Body how it works: Human Development. (2009). Primera Edición, Chelsea House Books, E.U.A. pp. 44-51.
13. Bandera RI, Rodriguez FM, Vorlichka K y Laguna LR (2013). Lineas de Blaschko y otros mosaicismos cutáneos. PIEL (Barc) 624:1-4
14. Itin P y Burger B (2008). Mosaic manifestations of monogenic skin diseases. J Dtsch Dermatol Ges 9:744-745.
15. Castronovo P et al., (2010). Somatic mosaicism in Cornelia de Lange syndrome: a further contributor to the wide clinical expressivity? Clin Genet 78: 560 y 561.
16. Iourov YI, Vorsanova SG y Yurov YB (2008). Chromosomal mosaicism goes global. Mol Cytogenet 5:1-6
17. Alberts B. et al; Biología Molecular de la Célula (2008). Quinta Edición. Omega, Barcelona. pp 1054.
18. Holland A.J y Cleveland D.W (2014). Losing balance: the origin and impact of aneuploidy in cancer. EMBO Rep 13: 501-509
19. Machiela MJ et al. (2015). Characterization of large structural genetic mosaicism in human autosomes. Am J Hum Genet (3):487- 497.

20. Gersen L y Keagle B. The Principles of Clinical Cytogenetics (2013) en: Kathleen K y Kathleen W. Structural Chromosomes Rearrangements, Tercera Edición, Springer. Nueva York 10: pp 140,143,146,147,156 y 158.
21. Mantikou E, Wong KM, Repping S y Mastenbroek S (2012). Molecular origin of mitotic aneuploidies in preimplantation embryos. *Biochim Biophys Acta* 12:1921-1930
22. Van Echten J, Mastenbroek S, Sikkema B y Korevaar JC (2001). Chromosomal mosaicism in humans preimplantation embryos: a systematic review. *Hum Reprod Update* 5:620-627
23. Grati F (2014). Chromosomal mosaicism in Human Feto-Placental Development: Implications for Prenatal Diagnosis. *J Clin Med* 3: 809-837.
24. Ruggieri M, Castroviejo P y Di Rocco C. Neurocutaneous disorders Phakomatoses and Hamartoneoplastic Syndromes (2008). Primera Edición, Springer, Nueva York pp 365,372,378 y 379
25. Treat J (2010). Patterned Pigmentation in Children. *Pediatr Clin North Am.* 5: 1121-1128
26. Molho- Pessach V y Shaffer V.J (2011). Blaschko lines and other patterns of cutaneous mosaicism. *Clin dermatol* 29:205-223.
27. Taibjee S.M et al (2009). Keratinocyte cytogenetics in 10 patients with pigmentary mosaicism: identification of one case of trisomy 20 mosaicism confined to keratinocytes. *Clin Exp Dermatol* 7:823-829
28. Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Tyminińska A (2013). Skin melanocytes: biology and development. *Postepy Dermatol Alergol.* 2013 1:30-41
29. Silverberg NB, Mc Kinster CD y Yong-Kwang T. Pediatric Skin of Color (2015) en: Baselga E. Pigmentary Mosaicism, Primera Edición, Springer, Nueva York. pp 97-99.
30. Tragardth M, Rohr C, Thoringer R y Moller-Madsen B (2014). Hypomelanosis of Ito presenting with pediatric orthopedic issues: a case report. *J Med Case Rep* 8:1-8
31. Woods C et al (1994). Asymmetry and skin pigmentary anomalies in chromosome mosaicism. *J Med Genet* 31:694-701.
32. Wolf K et al. Dermatología en medicina general (2003) en: Chu HD. El desarrollo y la estructura de la piel. Séptima Edición, Editorial Medica Panamericana, Buenos Aires, Argentina. pp 57-59, 63,66-69.
33. García. A y Quero. J. Evaluación Neurológica del Recién Nacido (2012) en: García A. La Piel. Primera Edición, Ediciones Díaz de Santos S.A, Madrid, España. pp 98-100
34. Horn DT et al. Dermatology (2003) en: Moss C. Mosaicism and Linear Lesions. Primera Edición, Mosby, E.U.A, pp 62-65
35. Moss C, Larkins S, Stacey M, Bligh PA, Farndon VA y Davison V (1993). Epidermal mosaicism and Blaschko Lines. *J Med Genet* 30:752-755
36. Moss C (1999). Cytogenetic and Molecular Evidence for Cutaneous Mosaicism: The Ectodermal Origin of Blaschko Lines. *Am J Med Genet* 85:330-333.
37. Taibjee SM, Bennett DC y Moss C (2004). Abnormal pigmentation in hypomelanosis of Ito and pigmentary mosaicism: the role of pigmentary genes. *Br J Dermatol* 151: 269-282
38. Thomas IT, Frias JL, Cantu ES, Lafer CZ, Flannery DB y Graham JG (1989). Association of pigmentary anomalies with chromosomal and genetic mosaicism and chimerism. *Am J Hum Genet* 45:193-205.

39. Sybert VP, Pagon RA, Donlan M y Bradley CM (1990). Pigmentary abnormalities and mosaicism for chromosomal aberration: association with clinical features similar to hypomelanosis of Ito. *J Pediatr* 116:581-586

40. Küster W y König A (1999). Hypomelanosis of Ito: no entity, but a cutaneous sign of mosaicism. *Am J Med Genet* 6:346-50

41. Salas-Labadía C, Cervantes-Barragán DE, Cruz-Alcívar R, Daber RD, Conlin LK, Leonard LD, et al; (2014). Cytogenomic and phenotypic analysis in low- level monosomy 7 mosaicism with non-supernumerary ring chromosome 7. *Am J Med Genet A* 7:1765-9

42. Salas-Labadía C, Lieberman E, Cruz-Alcívar R, Navarrete-Meneses P, Gómez S, Cantú-Reyna C, et al; (2014). Partial and complete trisomy 14 mosaicism: clinical follow-up, cytogenetic and molecular analysis. *Mol Cytogenet* 1: 65

43. Hook EB (1997). Exclusion of Chromosomal Mosaicism: Tables of 90%, 95%, and 99% Confidence Limits and Comments on Use. *Am J Hum Genet* 29:94-97.

44. Martin CL y Warburton D (2015). Detection of Chromosomal Aberrations in Clinical Practice: From Karyotype to Genome Sequence. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 16:309-326

45. Salas C, Niembro A, Lozano V, Gallardo E, Molina B, Sánchez S, et al; (2012). Persistent genomic instability in peripheral blood lymphocytes from Hodgkin lymphoma survivors. *Environ Mol Mutagen* 53:271–280.

46. Shaffer L, Mc Gowan J y Schmid M. *ISCN (2013): An International System of Human Cytogenetic Nomenclature*. USA: Karger, Basel c 2013

47. Ginsburg S y Racowsky C. *In vitro Fertilization (2012) en: Brezina R, Rony T, Schattman G y Kearns W. Preimplantation Genetic Testing: Aviable and Emerging Technologies*. Primera Edición, Springer, E.U.A, pp.125-129

48. Lockwood WW, Chari R, Chi B y Lam WL(2006). Recent advances in array comparative genomic hybridization technologies and their applications in human genetics. *Eur J Hum genet*; 14:139-48.

49. Hui LR y Lee PA. *Integrated Biochips for DNA Analysis (2007)*. Primera Edición, Springer, Austin Texas, pp 22

50. Theisen A (2008). Microarray-based Comparative Genomic Hybridization (aCGH). *Nature Education*. 1:4-6

51. Lakshmiathy U, Chesnut D y Thyagarajan B. *Emerging Technology Plataforms for Stem Cells (2009)*. Primera Edición, Wiley, E.U.A, pp. 182-184

52. Speir ML et al. (2016). The UCSC Genome Browser database: 2016 update. *Nucleic Acids Res* D1:D717-25

53. Base de datos ClinVar: **RCV000135831** http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgc?hgsid=467989287_eRIHPF8YNxm7V6M8IPkXlhCD8HXf&c=chr8&o=18988334&t=19599269&g=clinvarCnv&i=8p22-21.3x3 Ultima Fecha de consulta: 07/01/2016 y **RCV000142194** http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgc?hgsid=470610123_TGJFMHjJT67djOBcifQhi2zGQCmE&c=chr8&o=18852450&t=19355561&g=clinvarCnv&i=8p22-21.3x3

54. Tüysüz B, Collin A, Arapoğlu M y Suyugül N (2009). Clinical variability of Waardenburg-Shah syndrome in patients with proximal 13q deletion syndrome including the endothelin-B receptor locus. *Am J Med Genet A* 10:2290-2295
55. Sharaidin HS, Knipe S, Bain N y Goel H (2013). Clinical features associated with a 15.41 Mb deletion of chromosome 13q encompassing the MIR17HG locus. *Clin Dysmorphol* 2:68-70
56. Fares-Taie et al. (2015). Submicroscopic deletions at 13q32.1 cause congenital microcoria. *Am J Hum Genet* 4:631-639
57. Backx L, Vermeesch J, Pijkels E, de Ravel T, Seuntjens E y Van Esch H (2010). PPP2R2C, a gene disrupted in autosomal dominant intellectual disability. *Eur J Med* 5:239-243
58. Al-Hertani W, Mc Gowan-J y Allanson JE (2012). Novel clinical findings in a case of postnatally diagnosed trisomy 12 mosaicism. *Am J Med Genet Part A* 158A:1452-1454
59. DeLozier-Blanchet CD, Roeder E, Denis-Arrue R, Blouin JL, Low J, Fisher J et al; (2000). Trisomy 12 mosaicism confirmed in multiple organs from a liveborn child. *Am J Med Genet* 5:444-449
60. English CJ, Goodship JA, Jackson A, Lowry M y Wolstenholme J (1994). Trisomy 12 mosaicism in a 7 year old girl with dysmorphic features and normal mental development. *J Med Genet* 3: 253-254
61. Patil SR, Bosch EP y Hanson JW (1983). First report of mosaic trisomy 12 in a liveborn individual. *Am J Med Genet* (3): 453-460
62. Oiso N et al. (2010). Phylloid hypermelanosis and melanocytic nevi with aggregated and disfigured melanosomes: causal relationship between phylloid pigment distribution and chromosome 13 abnormalities. *Dermatology* 2:169-172
63. Faletra F et al. (2012). Phylloid pattern of hypomelanosis closely related to chromosomal abnormalities in the 13q detected by SNP array analysis. *Dermatology* 4:294-297
64. Ribeiro Noce T, de Pina-Neto JM y Happle R (2001). Phylloid pattern of pigmentation disturbance in a case of complex mosaicism. *Am J Med Genet* 2:145-147
65. Golabi M, James AW, Good WV y Cotter PD. (2010). Tissue-limited mosaicism for monosomy 13. *Am J Med Genet Part A* 152A:2634-2639
66. Møller RS et al. (2007). Interstitial deletion of chromosome 4p associated with mild mental retardation, epilepsy and polymicrogyria of the left temporal lobe. *Clin Genet* 6: 593-598
67. Alesi V et al. (2011). A previously undescribed de novo 4p15 deletion in a patient with apparently isolated metopic craniosynostosis. *Am J Med Genet Part A* 155:2543-2551
68. Chen CP et al. (2013). Prenatal diagnosis and molecular cytogenetic characterization of a de novo proximal interstitial deletion of chromosome 4p (4p15.2p14). *Gene* 2:351-356
69. Su PH, Lee IC, Chen JY, Chen SJ, Yu JS y Tsao TF (2011). Interstitial deletions of the short arm of chromosome 4 in a patient with mental retardation and focal seizure. *Pediatr Neonatol* 3:165-168
70. Sigurdardottir S, Goodman BK, Rutberg J, Thomas GH, Jabs EW y Geraghty MT (1999). Clinical, cytogenetic, and fluorescence in situ hybridization findings in cases of "complete ring" syndrome. *Am J Med Genet* 5:384-390

71. Griffiths AF, Miller JH y Suzuki DT. An introduction to genetic analysis (2004).Sexta Edición. Palgrave Mcmillian, Nueva York.pp 213-219
72. Apples R, Morris R y Gill B. Chromosome Biology (2003).Tercera Edición. Springer,Nueva York.pp 105-108
73. Dunham A, Matthews LH, Burton J, Ashurst JL et al; (2004). The DNA sequence and analysis of human chromosome 13. Nature 6982:522-528.
74. Naidoo N, Pawitan Y, Soong R, Cooper DN y Ku CS (2011). Human genetics and genomics a decade after the release of the draft sequence of the human genome. Hum Genomics 6:577-622
75. Brown S, Russo J, Chitayat D y Warburton D (1995). The 13q- syndrome: the molecular definition of a critical deletion region in band 13q32. Am J Hum Genet 4:859-866.
76. Lance EI, DuPont BR y Holden KR (2007).Expansion of the deletion 13q syndrome phenotype: a case report. J Child Neurol 9:1124-1127.
77. Brown S, Gersen S, Anyane-Yeboah K y Warburton D (1993). Preliminary definition of a "critical region" of chromosome 13 in q32: report of 14 cases with 13q deletions and review of the literature. Am J Med Genet 1:52-59.
78. Tonk VS, Jalal SM, Gonzalez J, Kennedy A y Velagaleti GV (2003) .Familial interstitial deletion of chromosome 4 (p15.2p16.1). Ann Genet 4: 453-458
79. Mozdarani H, Ashtiani KA y Mohseni-Meybodi A (2011).Evaluation of concentration and storage effects of mitomycin C in the diagnosis of Fanconi anemia among idiopathic aplastic anemia patients. Indian J Hum Genet 3: 145-151
80. Weckselblatt B y Rudd MK (2015). Human Structural Variation: Mechanism of Chromosome Rearrangements. Trends Genet 10: 587-599.
81. Pfeiffer P,Goedecke W y Obe G (2000). Mechanism of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. Mutagenesis 4:289-302.
82. Venkitaraman AR (2001). Chromosome stability, DNA recombination and the BRCA2 tumor suppressor Curr Opin Cell Biol 3:338-343
83. Crotwell PL y Hoyme HE (2012). Advances in whole-genome genetic testing: from chromosomes to microarrays. Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care 3: 47-73.
84. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP et al; (2010). Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. Am J Hum Genet 5: 749-764
85. Jackson IJ (1997). Homologous pigmentation mutations in human, mouse and other model organisms. Hum Mol Genet. 10:1613-1624
86. Zaman A, Capper R y Baddoo W (2015). Waardenburg syndrome: more common than you think! Clin Otolaryngol. 1:44-48
87. Pingault V, Ente D, Dastot-Le Moal F, Goossens M, Marlin S, Bondurand N (2010). Review and update of mutations causing Waardenburg syndrome. Hum Mutat. 4: 391-406

88. Amiel J et al. (1996). Heterozygous endothelin receptor B (EDNRB) mutations in isolated Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet.* 3: 355-357
89. De Pontual L, Yao E, Callier P, Faivre L, Drouin V, Cariou S et al; (2011). Germline deletion of the miR-17~92 cluster causes skeletal and growth defects in humans. *Nat Genet* 10: 1026-1030
90. Hemmat M, Rumpel MJ, Mahon LW, Strom CM, Anguiano A, Talai M et al; (2014). Short stature, digit anomalies and dysmorphic facial features are associated with the duplication of miR-17 ~ 92 cluster. *Mol Cytogenet* 7:27
91. Lombillo VA y Sybert VP (2005). Mosaicism in cutaneous pigmentation. *Curr Opin Pediatr* 4:494-500
92. Moreno B y Tresguerres J. *Retrasos del Crecimiento* (1996). Segunda Edición. Editorial Diaz de Santos S.A, Madrid, España. pp 104.
93. Chen CP, Su YN, Su JW, Chern SR, Chen YT y Chen LF (2013). Mosaic trisomy 12 at amniocentesis: prenatal diagnosis and molecular genetic analysis. *Obstet Gynecol* (1): 97-105
94. Base de datos CADGene: <http://www.bioguo.org/CADgene/browseChromosome.php?id=12> Ultima Fecha de consulta: 06/04/16
95. Shackelford AL, Conlin LK, Hummel M, Spinner NB y Wenger SL (2013). Persistent mosaicism for 12 duplication/triplication chromosome structural abnormality in peripheral blood. *Case Rep Genet* :857926
96. Hampton R , Fraunfelder W y Fraunfelder T. *Roy a Fraunfelder's Current Ocular Therapy* (2008). Sexta Edición, Editorial Elsevier, Nueva York. pp 436
97. Epstein J, Erickson P y Wynshaw-Boris A. *Inborn Errors of Development the molecular basis of clinical disorders of morphogenesis* (2004). Primera Edición, Editorial Oxford University. Nueva York. pp 681