



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

ANÁLISIS CLÍNICO, CITOGENÉTICO Y MOLECULAR DE MARCADORES
DERIVATIVOS DEL CROMOSOMA 15, ANÁLISIS DE 2 CASOS.

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN:

GENÉTICA MÉDICA

P R E S E N T A

DRA. JÉSSICA CRISTINA ARMIJOS TORRES

DIRECTOR DE TESIS: DRA. VERÓNICA FABIOLA MORÁN
BARROSO

ASESORES DE TESIS:

DRA. CONSTANZA GARCÍA DELGADO
M. EN C. ALICIA BEATRIZ CERVANTES PEREDO



CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dra. Rebeca Gómez Chico Velasco
Directora de Enseñanza y Desarrollo Académico
Hospital Infantil de México Federico Gómez

Director de tesis:


Dra. Verónica Fabiola Morán Barroso

Jefe del Departamento de Genética Médica
Hospital Infantil de México Federico Gómez

Asesor de tesis:



Dra. Constanza García Delgado

Profesor adjunto de la Especialidad de Genética Médica
Hospital Infantil de México Federico Gómez


M. en C. Alicia Beatriz Cervantes Peredo

Servicio de Genética

Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga
Facultad de Medicina UNAM

Dedicatoria

A mi madre

Que ha sido un pilar fundamental en mi vida, por apoyarme en todo momento.

A mi familia

Por brindarme todo su apoyo en cada momento de este largo camino.

A SENESCYT

Por el apoyo económico brindado en este sueño.

A Dra. Verónica Morán y Dra. García

Por sus enseñanzas, su tiempo y dedicación en cada momento de mi formación académica.

A M. en C. Alicia Beatriz Cervantes Paredo.

Por compartir sus conocimientos y todo el apoyo brindado en la realización de esta tesis.

ÍNDICE

Resumen.....	5
1.1 Alteraciones Cromosómicas	7
1.1.1 Alteraciones cromosómicas numéricas	7
1.1.2 Alteraciones cromosómicas estructurales	8
1.2 Cromosomas marcadores	14
1.3 Técnicas de citogenética convencional.....	15
1.4 Técnicas de citogenética molecular.....	19
1.4.1 Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	19
1.4.2 Hibridación Genómica Comparativa. (CGH)	20
1.4.3 Amplificación de sondas dependiente de múltiples ligandos sensible a metilación (MS-MLPA)	21
1.5 Abordaje del paciente con probable cromosomopatía.....	24
1.5.1 Indicaciones para Cariotipo.....	24
1.6 Cromosoma 15.....	26
1.7 Impronta Genómica	27
1.7.1 Región 15q11-q13.....	28
1.7.2 Síndrome de Prader – Willi (MIM: 176270).....	30
1.7.3 Síndrome de Angelman (MIM#105830)	31
1.7.4 Síndrome de duplicación 15q11-q13 (dup15q)	32
1.7.5 Síndrome idic (15)	36
2. Planteamiento del problema.....	43
2.1 Pregunta de investigación:.....	43
4. Objetivos	44
4.1 Objetivo general.....	44
4.2 Objetivos específicos:	44
5. Material y métodos	45
5.1 Descripción de la Metodología.....	45
5.1.1 Diseño del estudio:	45
5.1.2 Universo de Estudio.....	45
6 Resultados y discusión de la Fase A.....	47
6.1 Análisis estadístico.....	47
6.2 Discusión de la Fase A	51
7. Fase B. Presentación de 2 casos clínicos con Síndrome invdup15q.....	54

7.1. Caso clínico 1	54
7.2 Caso clínico 2.....	62
7.3 Discusión de la Fase B	70
8. Conclusiones	80
9. Bibliografía	82
Anexos	88
Anexo I Carta de consentimiento informado para fotografías.....	88
Anexo II: Consentimiento informado para toma de muestra de sangre periférica para cariotipo y FISH.....	89
Anexo III: Consentimiento informado para toma de muestra de DNA.	90
Anexo IV: Técnica de cariotipo bandas GTG	91
Anexo IV: Técnica de FISH.....	94
Anexo V: Técnica de MS–MLPA.....	96

Resumen

Introducción. El cromosoma 15 está implicado con mayor frecuencia en la formación de los cromosomas marcadores. La región cromosómica 15q11-q13 es inestable debido a la presencia de elementos de DNA repetidos, por lo que pueden ocurrir diversos rearrreglos, entre ellos deleciones asociadas a los síndromes de Angelman y Prader-Willi, según sea el origen parental de la deleción, materna o paterna, respectivamente. Así mismo pueden formarse cromosomas marcadores debido a mecanismos del tipo duplicación-inversión cromosómica que producen un isodicéntrico (idic). La frecuencia del síndrome del isodicéntrico del cromosoma 15 es de 1:30 000 recién nacidos vivos. Esta alteración resulta en una tetrasomía de la región 15q11.2-q13 que se caracteriza por hipotonía central, retraso en el desarrollo psicomotor, déficit intelectual, epilepsia, y trastorno del espectro autista.

Planteamiento del problema. Entre las indicaciones para realizar un análisis citogenético se incluye a aquellos pacientes que presentan malformaciones congénitas y alteraciones del desarrollo con déficit intelectual. En particular la presencia de un cromosoma marcador supernumerario se presenta hasta en el 0.044% de los recién nacidos vivos y el 65% de ellos deriva del cromosoma 15, por lo que ante un paciente con un cromosoma marcador debe descartarse que se trate de un isodicéntrico del cromosoma 15 idic(15).

Pregunta de investigación: ¿Cuál es el tipo y la frecuencia de cromosomas marcadores supernumerarios en pacientes que acudieron al HIMFG en el periodo comprendido de enero de 2007 a diciembre de 2016 y cuáles son las características clínicas, citogenéticas y moleculares presentes en dos pacientes con un cromosoma marcador supernumerario derivado del cromosoma 15?

Justificación. El HIMFG es un centro de concentración y referencia de pacientes con malformaciones congénitas, discapacidad intelectual y/o alteraciones de conducta. Como parte de su abordaje multidisciplinario debe establecerse su etiología. Entre las causas posibles se debe determinar si son producto de una aberración cromosómica, entre las que se incluyen los cromosomas marcadores, en particular al isodicéntrico del cromosoma 15.

Objetivo general: Describir y analizar las características clínicas y las alteraciones citogenéticas moleculares asociadas a dos casos de pacientes con un cromosoma marcador supernumerario derivado del cromosoma 15.

Objetivos específicos: Determinar la frecuencia de cromosomas marcadores supernumerarios en los pacientes con reporte de cariotipo del Laboratorio de Citogenética del Departamento de Genética del HIMFG en un periodo de 10 años (2007-2016). Comparar la frecuencia de las alteraciones citogenéticas identificadas en este grupo de pacientes con lo descrito en la literatura. Comparar los datos clínicos y citogenéticos moleculares presentes en los dos pacientes con síndrome del idic(15) estudiados con lo descrito en la literatura. Establecer la relación entre las regiones cromosómicas implicadas y el fenotipo en los dos casos de pacientes con un marcador supernumerario del cromosoma 15.

Material y métodos. El estudio se dividió en dos fases: **A:** Se revisaron las libretas de resultados de estudio cromosómico del laboratorio de citogenética del HIMFG, se identificaron los casos con cromosomas marcadores y se realizó el análisis estadístico para calcular su frecuencia. **B:** En dos pacientes con cariotipo 47,XY,+mar se realizaron evaluación clínica, análisis de hibridación *in situ* Fluorescente (FISH) y amplificación de

sondas múltiples ligadas sensible a metilación (MS-MLPA). Con los datos obtenidos se buscó la correlación fenotipo-genotipo.

Resultados. Fase A: En el período de estudio, se obtuvieron 6 128 resultados de cariotipo; 1 593 (25.99%) de ellos tuvieron alguna alteración cromosómica numérica o estructural. Se reportaron 24 pacientes portadores de cromosomas marcadores supernumerarios, 9 en mosaico. En 15 casos (15/24; 62.5%) se realizó cariotipo a los padres, en tres de ellos la madre fue portadora de un rearrreglo estructural. En 10 casos (10/24; 41.6%) se identificó el origen del marcador, uno de ellos en mosaico. Cinco fueron derivados de cromosomas acrocéntricos de ellos dos casos correspondieron a *idic(15)*, dos pacientes presentaron un *der(22)* y otro un derivativo del cromosoma 15 producto de una translocación (9;15)(q34;q11). Entre los marcadores derivados de autosomas no acrocéntricos se identificó un *i(18p)* en tres pacientes, un isocromosoma 9p en otro y un caso fue producto de una translocación (9;3)(?;?). **Fase B:** En los 2 casos con cromosoma marcador supernumerario derivado del cromosoma 15 se determinó por FISH la invdup 15q. Se realizó análisis por MS-MLPA que demostró en ellos tetrasomía de la región 15q11.2-15q13.1 con ganancia de metilación en los genes *SNRPN* y *NDN*. Este resultado permitió determinar que el marcador fue de origen materno en ambos pacientes.

Discusión. Fase A: El número de cromosomas marcadores identificados en nuestro estudio correspondió al 0.39% del total de los estudios realizados, que es mayor al 0.044% reportado en la literatura. La incidencia observada en este trabajo refleja que nuestra Institución es un centro de referencia para pacientes con cromosopatías. De los 10 casos en los que fue posible identificar el origen del cromosoma marcador, el 50% fue derivado de acrocéntricos, esta frecuencia es menor al 86% reportado. En el 80% de los casos con análisis familiar el marcador se produjo de *novo*, porcentaje similar a lo reportado. **Fase B:** Se han descrito pocos síndromes clínicos asociados con marcadores cromosómicos supernumerarios. Los dos pacientes incluidos en este estudio presentan el síndrome de isodicéntrico 15q o tetrasomía 15q que en la mayoría de los casos con datos clínicos es de *novo* y de origen materno. Las manifestaciones clínicas en el 75% de los pacientes son retraso en el desarrollo psicomotor y en el crecimiento, hipotonía, trastorno del espectro autista y alteraciones en el EEG. El paciente 2 además presentó microtia derecha y pelvis renal bífida, hallazgos no reportados en esta entidad. El estudio por MS-MLPA demostró el origen materno del cromosoma marcador que incluye la región 15q11.2-15q13.1 con genes improntados entre ellos *UBE3A*, que se expresa exclusivamente en el cromosoma materno.

Conclusiones. La frecuencia identificada de marcadores supernumerarios en este trabajo es mayor a la previamente reportada. La mayor parte de los casos son de *novo*. En los dos casos analizados con *idic(15q)* las manifestaciones clínicas corresponden a las del síndrome de tetrasomía 15q, el cual fue confirmado por estudios citogenéticos y moleculares. Se considera la posibilidad de que los genes improntados en esta región *podrían* estar involucrados en las manifestaciones clínicas. La evaluación inicial de pacientes con dismorfias y discapacidad intelectual de origen desconocido constituye un reto diagnóstico y en su abordaje se deben descartar aberraciones cromosómicas de ser posible con estudios moleculares, lo que permitirá brindar un asesoramiento genético preciso.

1.- Marco Teórico

1.1 Alteraciones Cromosómicas

Las alteraciones cromosómicas se deben a un cambio en el número o en la estructura normal de los cromosomas (Venkatesan, Natarajanb, & Handea, 2015). Las anomalías cromosómicas ocasionan diferentes patologías entre ellas la pérdida reproductiva, infertilidad, mortinatos, anomalías congénitas, desarrollo sexual anómalo y discapacidad intelectual. (Lemke, Weier, Weier, & O'Brien, 2015). Están presentes el 50% de los abortos espontáneos, el 6% mortinatos, en 5% de las parejas con dos o más abortos espontáneos y aproximadamente en 0.5% de los recién nacidos vivos (RNV). En mujeres embarazadas de 35 años o más, las anomalías cromosómicas se han detectado en aproximadamente 2% de todos los fetos (Luthardt & Keitges, 2011).

1.1.1 Alteraciones cromosómicas numéricas

El complemento cromosómico normal del ser humano consiste en 46 cromosomas que es el doble del número cromosómico haploide ($2n$) (Gersen & Keagle, 2013). Las anomalías numéricas implican la pérdida y/o ganancia del número de cromosomas normal y se clasifican en aneuploidías y poliploidías. (Luthardt & Keitges, 2011). **Las aneuploidías** corresponden a la variación en el número de cromosomas que no es múltiplo del número haploide (Gardner, Sutherland, & Shaffer, 2011). Se originan por la no disyunción meiótica, por la falta de separación de los cromosomas bivalentes homólogos durante la anafase en meiosis I, o de las cromátidas hermanas durante la meiosis II o la mitosis. La no disyunción durante las primeras divisiones mitóticas del cigoto da origen a mosaicos celulares. La ausencia de recombinación entre cromosomas homólogos durante la meiosis I o la recombinación muy distal o muy cercana al centrómero predisponen a la no disyunción (Figura 1) (Loane, y otros, 2013).

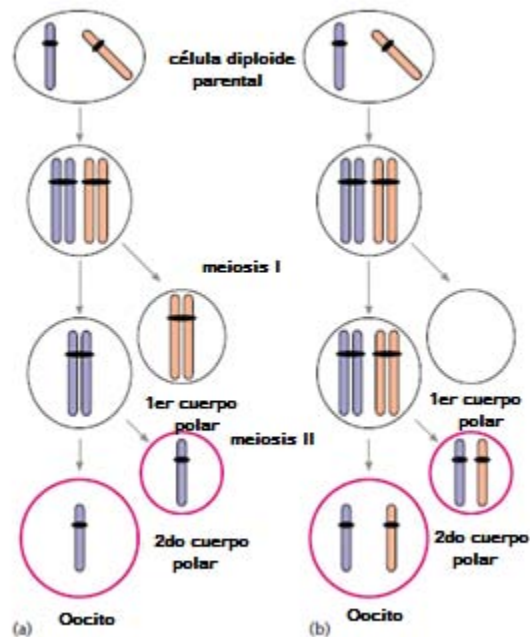


Figura 1. Esquema de la no disyunción meiótica. (a) Meiosis materna normal; (b) No disyunción en meiosis I materna. Imagen modificada de Robinson & McFadden, 2001.

Las poliploidías corresponden a la alteración con múltiplos del número haploide cromosómico por ejemplo triploidía (3n), tetraploidía (4n) y pentaploidía (5n). La triploidía es la poliploidía más frecuente, afecta hasta el 7.5% de todos los abortos espontáneos. Rara vez estos fetos llegan al tercer trimestre, y si lo hacen mueren en etapa neonatal. Los mecanismos citogenéticos que llevan a la triploidía son la diginia y la diandria. La primera sucede cuando un espermatozoide haploide fertiliza un óvulo con doble contribución genética debido a que no expulsa su segundo cuerpo polar. La diandria ocurre cuando un óvulo haploide es fecundado de forma simultánea por dos espermatozoides o por uno diploide (Taylor, et al., 2014) (Gersen & Keagle, 2013).

1.1.2 Alteraciones cromosómicas estructurales

La descripción de los diferentes tipos de anomalías estructurales tiene en cuenta el número de puntos de ruptura del cromosoma y el carácter balanceado (no hay pérdida de material cromosómico) o bien no balanceado (se pierde parte del material cromosómico) (Speicher M., 2006). Las alteraciones estructurales con repercusión en el fenotipo tienen una incidencia aproximada de 1 en 1 100 recién nacidos vivos (RNV). Estas alteraciones pueden ser eventos de *novo* o ser heredadas de padres portadores de un re-arreglo balanceado, lo que puede conducir al exceso (por ejemplo trisomía parcial) o a la carencia de material cromosómico (por ejemplo monosomía parcial) (Robinson & McFadden, 2001) (Moore & Best, 2001). Se clasifican también de acuerdo a su origen si son *de novo* o heredadas de padres portadores asintomáticos, según el

número de cromosomas involucrados pueden ser intra o intercromosómicas y de acuerdo al tipo de alteración estructural presente que se describen a continuación (Figura 2); (Gersen & Keagle, 2013) (Kang, et al, 2010).

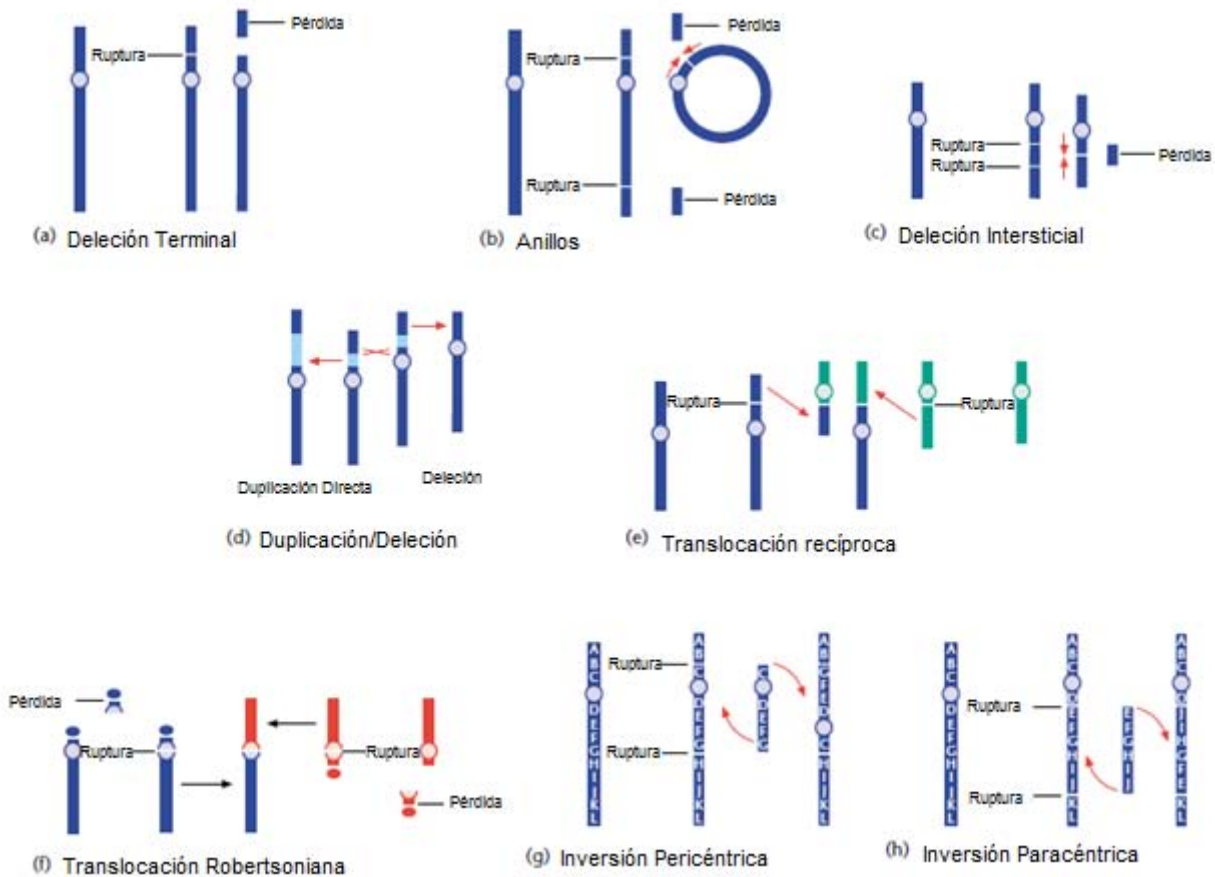


Figura 2. Formación de aberraciones cromosómicas estructurales. Imagen modificada Moore & Best, 2001.

1.1.2.1 Delección

Las deleciones consisten en la rotura y pérdida de un fragmento cromosómico. Cuando se trata de una rotura única en el extremo distal del cromosoma es terminal. (Figura 2a) Si se producen dos roturas y se pierde el material genético comprendido entre ambas es intersticial. (Figura 2c) La repercusión clínica dependerá de los genes perdidos en las regiones deletadas (Gersen & Keagle, 2013) (Moore & Best, 2001).

1.1.2.2 Anillos

Estos se forman por la ruptura de la región telomérica de los brazos cortos y largos de un cromosoma con la subsiguiente fusión de los extremos. Las consecuencias fenotípicas resultantes no se deben a la particular morfología de los cromosomas, sino a la delección previa que le ha permitido que adopte la morfología anular. (Figura 2b) (Rosenberg & Rosenberg , 2012).

1.1.2.3 Duplicación

Se refiere a la repetición de un fragmento cromosómico que puede estar uno inmediatamente después del otro, en tándem o en otra región dentro del mismo cromosoma. Puede estar en el sentido original o en sentido inverso. Las duplicaciones se originan por un entrecruzamiento desigual de cromátidas homologas, lo que genera un cromosoma con una duplicación y otro con una delección (Figura 2d) (Gardner, Sutherland, & Shaffer, 2012).

1.1.2.4 Inversión

Las inversiones son alteraciones estructurales que ocurren cuando el fragmento entre dos rupturas rota 180° sobre sí mismo y se une nuevamente quedando en una dirección invertida. Si no se modifica la posición del centrómero, se habla de inversión paracéntrica (las dos roturas se producen en el mismo brazo cromosómico) (Figura 2h), mientras que si se altera, se denomina inversión pericéntrica (cada rotura se produce en un brazo, corto o largo, del mismo cromosoma) (Figura 2g) (Rosenberg & Rosenberg , 2012). Las inversiones pueden causar alteraciones en el fenotipo si se rompe un gen o por efecto de posición que puede causar un cambio en la expresión de un gen.

En la formación de los gametos pueden tener repercusiones al momento del apareamiento y la recombinación entre los cromosomas homólogos. Las situaciones que pueden surgir son: 1) Los cromosomas en la zona invertida no se aparean, 2) se forma un bucle de inversión para que la zona invertida se pueda aparear. En la primera de las situaciones se generan gametos con la inversión y gametos normales. En la segunda se producen gametos con delecciones y duplicaciones (Russo, et al., 2015) (Moore & Best, 2001).

1.1.2.5 Isocromosoma

Los isocromosomas se generan por escisión transversal tanto durante la meiosis como en la mitosis. Se origina un isocromosoma con un reparto de material genético desigual y, por lo tanto, no equitativo, ya que el resultado es un cromosoma con dos copias de un brazo corto o largo y ninguna copia del otro (Speicher M. , 2006).

1.1.2.6 Cromosomas dicéntricos

Los cromosomas dicéntricos son cromosomas con dos centrómeros, y se producen por la fusión de dos fragmentos cromosómicos de diferentes cromosomas o porque las dos cromátidas se funden en una y los fragmentos acéntricos se pierden. Los cromosomas dicéntricos pueden ser estables si ambos centrómeros están muy próximos o uno de los centrómeros está inactivado produciendo un pseudodicéntrico (Moore & Best, 2001).

1.1.2.7 Translocaciones

Es un intercambio de material genético entre dos cromosomas que resulta de dos rupturas previas en cada cromosoma. También se produce una translocación cuando hay una recombinación accidental en la meiosis entre dos cromosomas que no son homólogos. Existen fundamentalmente dos tipos de translocaciones: recíprocas y robertsonianas (Luthardt & Keitges, 2011).

Las translocaciones recíprocas se producen por roturas en dos cromosomas diferentes y el material se intercambia entre ellos (Figura 2e). Los cromosomas resultantes se denominan cromosomas derivados. El portador de una translocación recíproca suele ser normal, sin anomalías fenotípicas, ya que se trata de un intercambio equilibrado sin pérdida ni ganancia de material genético. Sólo en los casos en los que la rotura produzca interrupciones de genes, esto se traduce en alteraciones fenotípicas (Figura 3) (Speicher M. , 2006).

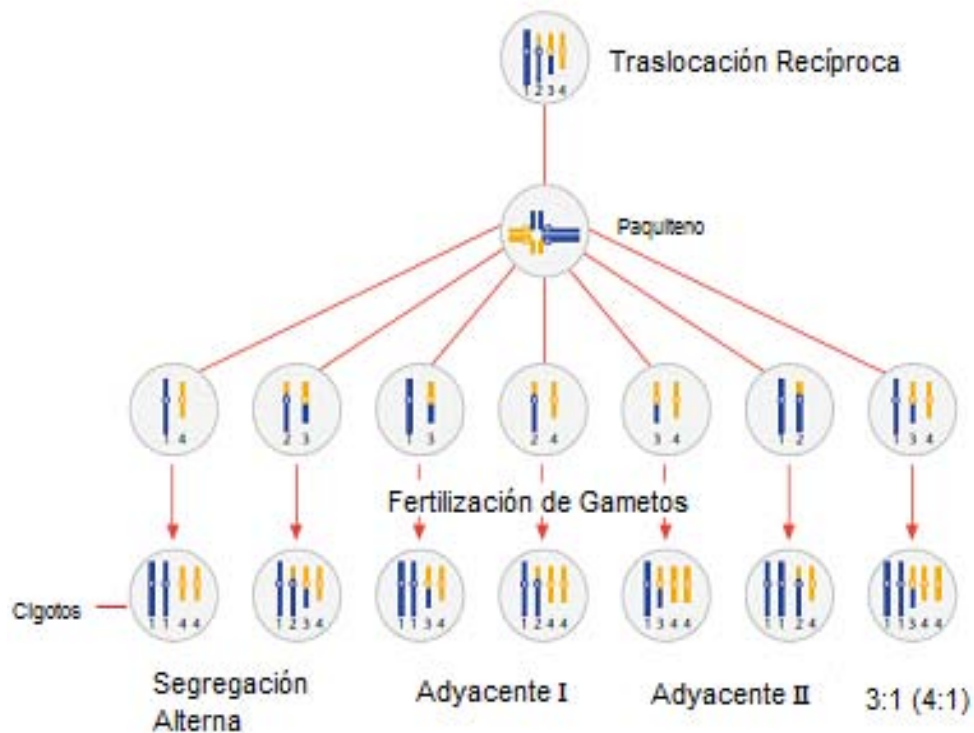


Figura 3. Patrón de segregación para translocaciones recíprocas. Se muestra un cuadrivalente de paquiteno con los resultados de segregación alterna, adyacente I, Adyacente II. Adaptado de Moore & Best, 2001.

Las translocaciones robertsonianas están implicados cromosomas acrocéntricos no homólogos, que pierden sus brazos cortos; en cuanto a sus brazos largos, se funden en el centrómero, dando lugar a un único cromosoma. Este tipo de translocaciones se limita a los cromosomas del grupo D (13, 14, 15) y G (21, 22). Los portadores de translocaciones robertsonianas no pierden material genético esencial, por lo que no presentan alteraciones fenotípicas y su cariotipo está constituido por 45 cromosomas (Figura 2f) (Gersen & Keagle, 2013).

La segregación de los cromosomas dentro de un cuadrivalente puede ocurrir en múltiples formas, la mayor parte resultará en gametos cromosómicamente desequilibrados. Puede haber segregación 2:2, 3:1 y 4:0 (Moore & Best, 2001)

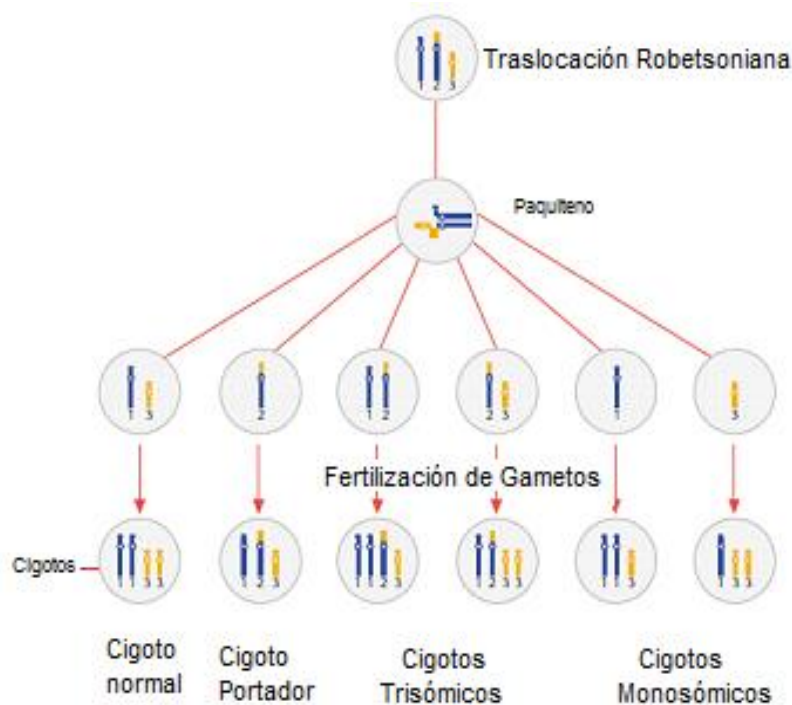


Figura 4. Patrón de segregación 2:1 para translocaciones robertsonianas. Un trivalente de paquíteno es mostrado con los resultados de los patrones de segregación posibles y su fertilización por un gameto normal. Adaptado de Moore & Best, 2001.

En la primera se distribuyen dos cromosomas a cada célula hija. En la 3:1, tres a una célula y uno a la otra y en la 4:0, cuatro a una célula y ninguno a la otra. En la segregación 2:2 se pueden presentar tres situaciones, una es una segregación denominada alterna, donde una célula quedará con los cromosomas normales y otra con los derivados (Moore & Best, 2001).

Otros tipos de segregación 2:2 son la adyacente 1 y 2. Encada célula queda con dos cromosomas no homólogos, en la adyacente 2 cada célula queda con cromosomas homólogos. En la segregación alterna uno de los productos es normal y otro tiene los cromosomas translocados pero es balanceado. En la adyacente 1 y 2 sólo se obtienen productos desbalanceados con trisomías y monosomías parciales como está en la (Figura 2) (Rosenberg & Rosenberg , 2012).

Las cromosomopatías son mucho más extensas que las producidas en los trastornos monogénicos y poligénicos, y se caracterizan por grandes cambios en el número de nucleótidos, en la estructura de los cromosomas o en la reubicación de genes por inserción o delección, duplicación, translocación, inversión, etc.

Pueden afectar tanto a los autosomas como a los cromosomas sexuales; en ambos casos, pueden ser constitutivas o adquiridas. Son cromosomopatías constitutivas las que afectan a todas las células del organismo, por aparecer durante la división meiótica de las células germinales o bien durante la primera división mitótica del cigoto. Como consecuencia, son las de mayor gravedad. Las cromosomopatías adquiridas o somáticas sólo ocurren durante las mitosis poscigóticas. Se producen, por tanto, en células somáticas, sin afectar a todas las células del organismo; de ahí la menor gravedad de sus consecuencias (Speicher M. , 2006).

En la descripción de las anomalías cromosómicas, la nomenclatura utilizada se basa en la de la dotación cromosómica normal, que se expresa como 46,XY en células diploides del varón y 46,XX en la mujer. Se añaden abreviaturas para expresar aspectos relativos a la morfología del cromosoma o para indicar las causas de la anomalía. La nomenclatura actual se basa en el ISCN 2016.

1.2 Cromosomas marcadores

Un cromosoma marcador, abreviado como **mar** por ISCN 2016, es un cromosoma estructuralmente anormal, los cuales se detectan principalmente por citogenética de bandas convencionales, se consideran como un cromosoma extra o una sSMC (cromosoma marcador supranumerario), y por lo general de igual o menor en tamaño que un cromosoma 20 de la misma metafase, y va a depender del origen cromosómico para interferir en el fenotipo clínico (Liehr, et al., 2013).

El origen de un sSMC sólo puede ser diagnosticado por métodos citogenéticos moleculares tales como la técnica Hibridación *in situ* Fluorescente (FISH). El primer sSMC se observó en 1961 por Ilberry et al., el paciente presentó un cariotipo en mosaico 47,XY, + mar / 46, XY y el origen de la sSMC nunca fue determinado (Jafari Ghahfarokhi, et al, 2015).

La frecuencia sSMC en recién nacidos es 0,044%. En prenatales 0,075% y el 0,204% en los casos prenatales con anomalías por ultrasonido. En casos de déficit intelectual representan el 0,288%. Y en casos subfértiles 0,125% (Malvestiti, et al, 2014) (Jang, et al., 2016).

El tipo más común de sSMC se origina de los cromosomas acrocéntricos alrededor del 86%, la mayoría (65%) se originan del cromosoma 15, mientras que las sSMC derivadas de los cromosomas 13, 14, 21 y 22 constituyen sólo el 7% (Jafari Ghahfarokhi, et al, 2015). Alrededor del 70% de los casos son nuevas mutaciones (de novo), y solo el 30% segrega dentro de una familia. En general, tienen poco o ningún efecto sobre el fenotipo (Liehr, et al., 2013) (Malvestiti, et al, 2014).

Es estimado que hay 3 millones de portadores sSMC en una población. Sólo en 1/3 de los casos la sSMC se asocia con anomalías clínicas. Además de algunos síndromes específicos, es decir, Pallister-Killian (i12p, MIM # 601803), isocromosoma 18p (i18p, MIM # 614290), Cat Eye (i22pq, MIM # 115470), idic (15) y síndrome de Emanuel o el cromosoma derivado 22 (der(22)t(11;22), MIM # 609029), para el resto de casos con sSMC puede presentar con diferentes formas (anillo, céntrico Invertida y duplicada), y consisten en la mayoría de los casos de material cromosómico pericéntrico (Liehr, et al, 2013).

Además los sSMC se pueden derivar de cualquier segmento de los cromosomas humanos. Si se derivan de los extremos cromosómicos, en la mayoría se producen tetrasomías parciales con uno de los subgrupos más pequeños de los sSMC, que están constituidos por los llamados cromosomas marcador complejos (Malvestiti, et al., 2014), consisten en material cromosómico derivado de más de un cromosoma. Así, además el mencionado grupo grande de síndrome de Emanuel (ES) o derivado del cromosoma 22, der(22) t(11; 22), MIM # 609029, se identificó un segundo sSMC en 2010, designado como supernumerario der (22) † (8; 22) (Liehr, et al, 2013).

La mayoría de los pacientes con anomalías cromosómicas desbalanceadas de autosomas presentan al nacimiento múltiples dismorfias y malformaciones. De éstas, algunas son más características o sugerentes de una anomalía determinada. Sin embargo, la variabilidad del fenotipo y la severidad de sus manifestaciones son tan amplias como las posibilidades de reordenamientos y alteraciones cromosómicas. Es el conjunto de dismorfias y malformaciones lo que hace sospechar el diagnóstico. Además, la gravedad de estas alteraciones tiene gran variabilidad, según el cromosoma afectado, la pérdida o ganancia de material genético y el contexto del resto del material hereditario en que se manifieste (Gersen & Keagle, 2013).

1.3 Técnicas de citogenética convencional.

La citogenética humana tiene como objetivo el análisis de las características de los cromosomas por medio del microscopio de luz. Las técnicas tradicionales de bandeo permiten el estudio global de la estructura cromosómica y tienen diversas aplicaciones en el diagnóstico clínico e investigación. En la clínica las técnicas citogenéticas por ejemplo se usan para la detección de diversas cromosomopatías, para el diagnóstico prenatal y preimplantación y en el área oncológica para diagnóstico y pronóstico (Lisker, Zentella, & Grether, 2013). En cuanto a la investigación se utilizan para la localización de genes, detección de material genético en células somáticas híbridas, análisis de la estructura cromosómica, estudio del movimiento de los cromosomas en el núcleo y en la detección de deleciones de material genético (Jacobs, 2014). En las últimas dos décadas las técnicas citogenéticas han ganado poder y utilidad con el desarrollo de nuevos métodos de detección con tecnología computacional y herramientas

moleculares. Éstas últimas han aumentado la resolución y la capacidad del análisis citogenético (Hsieh, 2011).

El cariotipo es la disposición ordenada de todos los cromosomas de una célula, clasificados según su tamaño, la posición de sus centrómero y técnicas de bandeo. El desarrollo de las técnicas de bandeo cromosómico ha permitido el reconocimiento individual de cada cromosoma y el estudio detallado de su estructura. En la especie humana, el cariotipo normal consta de 46 cromosomas, distribuidos en 22 pares de autosomas (1 a 22) y un par de cromosomas sexuales (XX en la mujer y XY en el varón). En un principio, los 46 cromosomas se ordenaron en 7 grupos (A a G), dado que los cromosomas de tamaño y forma similar no se podían distinguir entre sí (Figura 5) (Gersen & Keagle, 2013).

El análisis detallado de los cromosomas tuvo que esperar el desarrollo del bandeo cromosómico a finales de 1960. El uso de fluorocromos que se acoplaron a un agente de alquilación (tales como la mostaza de quinacrina), se pudo obtener un patrón de fluorescencia muy característico para cada cromosoma y un cariotipo humano completo identificado. En la década de 1970, las bandas con Giemsa desplazados rápidamente bandas quinacrina. Las principales técnicas se presentan a continuación (Speicher & Carter, 2005).

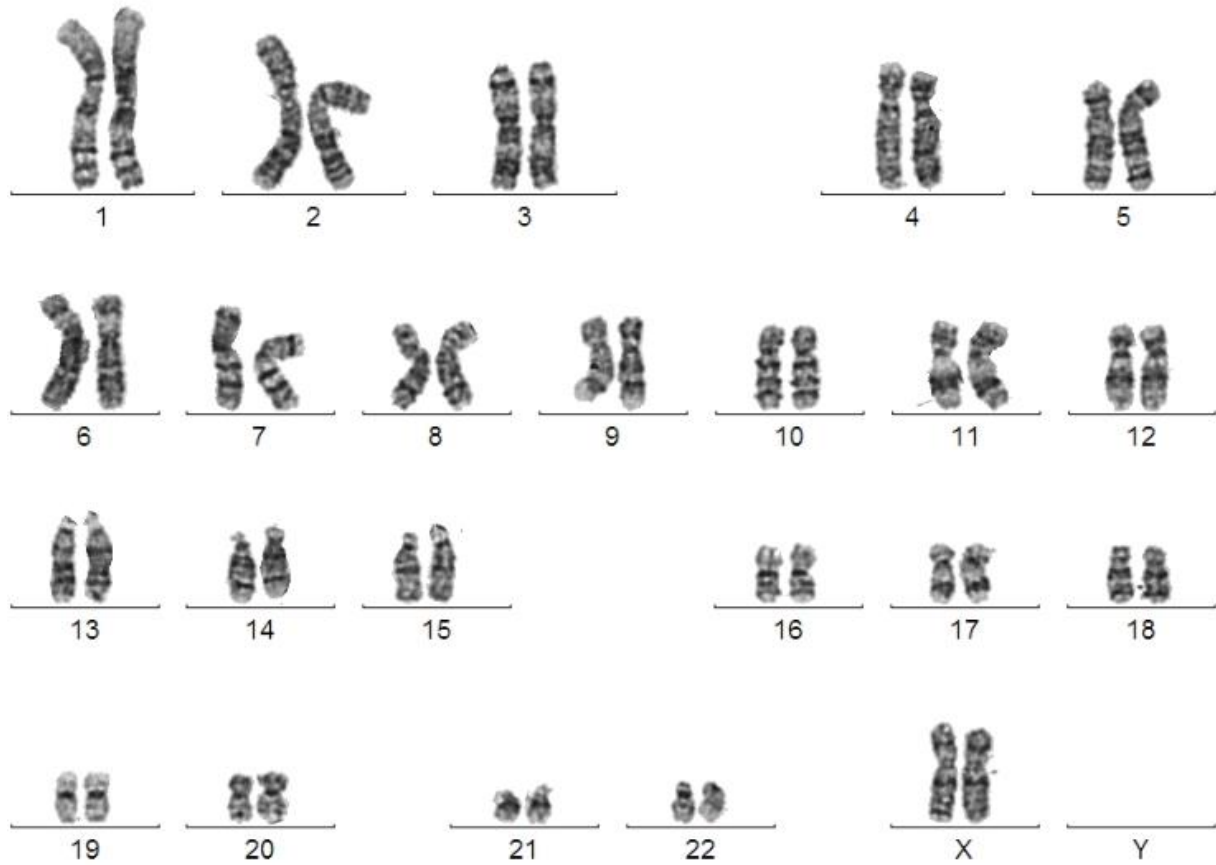


Figura 5. Cariograma normal de un individuo femenino con tinción de bandas GTG (Biol. Ariadna Berenice Morales Jiménez, Lab. de Citogenética, Depto. de Genética, HIMFG).

1.3.1 Bandas GTG

El bandeo G se logra con un tratamiento controlado con tripsina antes de la coloración con Giemsa y produce bandas claras y oscuras en los cromosomas. Las bandas oscuras contienen DNA rico en bases A-T que replica tardíamente y son pobres en genes constitutivos y las bandas claras contienen DNA rico en G-C que replica tempranamente y tienen muchos genes constitutivos (Speicher M. , 2006) (Shaffer, 2005).

1.3.2 Bandas QFQ

Los cromosomas se tiñen con un compuesto fluorescente, como mostaza de quinacrina (hidrocloruro de quinacrina), 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) o Hoechst 33258, que se intercalan en el DNA bicatenario. La laminilla se analiza mediante microscopia de fluorescencia. Aparece un patrón específico de bandas brillantes (bandas Q o Q-positivas), que se corresponden casi exactamente con las bandas G (G-positivas, G-oscuras) (Speicher M. , 2006) (Hsieh, 2011).

1.3.3 Bandas NOR

Es la técnica que identifica los organizadores nucleolares (NOR) localizadas en los tallos o constricciones secundarias de los cromosomas acrocéntricos (13, 14, 15, 21 y 22) (Gersen & Keagle, 2013).

1.3.4 Bandas RHG

Las bandas RHG se producen mediante desnaturalización térmica utilizando Giemsa. También hay bandas R por fluorescencia usando naranja de acridina (bandas RFA). Llamadas así porque con ellas se obtiene un patrón inverso al de las bandas G; son ricas en GC, en genes, en secuencias Alu, pobres en secuencias LINE, son zonas de replicación temprana (Hsieh, 2011) (Gersen & Keagle, 2013).

1.3.5 Bandas THG

Es la tinción diferencial de la porción distal de los cromosomas, es una variante de las bandas R ya que las preparaciones son incubadas en el mismo amortiguador, pero por periodos de tiempo más largos y a mayor temperatura (Gersen & Keagle, 2013).

1.3.6 Bandas CBG

Esta técnica tiñe la heterocromatina constitutiva, principalmente la heterocromatina centromérica, algunas regiones de los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos, y la parte distal del brazo largo del cromosoma Y. Utiliza hidróxido de bario y se incuba en una solución salina para hacer la tinción posterior con Giemsa (Gersen & Keagle, 2013).

1.4 Técnicas de citogenética molecular

1.4.1 Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

La hibridación *in situ* fluorescente o FISH (por sus siglas en inglés de *Fluorescence In Situ Hybridization*), es una técnica de citogenética molecular se basa en el marcaje en colores de segmentos de DNA de 100-300 pb, conocidos como sondas, ya sea de forma directa con nucleótidos unidos a fluorocromos o de forma indirecta por incorporación de nucleótidos unidos a grupos como biotina o digoxigenina, los cuales se detectan mediante anticuerpos acoplados a un fluorocromo que emite un color específico por lo que requiere de microscopía con filtros especiales (Figura 6) (Riegel, 2014) (Speicher M. , 2006).

Principios de la hibridación *in situ* fluorescente. a) Los elementos básicos de hibridación *in situ* fluorescente son una sonda de DNA y una secuencia diana. b) Antes de la hibridación, la sonda de DNA está marcada. c) La sonda marcada y el DNA diana se desnaturalizan. d) Ellos se combinan entonces, lo que permite la hibridación de secuencias de DNA complementarias. e) Si la sonda se ha marcado indirectamente, se requiere un paso adicional para la visualización del hapteno no fluorescente que utiliza un sistema de detección enzimática o inmunológica. Considerando que el FISH es más rápido con sondas marcadas directamente, marcaje indirecto ofrece la ventaja de amplificación de la señal mediante el uso de varias capas de anticuerpos, y por lo tanto podría producir una señal que es más brillante en comparación con los niveles de fondo. Finalmente, las señales se evalúan mediante microscopía de fluorescencia (Liehr T. , 2009). Los tipos de sondas más utilizadas incluyen: a) centroméricas, pancentroméricas, específica de locus, telomérica, subteloméricas y de pintado cromosómico (Gersen & Keagle, 2013).

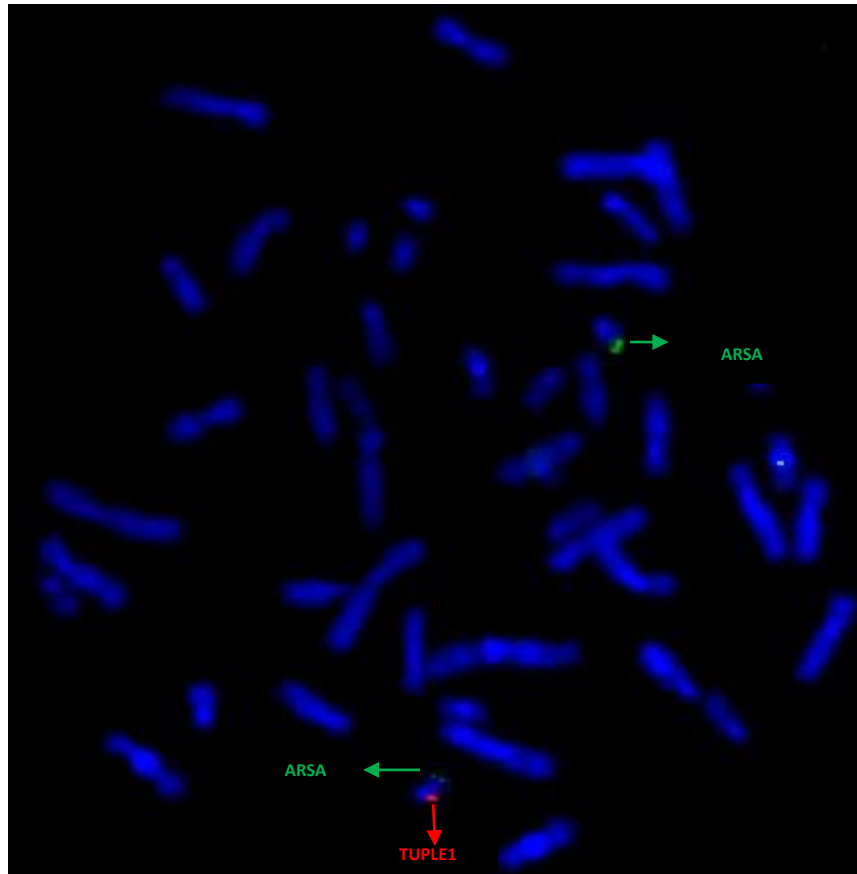


Figura 6. Ejemplo de imagen de análisis de FISH: positivo para delección 22q11.2. Se observa sonda TUPLE1 en color rojo y sonda ARSA en color verde (Vysis®). (Biol. Ariadna Berenice Morales Jiménez, Lab. de Citogenética, Depto. de Genética, HIMFG).

Las sondas para secuencia única se utilizan principalmente para detectar secuencias específicas de DNA en el genoma y son especialmente útiles para detectar microdelecciones o microduplicaciones que son muy pequeñas para ser detectadas por estudios de citogenética convencional (menores a 3 Mb) (Speicher & Carter, 2005). Además con éstas técnicas se pueden identificar alteraciones cromosómicas crípticas como translocaciones, cromosomas marcadores, cromosomas derivados, aneuploidías en el diagnóstico prenatal, rearrreglos génicos y amplificaciones en tumores (Gersen & Keagle, 2013).

1.4.2 Hibridación Genómica Comparativa. (CGH)

La Técnica de CGH permite detectar cambios en el número de copias del DNA sin previo conocimiento de la región a analizar y utilizando el DNA genómico a investigar como sonda, éste detecta ganancias y/o pérdidas de segmentos cromosómicos de 10 a 20 Mb, aunque no detecta alteraciones balanceadas, la resolución se aumenta con el análisis con microarreglos o aCG que detecta menos de 1Mb. Hay diversos tipos de microarreglos, en la práctica clínica los de más relevancia son la hibridación genómica

comparativa basada en microarreglos (α -CGH por sus siglas en inglés *comparative genomic hybridization*), los microarreglos de polimorfismo de nucleótido único (SNP del inglés *single nucleotide polymorphisms*) y microarreglos de CNV (variantes en el número de copias) (Riegel, 2014).

Los α -CGH son un estudio de todo el genoma con alto grado de resolución que no requiere cultivo celular. El objetivo es determinar si existe ganancia o pérdida de material cromosómico. Tiene una resolución de 1 a 60 KB. En este se utiliza una laminilla sobre la que se fijan de miles a millones de fragmentos de DNA correspondientes a determinados locus, en esta se co-hibrida una muestra problema con una control, cada una marcada con un color fluorescente distinto. Posterior a la hibridación las señales generadas en cada fragmento de DNA son digitalizadas por un escáner y se calcula un cociente de intensidad y se genera una representación gráfica de los resultados.

Si la intensidad de las señales de los fluorocromos son iguales en una región determinada se considera que tienen la misma cantidad de DNA en la muestra del paciente y del control, si la señal del paciente no tiene la misma intensidad que la del control se considera una delección y si es más intensa una duplicación. Las limitaciones de los microarreglos son: No detecta alteraciones balanceadas, como translocaciones recíprocas u otros reordenamientos balanceados ni poliploidías (Mori et al., 2012) (Romana, 2015).

Los microarreglos de SNP contienen sondas de oligonucleótidos correspondientes a variantes alélicas de SNP seleccionados, por lo tanto detectará variaciones de una sola base. Permite obtener el número de copias, el genotipo, disomía uniparental, pérdida de heterocigosidad. En este no se requieren muestras controles y si se ocupan se hibridará de forma independiente (Mori et al., 2012) (Romana, 2015) (Gersen & Keagle, 2013).

1.4.3 Amplificación de sondas dependiente de múltiples ligandos sensible a metilación (MS-MLPA)

Es un método semi-cuantitativo para el perfil de metilación, es una variante de la técnica MLPA en la que la detección del número de copias se combina con el uso de una enzima de restricción sensible a la metilación. MS-MLPA es ahora ampliamente utilizado para la detección de alteraciones epigenéticas. Una de sus principales aplicaciones es la detección de metilación en las enfermedades de impronta como Prader Willi / Angelman y el síndrome de Beckwith Wiedemann / Síndrome de Silver Rusell (Nygren et al., 2005) (Henkhaus et al., 2012).

El protocolo MS-MLPA es muy similar al método MLPA estándar, excepto que cada reacción MS-MLPA genera dos muestras: una muestra no digerida para la detección del número de copias y una muestra digerida para la detección de metilación (MS-MLPA protocolo version MSP-v006., 2016) (Nygren et al., 2005).

El procedimiento MS-MLPA se puede dividir en cinco etapas (Figura 7):

1. Desnaturalización de DNA e hibridación de sondas MLPA.
2. Ligadura y digestión.
3. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
4. Separación de productos de la amplificación por electroforesis capilar
5. Análisis de datos.

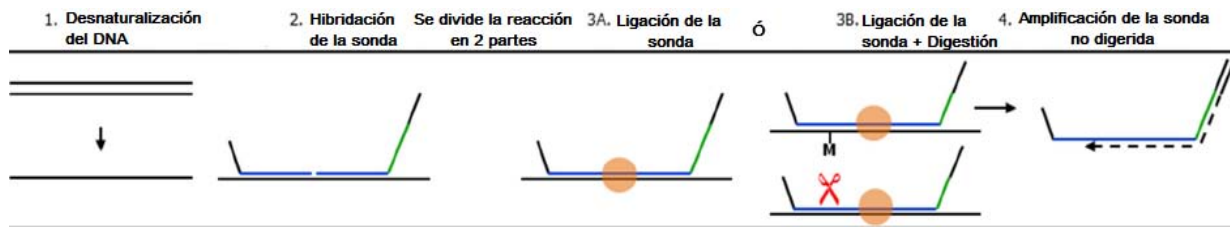


Figura 7. Reacción de MLPA. Imagen modificada protocolo MS-MLPA version MSP-v006., 2016.

Las sondas MS-MLPA para la detección de metilación se asemejan a otras sondas MLPA, excepto que su secuencia diana contiene el sitio de restricción de la endonucleasa *HhaI* sensible a la metilación. Después de la hibridación, la reacción se divide en dos tubos: se procesa un tubo como una reacción estándar de MLPA, proporcionando información sobre los cambios de número de copias. El otro se incubó con la endonucleasa *HhaI* mientras que las sondas hibridadas se ligan. Los híbridos de sondas y el DNA no metilado son digeridos por la enzima *HhaI*. Las sondas digeridas no pueden amplificarse exponencialmente durante la PCR y por lo tanto no producirán una señal durante la electroforesis capilar. Por el contrario, si el DNA de la muestra estaba metilado, los híbridos con la sonda de DNA estarán protegidos contra la digestión con *HhaI* y las sondas ligadas generarán un pico (Tabla 1) (Nygren, et al., 2005).

Tabla 1. Sondas utilizadas para el patrón de dosis génica y estado de metilación en la región 15q11-q13 en MS-MLPA.

Sondas Metilación		Sondas Control	Patrón Normal	
Tamaño (nuclétido)	Posición	Marcador	% Dosis	% Metilación
142	Isla CpG (PWS-SRO)	<i>SNRPN</i>	100	50
178	Isla CpG (PWS-SRO)	<i>SNRPN</i>	100	50
184	Exón 1	<i>UBE3A</i>	100	0
190	Isla CpG (PWS-SRO)	<i>SNRPN</i>	100	50
250	Isla CpG (PWS-SRO)	<i>SNRPN</i>	100	50
328	SNORD116 snoRNA	<i>SNRPN</i>	100	85-100
346	15q26	Control de digestión	100	0
419	15q11.2	<i>NDN</i>	100	30-50
463	3p22	Control de digestión	100	0

1.5 Abordaje del paciente con probable cromosomopatía.

El abordaje de las alteraciones cromosómicas va a depender de la historia clínica, el examen físico completo, las evaluaciones interdisciplinarias, los estudios de gabinete y laboratorio apoyados por los estudios de citogenética clásica y molecular, iniciando con el cariotipo con bandas GTG y complementados por estudio de hibridación fluorescente in situ o FISH, aCGH o SNP_a (Shaffer, 2005).

Las alteraciones o aberraciones cromosómicas pueden estar asociadas a fenotipos que incluyen discapacidad intelectual, retraso en el desarrollo psicomotor y/o del lenguaje, así como diversos defectos congénitos. El material genético implicado en las cromosomopatías puede variar de un caso a otro y suponer tanto pérdidas como ganancias de parte, de uno o varios cromosomas, por consiguiente involucrar tanto autosomas como gonosomas y determinar espectro clínico variable que debe corroborarse con estudios citogenéticos clásicos y moleculares a fin de hacer una correlación genotipo-fenotipo específica y considerar si es pertinente estudio de los progenitores (Centeno et al., 2011).

1.5.1 Indicaciones para Cariotipo

El cariotipo se realiza para el diagnóstico y para el asesoramiento genético. Se realiza a pacientes con alguna de las siguientes indicaciones.

1. Período prenatal:

- Edad mayor de 35 años
- Ansiedad materna
- Triple screening alterado
- Oligohidramnios polihidramnios
- Retraso de crecimiento intrauterino (CIR)
- Arteria umbilical única
- Sospecha ecográfica de cromosomopatía
- Antecedentes de cromosomopatía balanceada en un progenitor

2. Período neonatal:

- Malformaciones mayores aisladas
- Presencia de 3 o más defectos congénitos menores
- Recién nacido con rasgos dismórficos
- Recién nacido con genitales ambiguos
- Parto con producto muerto de causa inexplicable
- Muerte neonatal de causa inexplicada

3. Período de lactancia:

- Niños con dificultades para el aprendizaje
- Niños con rasgos dismórficos
- Niños con retraso psicomotor

4. Períodos preescolar-escolar:

- Trastornos del crecimiento
- Retraso psicomotor
- Rasgos dismórficos

5. Período de adolescencia:

- Ginecomastia
- Falta de desarrollo puberal
- Amenorrea primaria o secundaria
- Retraso mental
- Rasgos dismórficos

6. Período del adulto:

- Padres de niños con anomalías cromosómicas estructurales
- Abortos de repetición
- Infertilidad inexplicable
- Diagnóstico prenatal (líquido amniótico y biopsia de corion)
- Rasgos dismórfico

7. En todas las edades:

- Procesos malignos (cariotipo constitucional y tumoral)
- Control de trasplantes de medula ósea (Galán, 2010) (Delgado, et al. 2012).

1.6 Cromosoma 15

El cromosoma 15 es acrocéntrico, pertenece al grupo D. Contiene 101,991,189 pares de bases, 613 genes codificantes y 982 genes no codificantes, que representa el 3.5% del genoma nuclear (Figura 8).

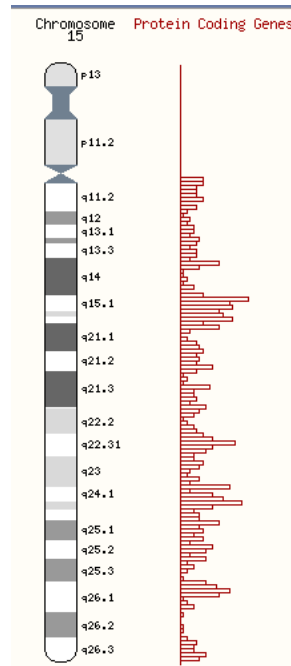


Figura 8. Estructura del cromosoma 15. Al lado izquierdo se muestra el idiograma con bandas GTG, así como la representación gráfica del porcentaje general de los genes codificantes (rojo). Imagen tomada de www.ensembl.org, marzo 2017.

En el cromosoma 15 se han identificado y descrito diferentes genes y regiones cromosómicas asociadas con síndromes clínicos bien definidos, entre ellos tenemos:

Tabla 2. Genes del cromosoma 15 relacionados con patologías mendelianas.

Locus	Gen	MIM	Enfermedad
15q15.1	CAPN3	#253660	Distrofia Muscular de Cinturas tipo 2A
15q21.1	FBN1	#154700	Síndrome de Marfán
15q23	HEXA	#272800	Enfermedad de Tay-Sachs
15q24.1	BBS4	#615982	Síndrome de Bardet Biedl
15q26.1	RECQL3	#210900	Síndrome de Bloom

Información obtenida de www.omim.org.

1.7 Impronta Genómica

La Impronta genómica es la marca o sello epigenético que se establece en un gen o grupo de genes basado en su origen parental y se traduce en la expresión monoalélica de este (Strachan & Read, 2010).

En organismo diploides en cada gen existe dos copias, cada una aportada por el progenitor masculino y femenino, de la mayoría de los genes se expresa tanto el alelo paterno como el materno (bialélica). El genoma heredado de la madre parece ser más importante para el desarrollo fetal, mientras que el heredado del padre es más importante para el desarrollo de los tejidos extraembrionarios (Bajrami & Spirosk, 2016).

En un pequeño grupo de genes identificados inicialmente en ratones a finales de 2007 se observó que mostraban diferencia en niveles de expresión cuando proceden de alelos paternos y maternos. Los estados de la cromatina de alelos paternos y maternos en el cigoto pueden no ser idénticos. Hasta el momento se conocen más de 75 genes improntados en humanos, la mayoría en grupos, se cree que pueden existir más de 1000 genes (Gos, 2013).

El 80% de los genes improntados se encuentran en clusters que contienen entre 3 y 11 genes, y que cada cluster es regulado por un centro de control de impronta (CCI), los clusters o regiones cromosómicas que contienen genes improntados en los cromosomas 6, 7, 11, 14 y 15. La metilación de la citosina de los CCI contribuye a la no expresión coordinada de genes improntados (Bajrami & Spirosk, 2016).

Metilación del DNA en la impronta

En el establecimiento de la impronta genómica, la metilación del DNA juega un papel fundamental siendo una de las modificaciones epigenéticas mejor estudiadas. Tal y como constata la definición de epigenética, la impronta o marcaje genómico no supone cambios en la secuencia de nucleótidos del DNA en esos genes, sino que ésta se produce por la adición de grupos metilos (-CH₃) a los residuos de citosina de los dinucleótidos formados por citosina y guanina (CpGs), los cuales se encuentran regiones genómicas llamados islas CpG, que comúnmente se asocian con regiones promotoras (Ishida & Moore, 2013).

La metilación del DNA en secuencias específicas es la modificación epigenética que distingue los alelos materno y paterno en los *loci* improntados. Proceso epigenético de cambios dinámicos postranscripcionales de la cadena de DNA que permite controlar su expresión génica. (Kalish, Jiang, & Bartolomei, 2014)

1.7.1 Región 15q11-q13

La región 15q11-q13, con una longitud de alrededor 6Mb, se encuentra flanqueada por secuencias repetidas en tandem, que originan tres puntos de ruptura (BP: break points), dos proximales (BP1 y BP2) y uno distal (BP3) (Botezatu, et al, 2015).

La región 15q11.2-q13 se puede dividir aproximadamente en 4 regiones distintas que se delinean por los tres BP, que se encuentran dentro de duplicaciones segmentarias (Figura 9). El brazo largo proximal del cromosoma 15 humano es propenso a anomalías citogenéticas, y da lugar a deleciones, duplicaciones, triplicaciones, translocaciones e inversiones, así marcadores supernumerarios derivados de invdup(15). Las manifestaciones fenotípicas de las anomalías 15q11-13 también dependen del origen parental del rearrreglo cromosómico, ya que esta región está sujeta a impronta. En la literatura se describe una condición clínica más severa para la tetrasomía ó trisomía, lo que sugiere un efecto de la dosis de génica en dicha región (Coppola et al., 2013) (Marini et al., 2013).

Cuando dicha región cromosómica es deletada, en la mayoría de pacientes ocurren ciertos síndromes como síndrome de Prader-Willi (PWS) y Angelman(AS), mientras que las duplicaciones de esta región se asocian con una variedad de fenotipos. (Castronovo, et al, 2015).

En primer lugar, la región proximal sin impronta, entre los dos puntos de ruptura proximales comunes (BP I y BP II) que contiene cuatro genes con expresión biparental (*NIPA1*, *NIPA2*, *CYFIP1*, y *TUBGCP513*) (Cheon C. K., 2016). En segundo lugar, el dominio PWS contiene cinco genes con expresión paterna que codifican ciertas proteínas (*MKRN3*, *MAGEL2*, *NDN*, *SnoRNAs*, y *SNRPN-SNURF*, *C15orf2*) y varios transcritos antisentidos (incluyendo la transcripción antisentido a *UBE3A*) (Botezatu, et al, 2015). En tercer lugar, el dominio del síndrome de Angelman (AS) que contiene los genes de expresión materna (*ATP10A* Y *UBE3*). En cuarto lugar, una región distal sin impronta que contiene un grupo de tres genes receptores del ácido gamma-aminobutírico, el gen para el albinismo oculocutáneo tipo 2 (*OCA2*), *HERC2* y el punto de ruptura distal común (BP III) (Cheon C. K., 2016), (Cox & Butler, 2015).

SNURF-SNRPN (su siglas en inglés; *Upstream Reading Frame- Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide N*) es un locus de genes centrales para la región PWS extremadamente complejo que se extiende, 465 kb, con 148 posibles exones sometidos a corte y empalme alternativo. *SNURF* está codificado por los exones 1-3, que produce un polipéptido de función desconocida. En el extremo 5' del gen *SNURF-SNRPN* se encuentra una isla CpG que abarca el promotor, el exón 1, y el intrón 1. La expresión se produce en parte a través de los alelos parentales específicos de metilación de los residuos de CpG, que se establece durante o después de la gametogénesis y se mantuvieron durante embriogénesis. Esta es una región diferenciadamente metilada (DMR), que está desmetilada en la expresión del alelo paterno y metilada en el alelo materno. El complejo *SNURFSNRPN* también sirve como el anfitrión de snoRNA

(*SNORD64*, *SNORD107*, *SNORD108*, *SNORD109A*, *SNORD109B*, *SNORD116* y *SNORD115*) que no codifican proteínas, los genes *SNORD* localizados en esta región son un tipo de RNA pequeño nucleolar (snoRNA) con una secuencia específica, box C/D, los cuales modifican al mRNA, rRNA e iRNA con el que interaccionan metilando ribosomas. Son de especial interés debido a se expresan principalmente en cerebro (Pérez de Nanclares & Lapunzina, 2015).

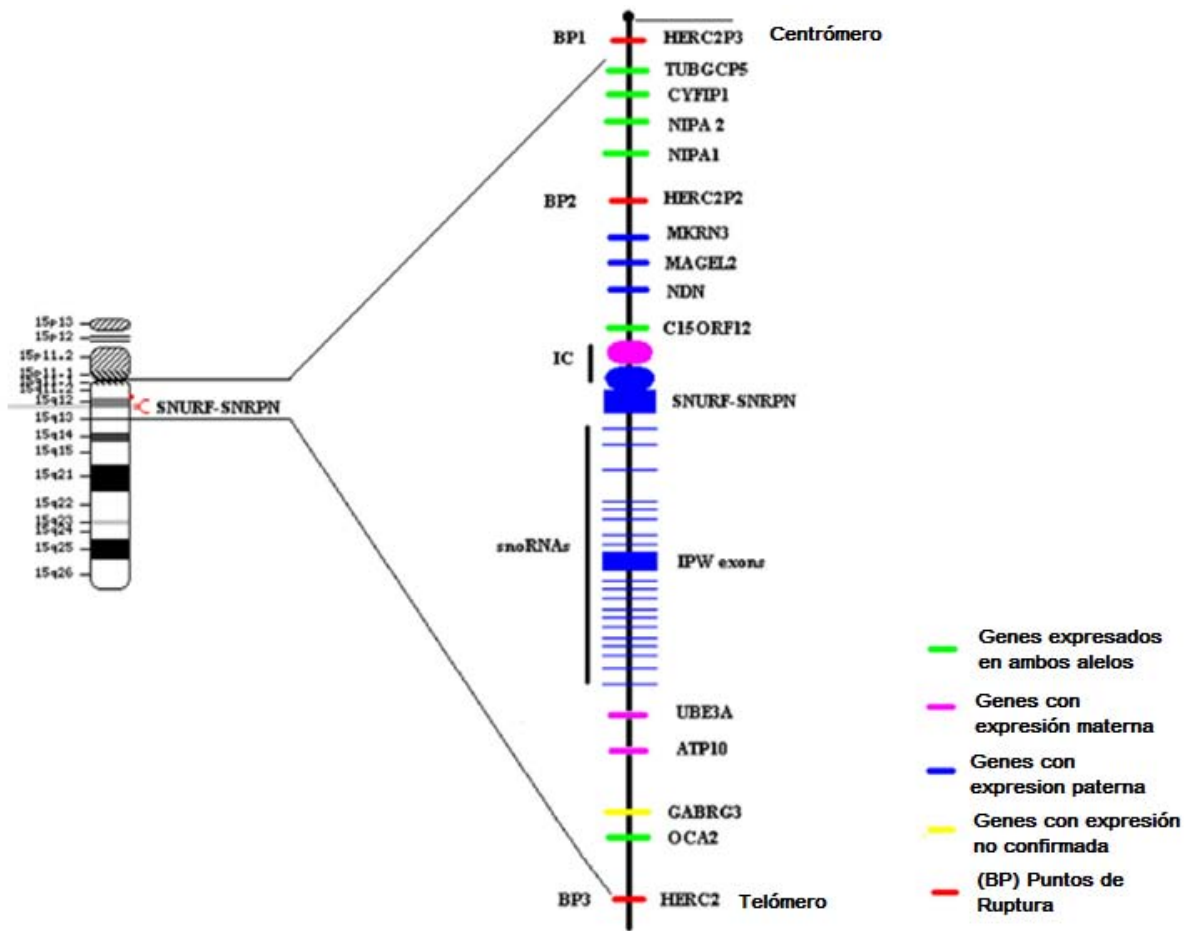


Figura 9. Imagen de la región cromosómica 15q11-15q13 con los puntos de ruptura involucrados BP1, BP2 y BP3, marca con verde agua los genes expresados bi-alélicamente, con rosa los genes maternos expresados, con azul los genes paternos expresados. Modificada (Botezatu et al., 2015).

Gen *OCA2* está relacionado con la hipopigmentación de piel y anexos, aparición de pecas y lunares y este es regulado a su vez por *HERC2* (Botezatu, et al, 2015).

1.7.2 Síndrome de Prader – Willi (MIM: 176270).

El síndrome de Prader-Willi (PWS) fue el primer desorden genómico de impronta identificado en humanos, con una frecuencia de 1 en 15,000-30,000 nacidos vivos. El síndrome resulta de la pérdida del patrón de metilación paterno en la región de impronta de PWS, localizada en el cromosoma 15q11.2-q13 (Cheon C. , 2016).

Las causas que lo producen son:

- Deleción de la copia de la región del cromosoma paterno en 70-75%.
- Disomía Uniparental (UPD) de la copia materna en el 25%.
- Alteraciones en la impronta en 2-5%.
- Rearreglos cromosómicos que incluyen la región 15q11.1-q13 (Cataletto, Angulo, & Butler, 2015)

Las deleciones típicas de PWS oscilan entre 5 y 7 Mb desde el punto de ruptura 1 (BP1) o el punto de ruptura 2 (BP2) hasta el punto de ruptura telomérico común 3 (BP3) y se han clasificado en deleciones de Tipo I (BP1-3) o de Tipo II (BP2-3), respectivamente.

Dentro de las características clínicas los pacientes con PWS presentan hipotonía severa, manos y pies pequeños, dismorfias faciales, hipogonadismo y problemas de alimentación durante la infancia, seguidos de retraso en el desarrollo, discapacidad intelectual leve, problemas de conducta, falta de saciedad y obesidad a medida que crecen (figura 10) (Cheon C. K., 2016) (Liu, et al., 2013).

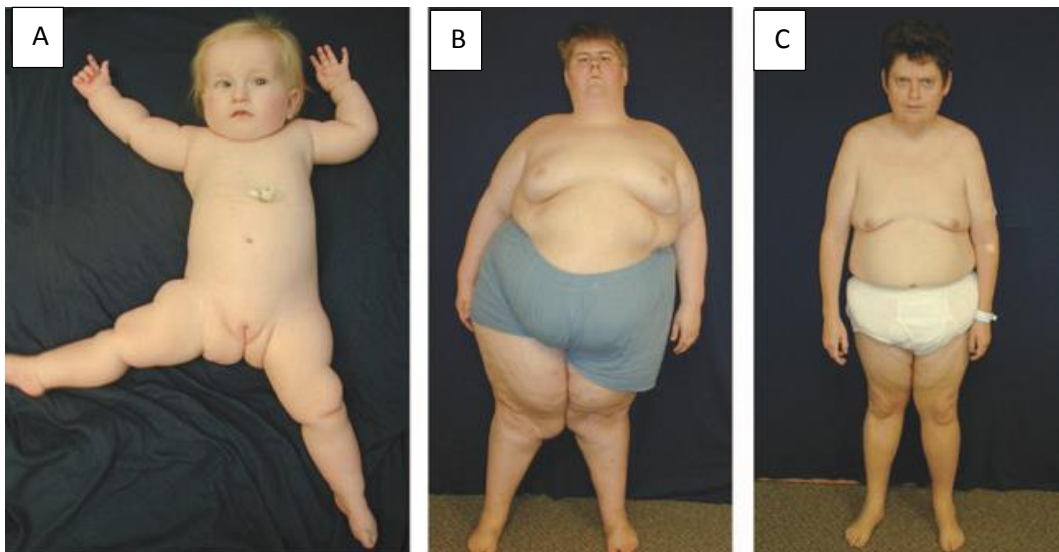


Figura 10. Características clínicas con individuos con PWS. Imagen A. muestra paciente con 8 meses de edad con hipotonía, hipogonadismo. Imagen B. paciente de 18 años con inadecuada distribución de grasa corporal. Imagen C. paciente de 34 años con adecuado control en peso corporal. Imagen modificada de Suzanne B. Cassidy, 2012.

A principios de los 90 se establecieron los sistemas de puntaje para ayudar al diagnóstico clínico de PWS; sin embargo, los criterios revisados publicados en 2001 (Holm) se enfocaron en la identificación de los individuos que debían someterse a las pruebas para el diagnóstico definitivo (Cheon C. K., 2016).

1.7.3 Síndrome de Angelman (MIM#105830)

El síndrome de Angelman (AS) es un desorden del neurodesarrollo con una prevalencia estimada entre 1: 22,000 y 1: 52,000. Los individuos con AS tienen un retraso en el desarrollo global que evoluciona hasta discapacidad intelectual severa, con alteraciones en el lenguaje, con un lenguaje expresivo mucho más retrasado que su lenguaje receptivo (Buiting, Williams, & Horsthemke, 2016).

Su perfil de comportamiento se caracteriza por un comportamiento feliz con risas fácilmente provocadas, fascinación por el agua, movimientos de la boca, comportamientos hipercinéticos y comportamientos adaptativos como tirón del pelo. Además, la mayoría de los individuos con AS pasan por períodos prolongados de trastornos del sueño en forma de latencia del sueño y despertares múltiples a través de la noche (Figura 11) (Bird, 2014).

Otras alteraciones neurológicas incluyen la hipotonía generalizada en individuos más jóvenes con el desarrollo de hipertonia periférica en individuos mayores, ataxia, epilepsia, así como el reposo y la intención sexual en adolescentes y adultos (Tan & Birds, 2016).



Figura 11. Características Clínicas de individuos con AS. En la Imagen A Y B se observa risas excesivas aparentemente felices, junto con la marcha rígida y los brazos levantados. La boca relativamente grande y el filtro corto ocurren en algunos adultos (Imagen C), pero la mayoría de los adultos y los niños no tienen dismorfias faciales distintivas (Imagen D). La mala oclusión - por ejemplo, una mordida abierta - se puede ver después de la protrusión prolongada de la lengua en la infancia (Imagen D). La microcefalia se observa en muchos casos (Imagen A, B), pero rara vez es severa. Imagen modificada Buiting, et al., 2016.

El síndrome de Angelman es causado por alteraciones en la región improntada 15q11-1q13, las cuales incluyen:

- Deleción en el cromosoma 15 materno (65-75% de los casos).
- Mutaciones en el alelo materno del gen *UBE3A* (5-11%).
- Disomía Uniparental (UPD) paterna del cromosoma 15 (3-7%).
- Defecto en la Impronta (3%).

El gen *UBE3A* muestra impronta específica de tejido - se expresa específicamente en el cerebro a partir del alelo materno, codifica la proteína E6AP ubiquitina ligasa que es responsable de la ubiquitinación de proteínas y para la degradación en el proteosoma (Maarri et al., 2001).

1.7.4 Síndrome de duplicación 15q11-q13 (dup15q)

Las duplicaciones y triplicaciones de 15q11-q13 también pueden ocurrir como reordenamientos intracromosómicos intersticiales. Estas anomalías son difíciles de detectar por citogenética convencional, con la utilización de técnicas de citogenética molecular el cual el número de casos ha aumentado rápidamente en los últimos años (Marini et al, 2013) (Castronovo et al., 2015).

Epidemiología

La prevalencia de duplicaciones de 15q11-q13 es de aproximadamente 1 en 600 entre los pacientes con retraso en el desarrollo psicomotor (RDPM) y 2 en 100 entre los pacientes con trastorno del espectro autista (Castronovo, et al, 2015).

Manifestaciones clínicas

La mayoría de las duplicaciones intersticiales 15q11-13 de origen materno se asocian con anomalías fenotípicas variables (Tabla 4), incluyendo: retraso del desarrollo psicomotor, rasgos autistas y crisis convulsiones intratables, dificultades de aprendizaje y esquizofrenia La epilepsia es una característica común, pero las descripciones de casos con trisomía se limitan a unos pocos informes y el fenotipo aún no está bien definido (Coppola, et al, 2013).

Las duplicaciones paternas de la misma región son a menudo aparentemente asintomáticos. Se han reportado casos con duplicaciones paternas 15q11-q13. No se reportaron crisis convulsivas (Marini, et al, 2013).

Tabla 4: Frecuencia de características clínicas de pacientes con síndrome de duplicación 15q11-q13.

Frecuentes (80%)	Asociadas (20-80%)
Hipotonía	Rasgos faciales característicos
Alteración en el lenguaje	Retraso en el crecimiento
Retraso en el desarrollo	Trastorno en el espectro autista
Cambios en el comportamiento	Desordenes en el procesamiento sensorial
EEG anormal	Epilepsia
	Hiperpigmentación

Modificada de (Kalsner & Chamberlain, 2015) EEG: electroencefalograma

La hipotonía muscular se observa en casi todos los individuos con síndrome de dup15q y puede ser severa, lo que provoca dificultad para la alimentación, hiperextensibilidad articular y babeo acompaña la hipotonía en la mayoría de los individuos. Alteración en los hitos del desarrollo principalmente motor, como rodar, sentarse y caminar. Presentan llanto débil. Suele en algunos adultos, también puede disminuir o progresar a la hipertonia en extremidades (Kalsner & Chamberlain, 2015) (Castronovo, et al, 2015).

La hipotonía contribuye al retraso en el desarrollo psicomotor/discapacidad intelectual. El retraso en las habilidades motoras gruesas y finas es común en individuos con síndrome de dup15q. El retraso motor fino incluye el uso no funcional de objetos y la exploración inmadura de objetos. El retraso cognitivo y social-emocional es evidente en todos los niños con dup15q. La comprensión es muy limitada; La discapacidad cognitiva y la discapacidad intelectual son frecuentes en el rango de severas a profundas. (Kalsner & Chamberlain, 2015) (Marini, et al, 2013).

Las convulsiones afectan hasta al 60% de los pacientes, con inicio típico antes de la edad de 5 años. Los niños afectados pueden tener múltiples tipos de convulsiones, incluyendo espasmos infantiles, tónico, atónico, tónico-clónico, mioclónico, complejo parcial y crisis de ausencia atípica. Las convulsiones pueden ser intratables. Existe un mayor riesgo de muerte inesperada repentina en epilepsia (SUDEP) en individuos con síndrome de dup15q. Los pacientes sin convulsiones manifiestas, tienen actividad EEG anormal (Kalsner & Chamberlain, 2015) (Coppola, et al, 2013).

La mayoría de los pacientes con dup(15) cumplen con los criterios diagnósticos para un trastorno del espectro autista. El retraso en el habla y el lenguaje son muy frecuentes, algunas personas son completamente no verbales, mientras que unos pocos son altamente verbales. El lenguaje expresivo está afectado gravemente e incluso puede estar ausente. Suelen presentar ecolalia. La intención de comunicarse está también ausente o es muy pobre en un número elevado de pacientes, las interacciones sociales son inadecuadas, mirar y evitar el contacto corporal es común, es difícil que muestren

comportamientos como berrinches, gritos y agresividad, al igual que estereotipias. Con frecuencia se ven aplausos, movimientos en manos, así como tendencia a morder los dedos, girar la cabeza y repetir el giro. A pesar de un diagnóstico frecuente de autismo, muchas personas con síndrome de dup15q obtienen una puntuación baja en la prueba de diagnóstico de autismo (ADOS-G) (Kalsner & Chamberlain, 2015).

Los rasgos faciales suelen ser sutiles, pero existen característicos que se pueden ver en la mayoría de los pacientes afectados. Estas características incluyen un pequeño botón en la nariz, fisuras palpebrales descendentes, pabellones auriculares de implantación baja y/o con rotación posterior. También presentan aumento de la pigmentación y retardo del crecimiento que se produce en aproximadamente 20% a 30% de los individuos. El hipogonadismo ocurre en aproximadamente 20% de los individuos afectados, aunque la pubertad precoz suele estar presente que no se ha visto frecuentemente (Castronovo, et al, 2015) (Kalsner & Chamberlain, 2015).

Caracterización Molecular

El síndrome de dup15q consiste en la presencia de una copia adicional de la región 15q11.2-q13 improntada; generalmente materna, insertada invertida y en tándem en otra copia de la región (Castronovo, y otros, 2015) (Kalsner & Chamberlain, 2015) Por lo tanto, estos individuos tienen una tetrasomía para la región 15q11-q13.

Los individuos con duplicaciones intersticiales de origen paterno parecen tener un fenotipo distinto, más leve en comparación con individuos con duplicaciones intersticiales maternas. Debido a la dependencia de los fenotipos de los individuos sobre el origen parental del alelo o alelos duplicados, se supone que el gen *UBE3A*, cuya pérdida de función causa AS, contribuye significativamente al síndrome de Dup15q, ya que éste tiene expresión a nivel del SNC en cerebro. Otros genes, expresados en forma bialélica también podrían jugar un papel importante. Un grupo de genes de la subunidad del receptor de ácido g - aminobutírico (*GABRB3*, *GABRA5* y *GABRG3*), y un gen que codifica otra ligasa de ubicuitina, *HERC2*, están duplicado en individuos con duplicación intersticial materna. Coppola, et al, 2013) (Kalsner & Chamberlain, 2015).

Diagnóstico

Las duplicaciones en la región 15q11-q13, son propensas a la transposición genómica debido a la presencia de elementos de DNA repetidos, esto no es diagnóstico es como se producen las duplicaciones en la región 15q11-q13, se detectan con mayor frecuencia a través de aCGH o cariotipo molecular por microarreglos de SNP y CNV de alta densidad, técnicas de elección cuando se evalúan los niños con hipotonía, trastorno del espectro autista o discapacidad intelectual. Aunque las duplicaciones intersticiales típicamente no serían detectables por citogenética convencional. El empleo de microarreglos también permite la delimitación precisa de los puntos de corte y el tamaño del material duplicado. La identificación de una duplicación intersticial, debe ser

seguida por una prueba para determinar el origen parental del material extra ya que este afecta el fenotipo. Esto puede hacerse ya sea mediante el análisis de metilación del DNA de la región en la muestra del paciente por PCR-MS o por MLPA -MS para determinar el patrón de impronta o mediante el análisis de microsatelites de la región en muestras del paciente y sus padres (Castronovo, et al, 2015) (Kalsner & Chamberlain, 2015).

Manejo multidisciplinario

Tono muscular / crecimiento y nutrición

La hipotonía, que afecta particularmente a la musculatura oro-facial, puede provocar dificultades de alimentación en la infancia, puede requerir atención especial para la alimentación y al crecimiento. El retraso en la adquisición de hitos del desarrollo la intervención temprana con fisioterapia puede ser afectada. (Kalsner & Chamberlain, 2015)

Trastorno del espectro Autista

Dado el alto riesgo de trastorno del espectro autista, la evaluación por un pediatra del desarrollo, debe ser considerada, ya que los niños se benefician desde la intervención temprana con el desarrollo del lenguaje y las terapias educativas (Krishnan, et al, 2017).

Epilepsia

Las crisis convulsivas suelen ser leves, de presentación tardía, por lo que el EEG de detección puede estar justificado. El tratamiento con ACTH / esteroides para espasmos infantiles parece ser más efectivo en este grupo que la vigabatrina (75% vs 29%), y por lo tanto debe ser considerado como terapia inicial (Kalsner & Chamberlain, 2015).

1.7.5 Síndrome idic (15)

El síndrome de idic(15) (cromosoma isodicéntrico 15) o invdup15q es el desorden genético, el cual se caracteriza por la presencia de un cromosoma marcador supernumerario formado por la inversión duplicación del cromosoma proximal 15, dando lugar a tetrasomía 15p y tetrasomía 15q parcial. Muchos reordenamientos cromosómicos pueden ocurrir en la región 15q11-q13, que es conocida por su inestabilidad debido a la presencia de elementos de DNA repetidos. La gran mayoría de idic (15) (q12 o q13) deriva de los dos cromosomas maternos homólogos en la meiosis, y se asocia con aumento de la edad materna (Aypar U, 2014) (Battaglia, Bernardini, Torrente, Novelli, & Gloria, 2016).

Epidemiología

La incidencia se ha reportado de 1 en 30.000 con una proporción de sexo hombre: mujer de casi 1. Sin embargo, las características dismórficas están ausentes o son discretas y las malformaciones mayores son raras, el análisis cromosómico no se indica con frecuencia, y algunos individuos, particularmente en los grupos de mayor edad, probablemente no se hayan diagnosticado (Battaglia A. , 2008) (Szabo A et al., 2015).

Manifestaciones Clínicas

El retraso en el desarrollo y la discapacidad intelectual generalmente van de moderados a profundo, la edad de adquisición de los hitos del desarrollo psicomotor vez se reportan en la literatura médica, sin embargo, parece que la sedestación se logra entre 10 y 20 meses de edad, y caminar entre 2 y 3 años (Figura 12). El lenguaje expresivo está ausente o es muy pobre, a menudo se caracteriza por ser ecolalia inmediata y tardía.

La comprensión es muy limitada, la intención de comunicar está ausente o muy pobre. El trastorno de conducta en niños y adolescentes ha sido ampliamente descrito como trastorno del espectro autista. (Battaglia, Bernardini, Torrente, Novelli, & Gloria, 2016) (Liu et al., 2013).

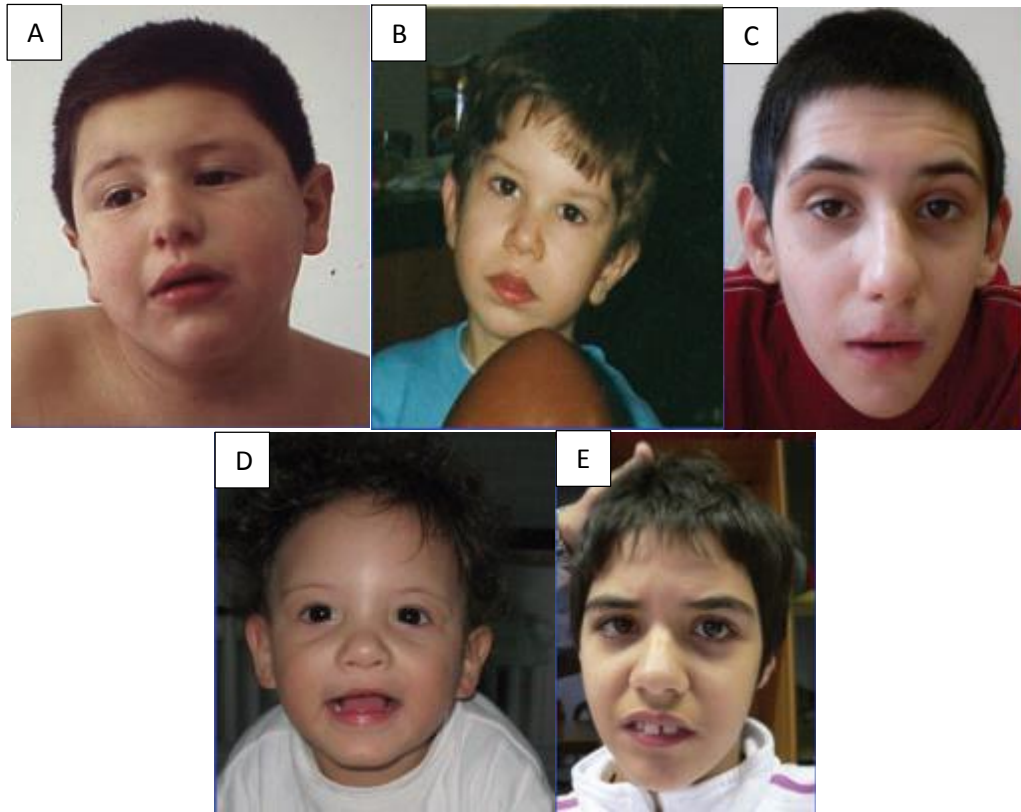


Figura 12. Características faciales de una serie de pacientes con síndrome de invdup15q11-13. **A.** pobre contacto ocular, base nasal ancha epicanto bilateral. **B.** epicanto bilateral, base nasal ancha. **C.** comportamiento desafiante, base nasal ancha, **D.** epicanto telecanto, base nasal ancha. **E.** estrabismo, base nasal ancha. Imagen modificada de Battaglia, et al., 2010.

En la última versión de la clasificación internacional de trastornos mentales Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-5 (DSM-5), incluye el autismo dentro de los trastornos del neurodesarrollo, alejándose de la antigua conceptualización de Trastorno Generalizado del Desarrollo (TGD). Además, el autismo pasa a denominarse Trastornos del Espectro Autista (TEA). Es por este motivo que desaparecen los subtipos de autismo (Síndrome de Rett, Síndrome de Asperger, Trastorno desintegrativo de la infancia, Trastorno generalizado del desarrollo no especificado).

En esta clasificación, se considera que las características fundamentales del autismo son: un desarrollo de la interacción social y de la comunicación, claramente anormales, y un repertorio muy restringido de actividades e intereses. La Discapacidad Intelectual (DI) y el TEA se encuentran frecuentemente (Krishnan et al., 2017).

Para poder realizar un diagnóstico del TEA y de la DI, la comunicación social debe situarse por debajo de lo esperado a nivel general del desarrollo. Y además de los criterios diagnósticos, debe especificar si: Se acompaña o no de discapacidad intelectual, se acompaña o no de deterioro del lenguaje, afección médica o genética, o a un factor ambiental, también debe especificarse el nivel de severidad: nivel 1: necesita ayuda, nivel 2: necesita ayuda notable, nivel 3: necesita ayuda muy notable (APA, 2014).

Por lo general, estos niños evitan contacto visual desde muy temprano, también evitan el contacto corporal y en general mirar a las personas. Pueden mostrar fascinación por ciertos sonidos, por el agua, hilado o cualquier objeto brillante. Ellos usualmente prefieren quedarse solos, acostados mirando sus dedos y tomando posturas extrañas. Cuando se frustran, pueden reaccionar con estallidos de grito o con agresividad (Szabo A. et al., 2015).

Las estereotipias se observan con frecuencia, incluyendo el aleteo de la mano, aplaudiendo sobre superficies planas, mordiendo los dedos, girando la cabeza, girando a sí mismo por largos períodos de tiempo. La hiperactividad ha sido reportada en un mínimo de casos (Battaglia, Bernardini, Torrente, Novelli, & Gloria, 2016) (Liu et al., 2013).

La epilepsia puede estar presente en éstos Individuos, con inicio entre las edades de 6 meses y 9 años. Presenta una gran variedad de convulsiones que van desde espasmos infantiles asociados con un electroencefalograma hipsarrítmico reportados en varios pacientes. El síndrome de Lennox- Gastaut ha sido observado, con movimientos tónico /atónico, convulsiones tónico-clónicas y ataques atípicos, crisis de ausencias con inicio entre 4 y 8 años de edad de difícil control (Liu et al., 2013).

Las crisis convulsivas observadas con aislamiento mioclónico suelen ser resistentes a fármacos, y ser inducidas por estímulos emocionalmente gratificantes besos, de eventos agradables o divertidos (Szabo A. et al., 2015) (Battaglia A. , 2008).

En el electroencefalograma la literatura incluye un rítmico generalizado 3.5-4 Hz ondas de pico y ondas, durando 4-6 segundos. Otras anomalías del EEG consisten en picos difusos, poli-picos y complejos poli-pico/ onda mal definidos, con predominio hemisférico variable (Aypar U, 2014).

En el embarazo el peso al nacer son generalmente normales. Las dificultades de alimentación en el período neonatal, con retraso en el crecimiento se reporta en el 20%-30% de los pacientes. La microcefalia se observa en menos del 20% de los individuos, mientras que la macrocefalia es menor al 3%. Hipogonadismo se informa en alrededor del 20%, aunque la pubertad suele ser normal en la mayoría de los individuos los trastornos puberales, como pubertad central precoz o disgenesia ovárica suele presentarse en menor frecuencia (Aypar U, 2014).

La hipotonía muscular se observa en casi todos los individuos, asociada, en la mayoría de ellos, con hiperextensibilidad articular y babeo. Otros hallazgos físicos son bastante

inespecíficos, pueden incluir: tendencia a la braquicefalia, sinoffris, ojos caracterizados por fisuras palpebrales descendentes, pliegue epicanto, ojos profundos, nariz ancha, narinas antevertidas, filtrum corto, paladar hendido, paladar muy arqueado, implantación baja y/o rotación posterior de pabellones auriculares, 5° dedo con clinodactilia y dermatoglíficos inusuales; polidactilia cutánea parcial del 2do-3er dedos del pie. En adultos mandíbula prominente, braquidactilia y áreas de hipopigmentación ocasionalmente observado. Las malformaciones mayores, como las defectos septal, tetralogía de Fallot, insuficiencia renal unilateral, agenesia renal, hernias umbilicales e inguinales, hipospadias, y criptorquidia parecen ser raras (Tabla 3) (Battaglia A. , 2008).

Tabla 3. Frecuencia de las características clínicas de los pacientes con Síndrome del idic(15).

Características clínicas presentes en:		
75% pacientes	25-50% pacientes	menos de 25%
Hipotonía	Anormalidades cerebrales	Defectos cardiacos congénitos
Retraso en el desarrollo psicomotor, discapacidad intelectual	Defectos en el tracto genitourinario	Microcefalia
Comportamiento Autista	Retraso en el crecimiento	
Epilepsia		
Dismorfias faciales menores.		

Modificada de Battaglia, et al, 2016.

Caracterización molecular

Se han propuesto varios mecanismos genéticos para explicar la heterogeneidad clínica, incluyendo el tamaño de los cromosomas duplicados, efecto de la dosis de los genes en esta región, y el origen de la región con impronta. Además de los 2 cromosomas 15 normales, los individuos con idic(15) tienen un cromosoma supernumerario pequeño con dos copias adicionales de la región materna 15q11.2-q13. Como el nombre lo indica, el cromosoma idic(15) también contiene 2 centrómeros pero es aparentemente estable, posiblemente por la inactivación de uno de los centrómeros. Los individuos con idic(15) son tetrasómicos para la región 15q11.2-q13, con 3 copias maternas y 1 copia paterna del *locus* (Kalsner & Chamberlain, 2015).

El hecho de que la tetrasomía del PWS/ASCR está asociada con un fenotipo más severo que el observado en la trisomía, sugiere que hay un efecto de dosis para un gen o genes en esta región; además de que la expresión génica en esta región crítica está regulada

por impronta. Dado que sólo las aberraciones heredadas del cromosoma materno 15q11-13 parecen ser patogénicas, es probable que los genes, en esta región genómica, actúan dependiendo de dosis de manera que su número de copias es crítico para el desarrollo normal del cerebro y la función (Battaglia, Bernardini, Torrente, Novelli, & Gloria, 2016).

En la mayoría de los casos reportados se han descrito los puntos de ruptura implicados, a partir de ello se ha establecido que la mayoría de los cromosomas idic(15) surgen a través de eventos de recombinación entre los puntos de ruptura BP2-BP3 lo que se forma un cromosoma supernumerario con inversión y duplicación del brazo corto del cromosoma 15 y el esquema de cómo se produce el marcador (Figura13).

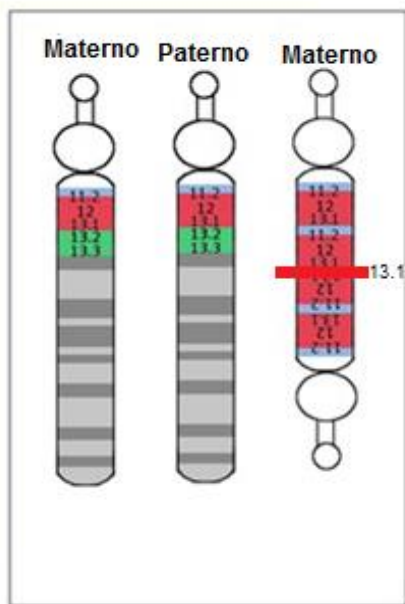


Figura 13. Idiograma de los cromosomas 15 materno y paterno y el cromosoma con invdup15q de origen materno, especificando los puntos de ruptura. Modificado de Finucane, et al., 2016.

El segmento de ~ 4Mb que abarca el PWS / ASCR está entre BP2 Y BP3. La forma más frecuente de idic (15) se caracteriza por un evento de recombinación asimétrica entre BP4 y BP5. Esto conduce a la tetrasomía para el intervalo desde el centrómero, BP4 y trisomía de BP4 a BP5 (Aypar U, 2014).

En la región PWS / ASCR, existe una relación interesante entre los genes *GABA α5* y *β3* (Ácido gamma-aminobutírico) de la subunidad del receptor y el gen P. De hecho la tetrasomía de dichos genes, como se observa en el síndrome de idic (15), puede alterar la actividad del receptor de GABA, sobre la cual tienen una función en los mecanismos inhibitorios del SNC (sistema nervioso central). Esta alteración podría representar la base biológica para algunas manifestaciones clínicas del síndrome, como convulsiones,

hiperactividad, agresividad y el trastorno del espectro autista. Se han vinculado con desequilibrio entre un marcador en el gen γ -aminobutirico de la subunidad del receptor ácido A, *GABRB3 155CA-2*, y un desorden adicional del gen, localizado más distalmente, el *SLC12A6*, que codifica para un Co-transportador de cloruro expresado en el cerebro, el corazón, el esqueleto músculo y riñón, que también podrían estar implicados (Battaglia A. , 2008).

En la patogénesis de las convulsiones, se ha intentado una correlación fenotipo-genotipo, pero era problemático. De hecho, las manifestaciones componentes tales como antecedentes de convulsiones, trastornos del comportamiento y situación son difíciles de evaluar con precisión, en niños pequeños, y también existe una variación considerable en los puntos de ruptura (Battaglia, et al., 2016) (Aypar U, 2014).

Diagnóstico.

En el abordaje de pacientes con hipotonía, trastorno del espectro autista o discapacidad intelectual, estos son candidatos para realización del estudio hibridación genómica comparativa sobre microarreglos (aCGH) que permite la delimitación precisa de los puntos de corte y el tamaño del material adicional, pero también se pueden identificar con técnicas citogenéticas - moleculares como el cariotipo de alta resolución junto con el análisis de FISH, donde se puede apreciar un cromosoma marcador. Además La identificación de un idic (15) debe ser seguida por una prueba para identificar el origen parental, que afecta el fenotipo. Esto podría hacerse ya sea mediante el análisis de metilación del DNA de la muestra (MLPA -MS) o de muestras parentales (microsatelites) (Castronovo, et al, 2015) (Kalsner & Chamberlain, 2015).

Manejo multidisciplinario

Muchos estudios han confirmado que el idic(15) de origen materno presenta mayor número de manifestaciones clínicas en relación al de origen paterno, asociándose significativamente a un riesgo alto de trastorno del espectro autista. Por lo que se recomienda un manejo multidisciplinario que beneficie al paciente en el desarrollo social y educativo (Kalsner & Chamberlain, 2015).

La hipotonía se ha visto relacionada con dificultad en la alimentación, desde edades tempranas, motivo por el cual es necesario una intervención desde edad temprana, para un mayor beneficio en el pronóstico (Battaglia A. , 2008).

Las convulsiones se han reportado en mayor frecuencia y más graves en niños con idic (15), que en aquellos con duplicaciones intersticiales (dup15q) afectando aproximadamente dos tercios, frente al 25%. El riesgo para espasmos infantiles son altos, y los padres deben ser aconsejados para ver signos tempranos de este tipo de convulsiones, para el tratamiento temprano, que resulta beneficioso para los pacientes. Las convulsiones a menudo evolucionan hacia el síndrome de Lennox-Gastaut y parecen responder bien a anticonvulsivos como el ácido valproico, rufinamida, lamotrigina y zonisamida. No responden bien a las benzodiazepinas, y la exacerbación

de las convulsiones se informó en casi la mitad de los tratados con leviteracetam. Desafortunadamente, el riesgo de epilepsia parece persistente con convulsiones que continúan en la edad adulta, en dos tercios de los casos. (Battaglia, Bernardini, Torrente, Novelli, & Gloria, 2016).

2. Planteamiento del problema.

Las indicaciones de análisis citogenético incluyen a aquellos pacientes que presentan malformaciones congénitas y alteraciones del desarrollo con déficit intelectual. Entre las aberraciones cromosómicas que podrían estar asociadas se deben descartar las alteraciones estructurales, las que incluyen a los cromosomas marcadores supernumerarios que se presentan hasta en el 0.044% de los recién nacidos vivos. El 86% de esos marcadores son producto de rearrreglos de los cromosomas acrocéntricos y el 65% son derivados del cromosoma 15. El fenotipo asociado es variable, con implicaciones importantes para el diagnóstico, manejo y pronóstico en los pacientes afectados. El HIMFG es un centro de concentración y referencia de pacientes con alteraciones cromosómicas, en esta tesis se describe el abordaje clínico, citogenético y molecular de dos pacientes con un cromosoma marcador supernumerario derivado del cromosoma 15 y se plantea la siguiente pregunta de investigación:

2.1 Pregunta de investigación:

¿Cuál es el tipo y la frecuencia de casos con marcadores cromosómicos supernumerarios en pacientes que acudieron al HIMFG en el periodo 2007 a 2016 y cuáles son las características clínicas, citogenéticas y moleculares presentes en dos pacientes con un cromosoma marcador supernumerario derivado del cromosoma 15?

3. Justificación

En la literatura se han reportado casos de pacientes con marcadores supernumerarios derivativos del cromosoma 15 que si bien comparten características clínicas, cada uno tiene características particulares que dependen de las regiones específicas implicadas, la extensión de la región afectada, los genes presentes y su origen parental. Su abordaje integral debe definir las características clínicas particulares y las alteraciones cromosómicas involucradas, incluido su origen parental, para establecer la relación fenotipo-genotipo. Lo anterior permite aportar conocimiento nuevo en relación a las regiones cromosómicas involucradas, tiene implicaciones para el manejo de estos pacientes y permite dar asesoramiento genético con bases moleculares.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Describir y analizar las características clínicas y las alteraciones citogenéticas moleculares asociadas a dos casos de pacientes con un cromosoma marcador supernumerario derivado del cromosoma 15.

4.2 Objetivos específicos:

1. Determinar la frecuencia de cromosomas marcadores supernumerarios en los pacientes con reporte de cariotipo del Laboratorio de Citogenética del Departamento de Genética del HIMFG en un periodo de 10 años (2007-2016).
2. Comparar la frecuencia de las alteraciones citogenéticas identificadas en este grupo de pacientes con lo descrito en la literatura.
3. Comparar los datos clínicos y citogenéticos moleculares presentes en los dos pacientes con síndrome del idic (15) estudiados con lo descrito en la literatura.
4. Establecer la relación entre las regiones cromosómicas implicadas y el fenotipo en dos casos de pacientes con un marcador supernumerario del cromosoma 15.

5. Material y métodos

5.1 Descripción de la Metodología.

Esta tesis se encuentra dividida en dos fases que corresponden a: Fase A. Análisis estadístico de cromosomas marcadores en los registros del Departamento de Genética de 2007-2016 y Fase B. Análisis de dos casos clínicos con un cromosoma marcador supernumerario derivado del cromosoma 15.

5.1.1 Diseño del estudio:

Retrospectivo, transversal y descriptivo.

5.1.2 Universo de Estudio.

Pacientes del Hospital Infantil de México Federico Gómez que acudieron a la consulta externa de Genética en el periodo del 1 de enero de 2007 al 31 de diciembre del 2016, con reporte de cariotipo con bandas GTG.

Fase A:

La primera sección incluyó el análisis estadístico de las frecuencias y los tipos de cromosomas marcadores supernumerarios identificados, en pacientes con reporte de cariotipo por técnica de bandas GTG, en el Laboratorio de Citogenética del Depto. de Genética del HIMFG en un período de 10 años comprendidos entre enero de 2007 a diciembre de 2016. La información fue obtenida de las libretas de reportes citogenéticos y de los expedientes clínicos de los pacientes. Se revisaron las fórmulas citogenéticas de acuerdo a la nomenclatura internacional del ISCN 2016. Se realizó análisis estadístico descriptivo y se calcularon los porcentajes correspondientes a los tipos de cromosomas marcadores supernumerarios identificados. La información obtenida fue comparada con lo reportado en la literatura.

Corresponde al análisis estadístico de todos los casos reportados de alteraciones estructurales de cromosomas marcadores, de acuerdo a los siguientes:

Criterios de selección.

Criterios de inclusión:

Resultado de cariotipos con bandas GTG que incluya la presencia de un cromosoma marcador supernumerario.

Reportado en el periodo de enero de 2007 a diciembre de 2016.

Resultado legible y escrito en forma correcta de acuerdo a la nomenclatura internacional.

Criterios de exclusión:

Resultado de cariotipo normal o con otro tipo de alteraciones cromosómicas.
Cariotipos que involucren marcadores derivados de cromosomas sexuales.
Resultados no legibles o mal escritos.

Criterios de eliminación:

Que no sea posible corroborar el tipo de alteración cromosómica.

Fase B:

En la segunda fase de la tesis se describe el análisis de dos casos de pacientes con un cromosoma marcador supernumerario derivado del 15, se revisaron sus historias clínicas, se actualizaron sus expedientes y se tomaron fotografías clínicas con consentimiento informado (Anexo 1), Se tomaron nuevas muestras para estudio molecular. Se analizó la relación fenotipo-genotipo y los datos encontrados se compararon con la literatura.

Los dos casos de pacientes con un cromosoma marcador supernumerario derivado del 15 se identificaron en la fase A del estudio a partir de los registros de resultados de cariotipo con bandas GTG y al análisis por FISH para confirmar que eran derivados del cromosoma 15. Se aplicaron los siguientes criterios de selección:

Criterios de inclusión:

Caso clínico con síndrome de invdup 15q.
Expediente clínico disponible.
Disponibilidad de los padres para participar en el estudio y muestras para estudio familiar.
Acepten la realización de otros estudios moleculares.

Criterios de Exclusión:

Expediente clínico no legible o no disponible.
Pacientes no localizados o que no deseen participar en el estudio.

Criterios de Eliminación:

Resultado con fórmula cromosómica no concluyente.

6 Resultados y discusión de la Fase A

6.1 Análisis estadístico.

Durante el periodo descrito se procesaron 7 693 muestras para cariotipo, de las cuales en 6 128 se obtuvo un resultado, de ellas 1 593 (25.99%) presentaron algún tipo de alteración cromosómica numérica o estructural (Figura 14).

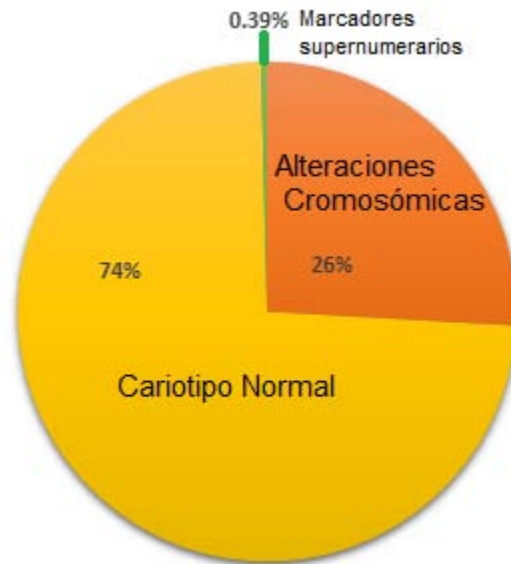


Figura 14. Frecuencia de aberraciones cromosómicas y cromosomas marcadores encontrada en los cariotipos reportados en el HIMFG en el periodo 2007-2016.

En el periodo de estudio se reportaron 24 casos de pacientes con cromosomas marcadores supernumerarios; Nueve de los casos fueron mosaicos (Tablas 5 y 6). En 15 casos fue posible realizar estudio familiar por cariotipo a los padres, en cuatro de los cuales solo se realizó estudio citogenético a la madre. En 10 casos se hizo análisis por FISH a los *propositus*. En relación a los 15 pacientes (15/24, 62.5%) con cromosomas marcadores supernumerarios no mosaico, en 11 de estos casos se realizó estudio familiar con cariotipo a los padres, siendo así identificados 9 casos de novo y 2 heredados de la madre (Tabla 5).

En los casos 1 y 2 se reportó que el marcador correspondió a una invdup15q y son los casos estudiados en la Fase B esta tesis. El caso 3 fue producto de t(3;9)mat. Los cromosomas marcadores supernumerarios de los casos 5 y 6 fueron derivados del cromosoma 22. El caso 10 presenta un derivado del cromosoma 15 de origen materno producto de una t(9;15)(q34;q15). En los casos 12, 13 y 14 el cromosoma marcador correspondió a un isocromosoma 18p.

Tabla 5. Pacientes con cromosoma marcador identificados en el periodo 2007-2016.

Caso	Diagnóstico Clínico	Cariotipo	Estudios complementarios
1	**Dismorfias faciales, retraso en el desarrollo psicomotor, hipotonía	47,XY,+mar [25]	FISH: nuc ish (CEP15,SNRPNX4) [200] 47,XY,+mar.ish der(15)(q13.1)(CEP15++,SNRPN+,SNRPN+,CEP15++,) [10] Madre: 46,XX [25]
2	**Dismorfias faciales, déficit Intelectual, microtia G I derecha	47,XY,+mar [25]	FISH: nuc ish (CEP15,SNRPNX4) [200] 47,XY,+mar.ish der(15)(q13.1)(CEP15++,SNRPN+,SNRPN+,CEP15++,) [10] Madre: 46,XX [25] Padre: 46,XY [25]
3	Déficit intelectual, cardiopatía compleja, LRDPM , HTAP ∞ .	47,XX, +mar[25]	Madre: 46,XX, t(3;9) (?;?) [25] Padre: 46,XY qh+ [25] FISH: 47,XX,+mar.ish der(22)(q11.2q11.2)(TUPLE1-)[10]
4	Discapacidad Intelectual, trastorno por déficit de atención e hiperactividad.	47, XY, +mar [25]	Madre: 46,XX[25]
5	Espectro oculo-arculo vertebral, microcefalia, LRDPM , laringomalacia.	1.- 47,XX,+mar [25] 2.-47,XX,+der(22)t(¿;22)(¿:q11)	
6	Cardiopatía congénita compleja, + MAR sin fístula, ~ADS.	47,XY,+mar	FISH: 47,XY,+der(22),t(11;22)(q23;q11.2).ish der(22)t(11;22)(q23;q11.2)(TUPLE1+)[10]
7	Discapacidad intelectual, talla alta, defecto del pigmento, escoliosis.	50,XX,+4mar [30]	
8	Pos-operado +MAR, transposición de grandes vasos, síndrome de Duane y Currarino.	47,XX,+mar [25]	Madre: 46,XX [25] Padre: 46,XY [25] FISH: Negativo para cromosomas 14,15 y 22. 47,XX,+mar.ish 14q11.2(TCRx2)[10] 47,XX,+mar.ish 15p11.2(CEPx2), 15q11.2(SNRPNx2)[10] 47,XX,+mar.ish 22q11.2q(TUPLE1x2)[10]
9	Hipoacusia bilateral profunda, insuficiencia velopalatina, nefrocalcinosis, J CIV.	46,XX,-22,+mar [25]	Madre: 46,XX [25] Padre: 46,XY[25]

*PCA: persistencia del conducto arterioso; +MAR: malformación anorrectal; ~ADS: Alteración en el desarrollo sexual; J CIV: comunicación intraventricular; LRDPM : retraso en el desarrollo psicomotor; ATR : acidosis tubular renal; Ω DDC: displasia en el desarrollo de la cadera. ** El caso 1 y 2 corresponden a las pacientes presentadas en esta tesis en la fase B.

Sondas FISH: CEP15: 15p11.2, SNRPN: 15q11.2, TUPLE1: 22q11.2, TCR: 14q11.2.

Tabla 5 (Continuación). Pacientes con cromosoma marcadores supernumerarios identificados en el periodo 2007-2016.

Caso	Diagnóstico Clínico	Cariotipo	Estudios complementarios
10	Paladar hendido, £RDPM, trastorno de la conducta.	47,XY,+mar [25] 47,XY,+der(15)t(9;15)(q34;q15)mat	Madre: 46,XX,t(9;15)(q34;q15) [25] Padre: 46,XY[25]
11	Genitales ambiguos, +MAR, pos-operado criptorquidia bilateral.	47,XY+mar [25]	Madre: 46,XX[25] Padre: 46,XY[25]
12	£RDPM, microcefalia, dismorfias faciales.	47,XY+mar [25]	Madre: 46,XX[25] Padre: 46,XY[25] FISH: 47,XY,+mar.ish i(18)(p10)(D18S552+,CEP18+, D18S552+)[10]
13	Dismorfias faciales, ¥ATR, Retardo en el crecimiento, microtia grado I bilateral	47,XY,+mar[25]	Madre: 46,XX [25] Padre: 46,XY,qh+[25] FISH: 47,XY,+mar.ish i(18)(p10)(D18S552+,CEP18+, D18S552+)[10]
14	£RDPM, microcefalia, micrognatia, ΩDDC.	47,XY,+mar[25]	FISH: 47,XY,+mar.ish i(18)(p10)(D18S552+,CEP18+, D18S552+)[10]
15	Síndrome dismórfico, £RDPM.	47,XX,+mar[25]	Madre: 46,XX [25] Padre: 47,XXX [25]

£RDPM: retraso en el desarrollo; +MAR: malformación anorectal; ¥ATR: acidosis tubular renal; Ω DDC: displasia en el desarrollo de la cadera.

Sondas FISH: CEP18: 18p11.1-q11.1, D18S552: 18p11.31.

Se reportaron 9 casos (9/24; 37.5%) correspondientes a cromosomas marcadores supernumerarios en mosaico (Tabla 6). En cuatro de estos casos se realizó estudio citogenético con bandas GTG a los padres, tres de ellos fueron identificados como de novo y uno tuvo origen materno que correspondió a una portadora de marcador supernumerario. En el caso 1 se identificó un isocromosoma 9p, en el caso 5 presentó un rearrreglo numérico tipo trisomía, adicional al cromosoma marcador supernumerario.

Tabla 6. Pacientes con cromosoma marcadores supernumerarios en mosaico identificados en el periodo 2007-2016.

Caso	Diagnóstico Clínico	Cariotipo	Estudios complementarios
1	Déficit intelectual, Síndrome de Brown, criptorquidia bilateral, nefrocalcinosis.	mos 47,XY,+mar [20]/46,XY[5]	Madre: 46,XX [25] Padre: 46,XY [25] FISH: 47,XY,+mar. ish i(9)(p10)(305J7-T7++) [10]
2	Déficit Intelectual, deformidad de la caja torácica, facies dismórfica.	mos 47,XY,+mar [16]/46,XY[44]	
3	Labio paladar hendido bilateral,*PCA, +MAR sin fistula.	mos 47,XY,+mar [1]/46,XY[49]	
4	Retraso global en el desarrollo, hipotiroidismo.	mos 47,XY,+mar [3]/ 46,XY[47]	
5	Trisomía 21.	mos 48,XY,+21, +mar[33]/ 47,XY,+21[17]	
6	Tetralogía de Fallot, Pos operado corrección total, válvula monocúspide, insuficiencia pulmonar.	mos 47,XY,+mar [47]/ 46,XY [57]	Madre: mos 47,XX,+mar[16]/46,XX[48]
7	Síndrome dismórfico, £RDPM, nefrocalcinosis ¥ATR, trastorno de la conducta	mos 47,XX,+mar [2]/ 46,XX[73]	
8	Talla baja, prematurez, retraso en el crecimiento intrauterino.	mos 47,XX,+mar [25]/46,XX[68]	Madre: 46,XX[25]
9	£RDPM, crisis convulsivas.	mos 47,XY,+mar [16]/ 46,XY[34]	Madre: 46,XX[25] Padre: 46,XY[25] FISH: 47,XX,+mar.ish 22q11.2 (TUPLE1x2)[10]

*PCA: persistencia del conducto arterioso; + MAR: malformación anorectal; £RDPM: retraso en el desarrollo psicomotor; ¥ATR: acidosis tubular renal. Sondas FISH: 305J7-T7: 9p24.3. TUPLE1: 22q11.2

6.2 Discusión de la Fase A

En el Departamento de Genética del HIMFG durante los 10 años del periodo de estudio se identificaron 24 reportes de pacientes con cromosomas marcadores supernumerarios (incluyendo los dos casos presentados en extenso en esta tesis), que corresponden al 0.39% de los reportes de cariotipo. En nueve (9/24, 37.5%) fueron en mosaico. De acuerdo a la literatura, los cromosomas marcadores son poco frecuentes y han sido reportados hasta en un 0.044% en la serie de pacientes reportada por Jang, et al., 2016 y la incidencia observada en este trabajo refleja que nuestra Institución es un centro de referencia para pacientes con posibles cromosopatías, siendo la causa más frecuente de consulta los defectos congénitos.

En 10 casos (10/24, 41.6%) se identificó el cromosoma del cual se originó el marcador. En 5 casos (5/10, 50%) el cromosoma marcador fueron derivados de acrocéntricos, esta frecuencia es mucho menor a la reportada en la literatura que es de 86% (Jafari Ghahfarokhi et al., 2015).

Como inicio del abordaje diagnóstico fue posible realizar estudio citogenético familiar a uno o a ambos padres en 15 casos. En los casos 1 y 4 (Tabla 5) y casos 6 y 8 (Tabla 6) se realizó estudio citogenético solo a la madre. A partir de ello se pudo determinar que dos marcadores eran resultado de la segregación 3:1 de una $t(3;9)(?;?)mat$ en el caso 3; y en el caso 10 de una $t(9;15)(q34;q15)mat$ (Tabla 5). Además, la madre del paciente del caso 6 (Tabla 6) presentó también un marcador supernumerario del que no fue posible identificar su origen. En el resto de los casos, (12/15, 80%), el marcador se produjo *de novo*. Este porcentaje fue similar a las reportadas en la literatura (70%) (Jafari Ghahfarokhi et al., 2015).

Se realizó análisis con FISH en 10 casos (10/24, 41.6%), se utilizaron sondas subteloméricas y centroméricas, se identificó el origen de 7 sSMC, los cuales resultaron derivados de los cromosomas 9, 15 (2 casos), 18 (tres casos) y 22. Se encontró que 3 casos (3/10, 30%) fueron derivados del 15, que es una frecuencia menor a la esperada en comparación a la reportada en la literatura (68%) (Jang et al., 2016). Se refiere que el 7-16% de los cromosomas marcadores son derivados de los cromosomas acrocéntricos 13, 14, 21 o 22 (Jafari Ghahfarokhi et al., 2015). Sin bien, la muestra en este estudio es pequeña, se identificaron 2 casos derivados del cromosoma 22, lo que representa el 40% de los casos de cromosomas marcadores derivados de acrocéntricos.

Fenotipos diversos han sido reportados en individuos con sSMC, incluidos el Síndrome de Cat-Eye (MIM # 115470) y el Síndrome de Emanuel (ES, MIM# 609029), los cuales se asocian con sSMC derivados del cromosoma 22 y corresponden aproximadamente al 9% de todos los casos de sSMC. El ES es causado por la segregación 3:1 de una $t(11;22)(q23;q11.2)$ balanceada en uno de los padres, con mayor frecuencia de origen materno (Jafari Ghahfarokhi, et al., 2015). Los casos 5 y 6 tenían un cromosoma 22 supernumerario; sin embargo, no se pudo realizar estudio citogenético a los padres y tampoco se delimitó la región involucrada en el cromosoma marcador del primer caso. En el caso 6 se confirmó mediante FISH con sonda TUPLE1 que el cromosoma marcador supernumerario es derivado del cromosoma 22. Sin embargo en ambos pacientes las características clínicas reportadas como el déficit intelectual y la cardiopatía son muy sugerentes del ES.

Los cromosomas marcadores derivados de los cromosomas no acrocéntricos comprenden alrededor del 40% de todos los marcadores supernumerarios; el riesgo de un fenotipo anormal asociado a ellos es cercano a 28% (Malvestiti et al., 2014). En nuestro estudio, cinco casos 5/10 (50%) se derivaron de cromosomas no acrocéntricos e incluían en sus características clínicas: retraso en desarrollo psicomotor, microcefalia, dismorfias faciales. En el caso 3, hemos considerado que el marcador supernumerario es derivado de la segregación 3:1 de una $t(3;9)(?:?)$ balanceada en la madre, clínicamente sana. Sin embargo, no se ha identificado los puntos de ruptura para poder realizar una correlación cariotipo-fenotipo.

Los cromosomas marcadores derivados de los autosomas no acrocéntricos como los cromosomas 6, 9, 16 y 19 son muy raros (0.6-1.4%) y el fenotipo asociado con cada marcador no está bien establecido (Malvestiti, et al, 2014). En el caso 1 (Tabla 6) en donde el cromosoma marcador fue un isocromosoma de 9p en mosaico, el paciente presentó síndrome por tetrasomía 9p. Esta entidad se ha descrito con características faciales propias y complicaciones clínicas frecuentes (Jafari Ghahfarokhi et al., 2015), que estuvieron presentes en nuestro paciente como: el déficit intelectual y las alteraciones oftalmológicas y urogenitales. Los casos reportados en la literatura mostraron un mayor porcentaje de la línea con tetrasomía 9p en el mosaico (Khattabi, et al., 2015), al igual que lo que observamos en nuestro paciente, lo que podría explicar la variabilidad en el fenotipo.

Sólo hay unos pocos síndromes clínicos bien establecidos asociados con sSMC procedentes de los cromosomas 12 y 18 (Jafari Ghahfarokhi, et al, 2015). En nuestro estudio se reportaron 3 casos con isocromosoma 18p que representan el 30% de los marcadores en los que pudo establecerse su origen. El $i(18p)$ se ha reportado como el más frecuente dentro del grupo de los isocromosomas y se asocia a características clínicas como: déficit intelectual de moderado a profunda, microcefalia, hipertoniá y dismorfias faciales peculiares, entre otras. Se ha visto que el síndrome de $i(18p)$ ocurre *de novo* en la mayoría de casos, nuestros casos fueron

reportados sin mosaico y el fenotipo corresponde con lo reportado en la literatura (Plaiasu, Ochiana, Motei, & Georgescu, 2011).

Una de las limitaciones de este estudio fue no contar con cariotipo molecular por microarreglos con el que se sabría el punto de ruptura exacto y los genes que se perdieron o duplicaron en las regiones cromosómicas de interés. Un ejemplo es el caso 8 (Tabla 5), en el cual aunque se realizó estudio familiar y se aplicaron varias sondas de FISH en base a la frecuencia reportada en la literatura, incluyendo los cromosomas 14,15 y 22 no fue posible determinar su origen.

Las manifestaciones clínicas de la mayoría de los cromosomas marcadores son muy variables, dependen de su origen, tamaño, contenido de eucromatina, co-ocurrencia de disomía uniparental y prevalencia de la línea aneuploide en los casos en mosaico. Por lo tanto, la clínica, manejo y asesoramiento genético dependen de las características de los cromosomas marcadores y del origen parental. En diagnóstico prenatal, se considera que es poco frecuente el incremento en el riesgo de anomalías fetales si el marcador detectado en el embarazo ha sido heredado de un padre con fenotipo normal. (Chen CP, 2016)

En este sentido, la citogenética molecular en combinación con la citogenética con técnicas de bandas G puede proporcionar información precisa de los puntos de ruptura de los cromosomas marcadores y una delineación de las regiones cromosómicas implicadas, así como de la cantidad y tipo de material genético que se encuentra en el marcador. En un estudio reportado por Jang, et al, 2016, de 14 casos de cromosomas marcadores supernumerarios, se demostró que la aplicación de técnicas citogenéticas y moleculares es una estrategia práctica y eficiente que permite la caracterización directa y precisa de los casos de sSMC.

Desarrollo psicomotor: sonrisa social a los 3 meses, fijación de la mirada a los 4 meses, sostén cefálico a los 10 meses, sedestación con apoyo a los 11 meses, caminó con apoyo a los 18 meses, balbuceó 7 meses, bisílabos 1 año 8 meses. Actualmente presenta retardo en el lenguaje, también presenta trastorno de la conducta y agresividad.

Exploración Física: Al 3 años 4 meses presentó un peso de 12 kg (<p3), talla: 90 cm (<p3), perímetro cefálico: 48cm (<p10-25). Activo, reactivo, cooperador, tendencia a la dolicocefalia, aplasia cutis en región occipital de 1.5 cm, telecanto, epicanto bilateral, fisuras palpebrales horizontales, puente nasal ancho, paladar alto, íntegro, pabellón auricular de implantación limítrofe hélix plegado, cardiopulmonar ruidos cardíacos sincrónicos, genitales fenotípicamente masculinos, tanner 1, extremidades íntegras, eutróficas, miembros inferiores con clinodactilia del 5º orjejo bilateral. El fenotipo del paciente se muestra en la figura 15, fotografías tomadas con consentimiento informado (Anexo I)



Figura 16. Fotografías clínicas del paciente 1 tomadas a la edad de 3 años 4 meses. **A** epicanto, telecanto, base nasal ancha. **B** Helix plegado, pabellón auricular de implantación limítrofe. **C** aplasia cutis. **D** Clinodactilia del 5to dedo bilateral.

El abordaje multidisciplinario del paciente incluyó: a los 10 meses de edad se realizó resonancia magnética simple cráneo que demostró espacios subaracnoideos amplios con predominio en la convexidad, además la prueba de Battelle para evaluación de neurodesarrollo obtuvo un cociente total del desarrollo de 66 lo que corresponde a retraso significativo del desarrollo.

Por parte del servicio de Neurocirugía a la edad de 11 meses reportó electroencefalograma con disfunción subcortical de predominio fronto-temporal bilateral y Tomografía Axial Computarizada craneal sin cierre de suturas sagital y coronal, aplanamiento posicional parieto-occipital izquierdo, aumento de volumen de surcos y cisuras encefálicas que denotan atrofia, los cuales descartaron la plagiocefalia.

Resultados de los estudios citogenéticos y moleculares

Dadas las características clínicas se indicó cariotipo con bandas GTG en sangre periférica al paciente (previo consentimiento informado que se encuentra en el Anexo II), el resultado del mismo fue (Figura 17):

47,XY,+mar[25]

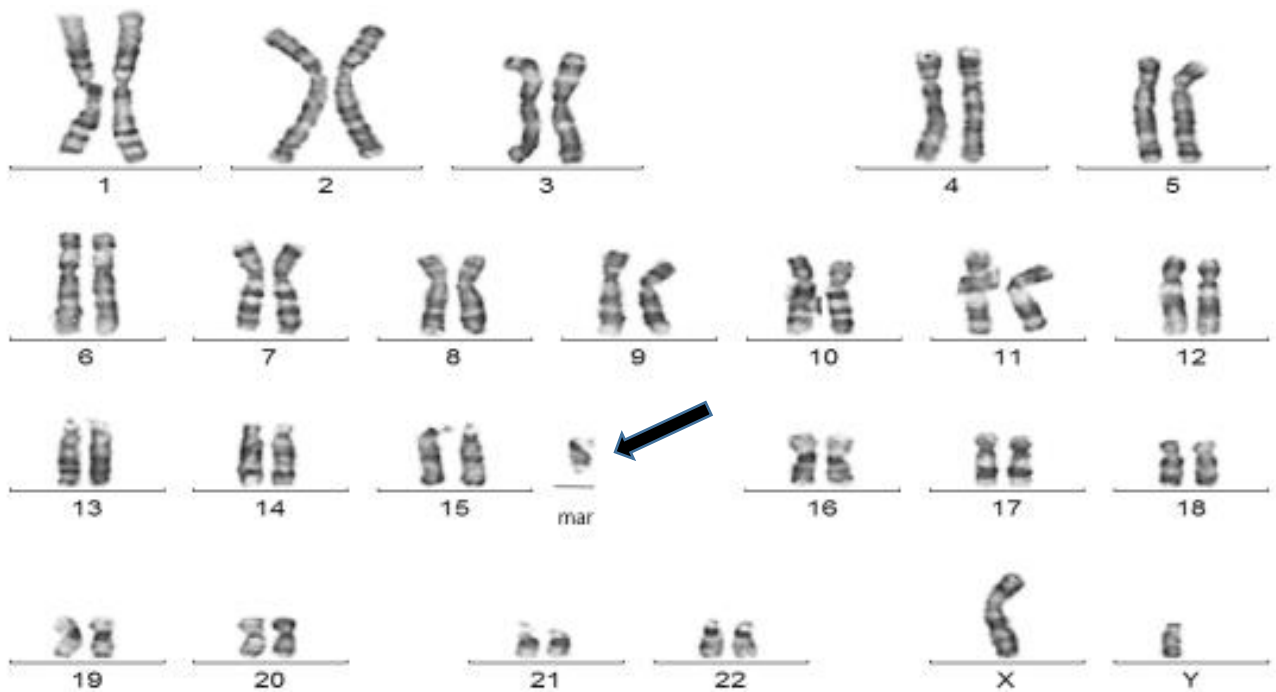


Figura 17. Cariotipo en sangre periférica con bandas GTG del *propóitus*. La flecha indica el cromosoma marcador supernumerario (Q.F.B Ana Yolotl Aparicio Onofre., Lab. Citogenética Depto. de Genética, HIMFG).

Se solicitó cariotipo a los padres, pero solo fue posible realizarlo a la madre, con resultado 46, XX [25]. Dado que el cromosoma marcador del paciente era bisatelitado se decidió realizar FISH con la sonda comercial para la región SPW/SA que incluye sondas para: CEP15, SNRPN(15q11-q13) y PML(15q22) (Vysis de Abbott, Abbott Park, Illinois, U.S.A.) con el siguiente resultado:

nuc ish (CEP15,SNRPN X4) [200], lo que demostró una tetrasomía 15q proximal que incluye a la región de SPW/SA

47,XY,+mar.ish der(15)(q13.1)(CEP15+, SNRPN+, SNRPN+, CEP15+) [10] (Figura 18).

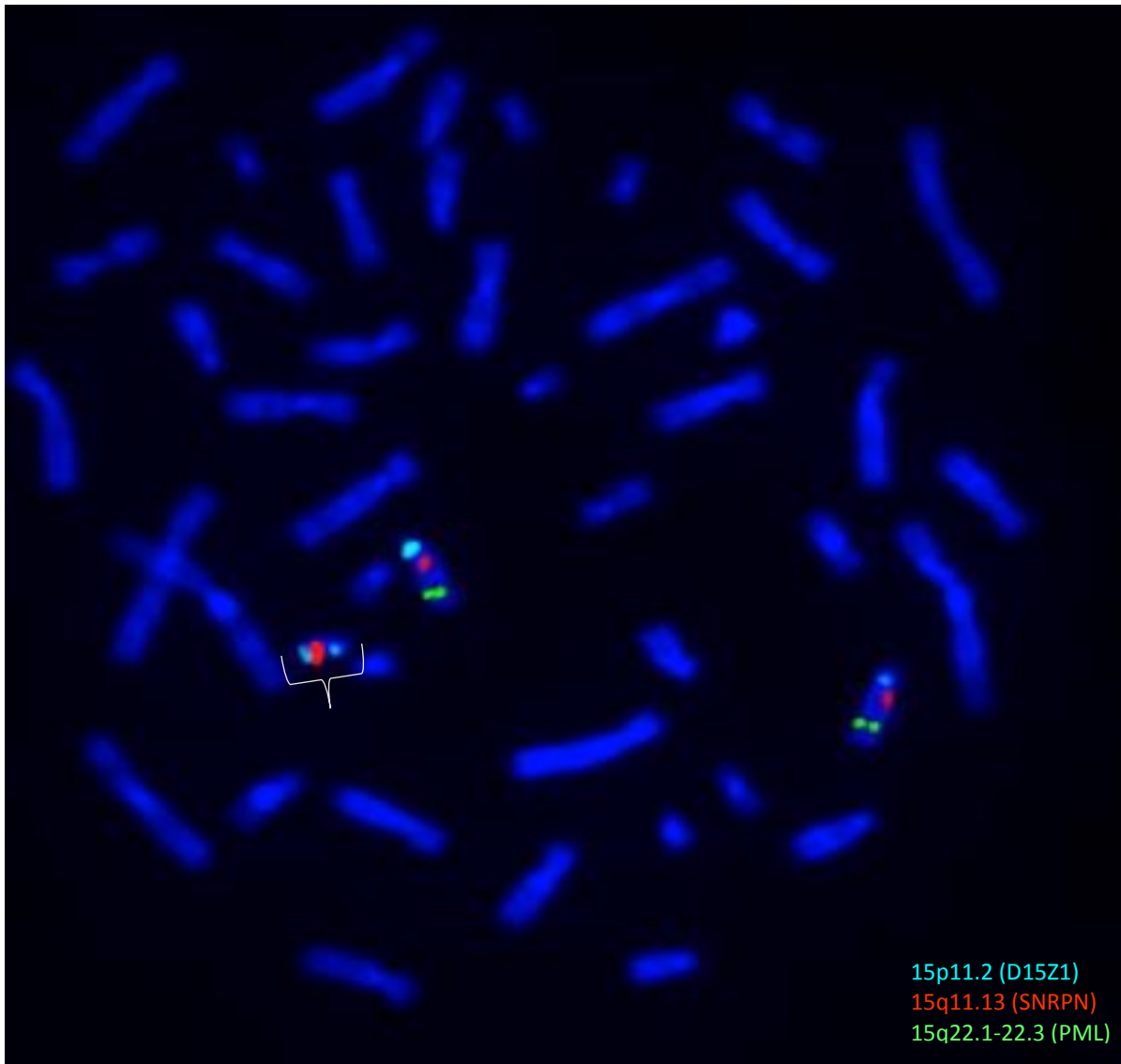


Figura 18. Análisis por FISH con sonda centromérica y subtelomérica. Se indican las sondas empleadas y sus colores correspondientes. El corchete en blanco señala la invdup15q y se observan los cromosomas 15 normales. (Biol. Ariadna Berenice Morales Jiménez, Lab. Citogenética, Depto. de Genética, HIMFG).

Se realizó estudio molecular por MS-MLPA (MCR-Holland, Amsterdam, the Netherlands) de la región genómica 15q11-q13, para el análisis de la dosis génica y estado de metilación del DNA, lo que permitió confirmar la región implicada y ver el patrón de impronta del marcador (Laboratorio Genos Médica, Anexo V. En la Tabla 7 se muestran los resultados obtenidos en este estudio.

Tabla 7. Patrón esperado de dosis génica y estado de metilación del DNA en la región 15q11-q13 y patrón de metilación de *propositus*.

Sondas Metilación		Sondas Control	Patrón Normal		Paciente	
Tamaño (nucléido)	Posición	Marcador	% Dosis	% Metilación	% Dosis	% Metilación
142	Isla CpG (PWS-SRO)	<i>SNRPN</i>	100	50	200	75
178	Isla CpG (PWS-SRO)	<i>SNRPN</i>	100	50	200	80
184	Exón 1	<i>UBE3A</i>	100	0	200	0
190	Isla CpG (PWS-SRO)	<i>SNRPN</i>	100	50	200	85%
250	Isla CpG (PWS-SRO)	<i>SNRPN</i>	100	50	200	80%
328	SNORD116 snoRNA	<i>SNRPN</i>	100	85-100	200	85%
346	15q26	Control de digestión	100	0	100	0
419	15q11.2	<i>NDN</i>	100	30-50	200	60
463	3p22	Control de digestión	100	0	100	0

Se detectó una ganancia de dosis y metilación en los *loci* correspondientes a los genes *SNRPN* y *NDN*, comparada con el patrón esperado para individuos sin alteraciones de dosis o metilación en la región 15q11q13.1. Además se observa un aumento en la dosis en el gen *UBE3A* (Tabla 7).

Este resultado es esperado para aquellos individuos que presentan dos copias adicionales con patrón materno de metilación de la región 15q11.2-q13.1 (Figuras 19 y 20).

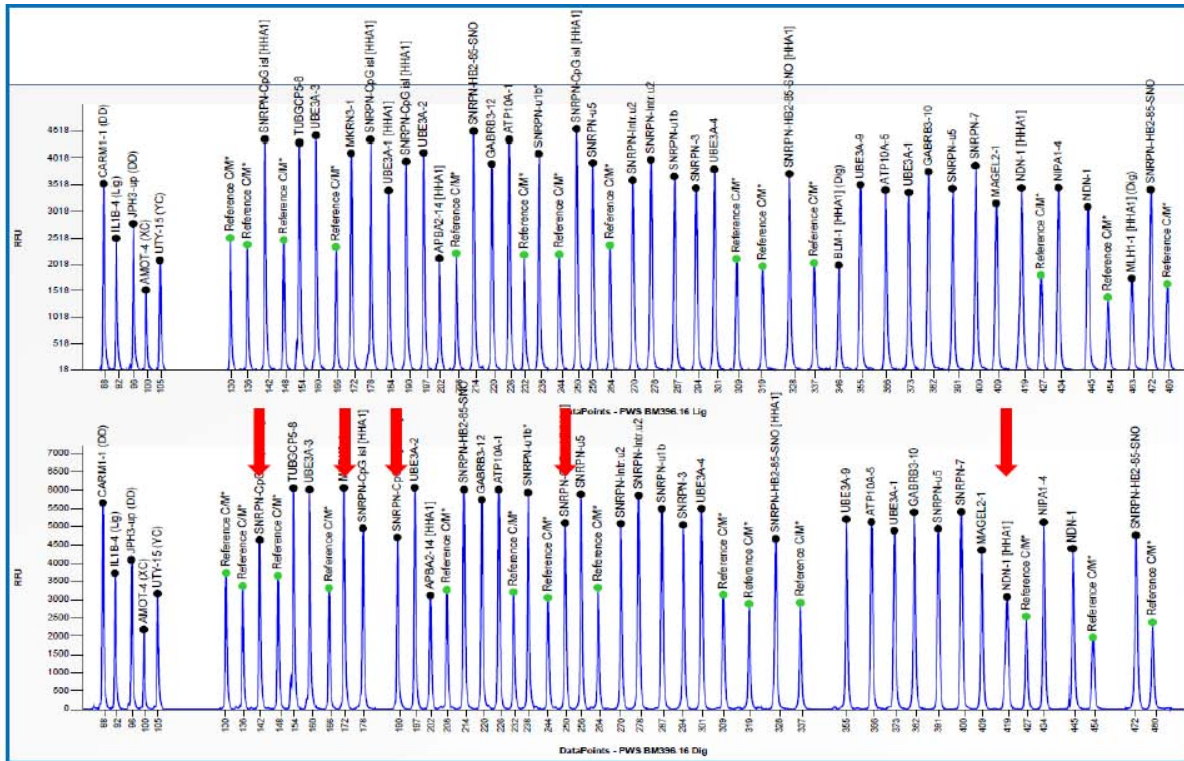


Figura 19. Electroferograma de la electroforesis en capilar del estudio de MS-MLPA. En panel superior se muestran las regiones amplificadas del paciente y sus referencias. En el panel inferior, las flechas rojas indican las sondas digeridas por la enzima de restricción. (Laboratorio Genos-médica)

En panel superior se muestra patrón de amplificación de las sondas en el paciente y las referencias internas, donde se observa una duplicación de la señal para las sondas dirigidas a la región 15q11.2-q13.1. En panel inferior muestra el patrón de restricción posterior a la digestión con enzima *HhaI*; las flechas en rojo indican las sondas parcialmente digeridas (25%) por la enzima (142, 178, 190, 250 y 419), revelando una ganancia de metilación para los loci con impronta materna.

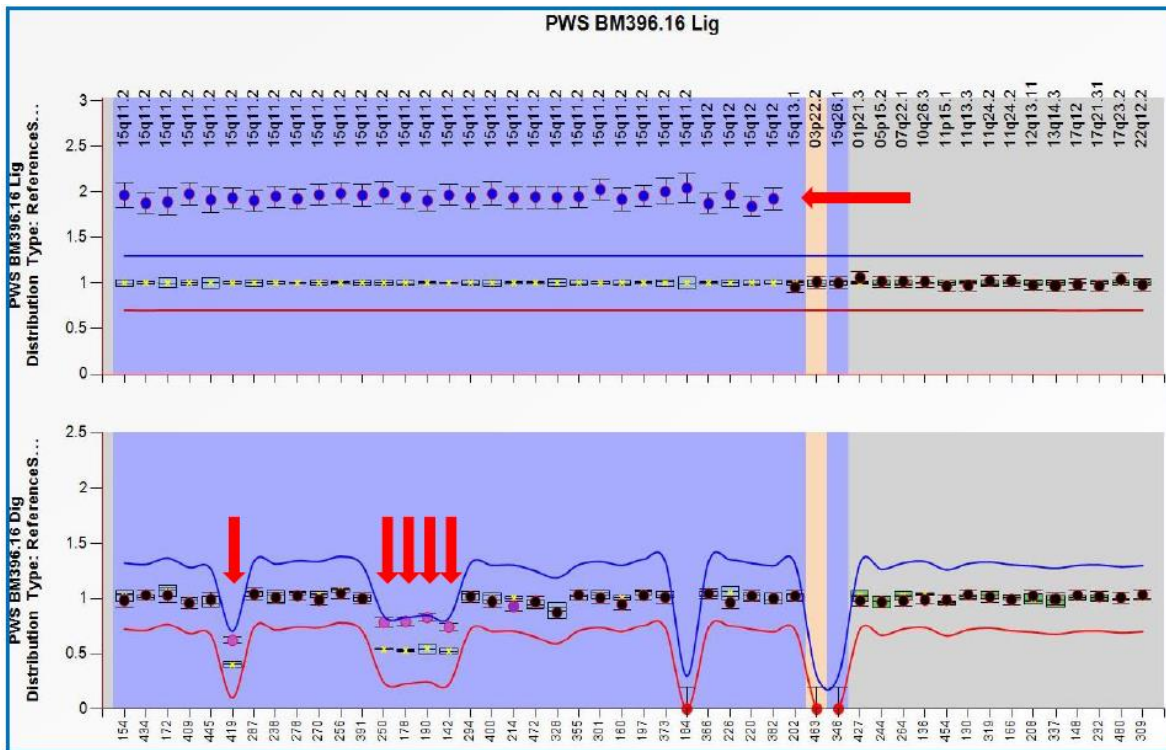


Figura 20. Análisis comparativo en la región 15q11-q13. En la parte superior se observa duplicación de la señal en la región 15q11.2-15q13.1. Y en la parte inferior las flechas rojas muestran una ganancia de metilación en los *loci* con impronta materna (Laboratorio Genos- Médica).

De manera conjunta podemos recalcar que en la figura 19, en el panel superior se observa el patrón de amplificación de las sondas en el paciente y las referencias internas, la flecha roja indica una duplicación de la señal para las sondas dirigidas con la enzima de restricción a la región 15q11.2-q13.1. En el panel inferior se observa un patrón de restricción posterior a la digestión con enzima *HhaI*; revelando una ganancia de metilación para los *loci* con impronta materna.

7.2 Caso clínico 2

El *propositus* es un paciente masculino de 16 años 4 meses (Figura 11, individuo III-V), conocido por primera vez en la institución a la edad de 6 años por la consulta externa de Otorrinolaringología por retraso en el desarrollo psicomotor, malformación en pabellón auricular e hipoacusia derecha. Conocido en la consulta de Genética a la edad de 12 años 8 meses.

Antecedentes heredofamiliares: producto de la segunda gestación de madre de 27 años y padre de 25 años a la concepción, aparentemente sanos, no consanguíneos (Figura 21).

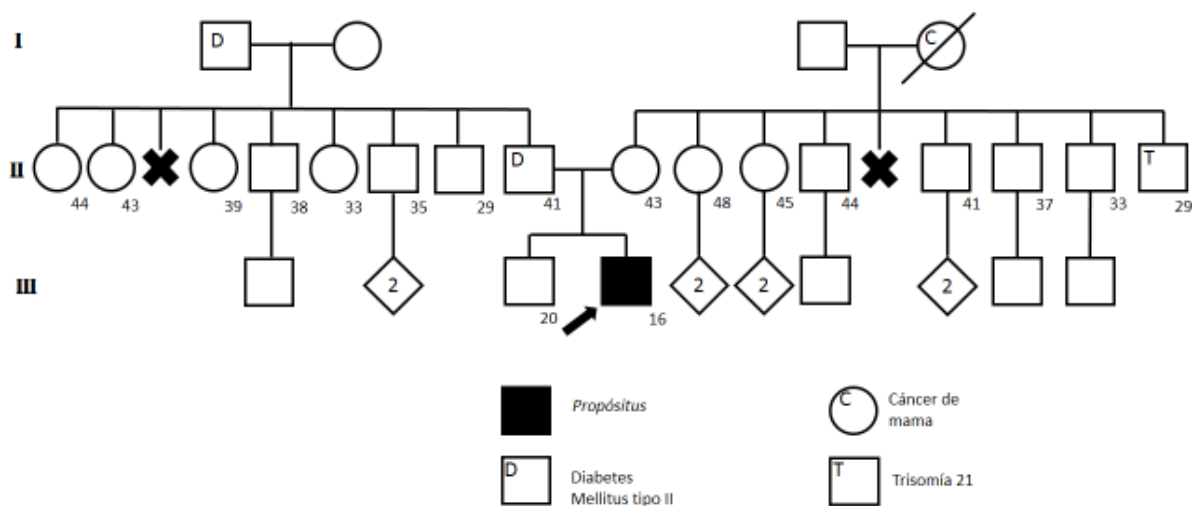


Figura 21. Árbol genealógico del caso 2.

Antecedentes perinatales: embarazo de 33 semanas de gestación, normoevolutivo, obtenido por vía vaginal parto distócico por uso de fórceps, peso al nacimiento 2750 gr(p25), talla 51 cm(p25), APGAR 8/9.

Desarrollo psicomotor: sostén cefálico a los 8 meses, sonrisa social a los 8 meses, sedestación al 1 año 6 meses, bidepestando a los 2 años 6 meses, deambulación a los 3 años, lenguaje con bisílabos a los 3 años, con retraso en el lenguaje (pronuncia 3 palabras) edad, control de esfínteres a los 5 años, actualmente acude a escuela especial.

Antecedentes personales patológicos: se inició abordaje multidisciplinario por el servicio de neurología a la edad de 6 años 5 meses, por presentar desde los 6 años de edad inicio de conductas auto-agresivas y estereotipias, irritable, no obedece órdenes y presenta incoordinación motriz gruesa y fina.

Se realizó electroencefalograma con reporte anormal por leve actividad epiléptica temporal izquierda y posteriormente se realizó resonancia magnética de encéfalo (6 años 9 meses) con reporte normal, con diagnóstico de epilepsia parcial sintomática, trastorno hiperquinético y discapacidad intelectual moderada. Se inició tratamiento antiepiléptico.

Se realizó estudio audiológico a los 7 años 10 meses, donde se reporta audición normal izquierda e hipoacusia superficial derecha.

Nefrología: a los 9 años de edad inició tratamiento con citratos por acidosis tubular renal, se realizó ultrasonido renal (10 años) que mostró un sistema colector izquierdo doble. Con posterior reporte de Urografía excretora de pelvis renal izquierda bífida, se descarta doble sistema colector. Resume los hallazgos a lo que realmente tiene el paciente

Fue referido al departamento de Genética por probable macroorquidismo y sospecha de Síndrome de X frágil, se solicitó ultrasonido testicular con reporte normal por el cual se descartó éste diagnóstico se decidió realizar abordaje genético con estudios moleculares. Se integraron los siguientes diagnósticos: Déficit Intelectual moderado, microtia grado I derecha con hipoacusia superficial, trastorno de la conducta, epilepsia parcial sintomática, pelvis renal izquierda bífida, antecedente de acidosis tubular renal.

Exploración Física a los 16 años 3 meses de edad: peso de 41 kg (p25), talla: 155 cm (p<3), perímetro cefálico: 56 cm (p50). Paciente activo, reactivo, cooperador, cráneo con tendencia a la dolicocefalia, telecanto, epicanto bilateral, fisuras palpebrales horizontales, puente nasal ancho, narinas levemente antevertidas, paladar alto íntegro. Microtia grado I derecha, genitales fenotípicamente masculinos, Tanner 4, extremidades con hiperpigmentación en codos. El fenotipo del paciente se muestra en la Figura 22, fotografías tomadas con consentimiento informado (Anexo I).



Figura 22. Fotografías clínicas del paciente 2. A. se observa el epicanto, telecanto, base nasal ancha, y contacto visual pobre B. microtia Gl. C. Hiperpigmentación en codos. D. Clinodactilia y dermatosis en manos.

Resultados de los estudios citogenéticos y moleculares

Se indicó estudio citogenético con técnica de bandas GTG, previo consentimiento informado (Anexo II), en el cual se identificó el siguiente complemento cromosómico (Figura 23):

47,XY + mar

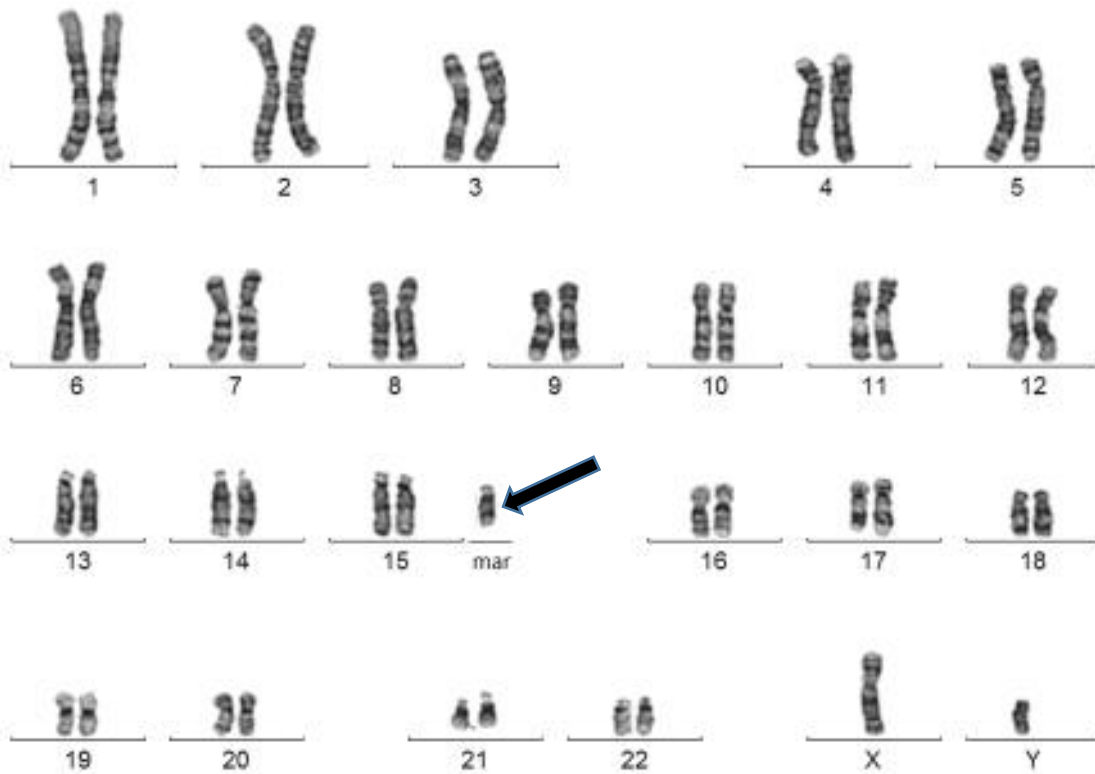


Figura 23. Cariotipo en sangre periférica con bandas GTG del *propóritus*. La flecha señala el cromosoma marcador supernumerario (Biol. Ariadna Berenice Morales Jiménez, Lab. de Citogenética, Depto. de Genética, HIMFG).

El estudio citogenético con bandas GTG en sangre periférica de los padres se reportó normal en ambos.

Por tratarse de un cromosoma marcador bisatelitado se decidió realizar al paciente estudio por FISH con la sonda para la región SPW/SA (CEP15, SNRPN 15q11-q13 y PML 15q22) (Vysis de Abbott, Abbott Park, Illinois, U.S.A) con resultado:

nuc ish (CEP15,SNRPNX4)[200] lo que demostró una tetrasomía 15q proximal que incluye a la región de SPW/SA.

47,XY,+mar.ish der(15)(q13.1)(CEP15+, SNRPN+, SNRPN+, CEP15+) [10] (Figura 24).

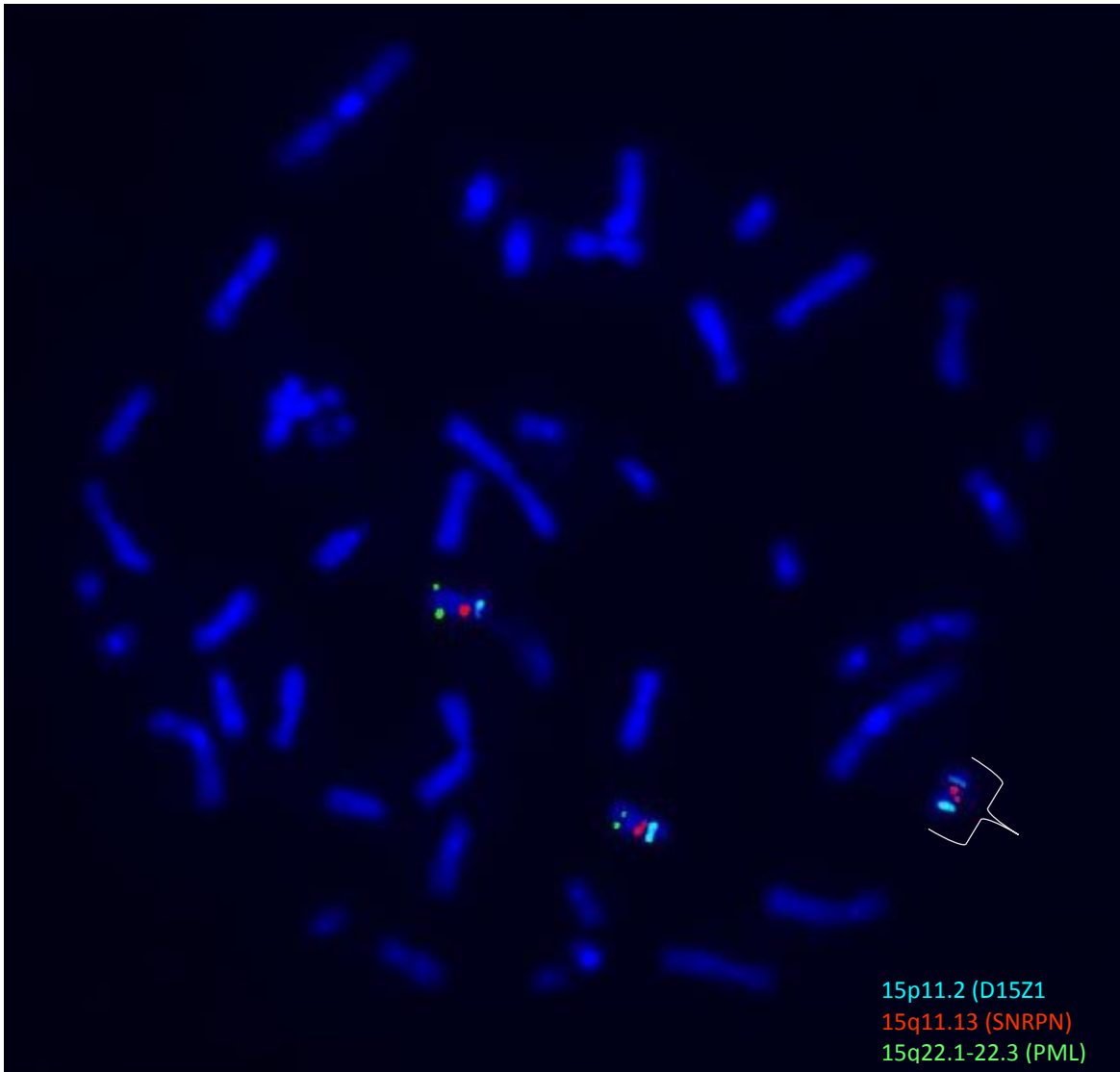


Figura 24. Análisis por FISH con sonda centromérica y subtelomérica. Se indican las sondas empleadas y sus colores correspondientes. El corchete en blanco señala la invdup15q. (Biol. Ariadna Berenice Morales Jiménez, Lab. Citogenética, Depto. de Genética, HIMFG).

Se realizó estudio molecular de MS-MLPA (MCR-Holland, Amsterdam, the Netherlands) de la región genómica 15q11-q13.1, para el análisis de la dosis génica y estado de metilación del DNA (Tabla 8).

Tabla 8. Patrón esperado de dosis génica y estado de metilación en la región 15q11-q13.1 y patrón de metilación en *propositus*.

Sondas Metilación		Sondas Control	Patrón Normal		Paciente	
Tamaño (nuclétido)	Posición	Marcador	% Dosis	% Metilación	% Dosis	% Metilación
142	Isla CpG (PWS-SRO)	<i>SNRPN</i>	100	50	200	75
178	Isla CpG (PWS-SRO)	<i>SNRPN</i>	100	50	200	80
184	Exón 1	<i>UBE3A</i>	100	0	200	0
190	Isla CpG (PWS-SRO)	<i>SNRPN</i>	100	50	200	85%
250	Isla CpG (PWS-SRO)	<i>SNRPN</i>	100	50	200	80%
328	SNORD116 snoRNA	<i>SNRPN</i>	100	85-100	200	85%
346	15q26	Control de digestión	100	0	100	0
419	15q11.2	<i>NDN</i>	100	30-50	200	60
463	3p22	Control de digestión	100	0	100	0

El análisis molecular del paciente fue compatible con una tetrasomía de la región 15q11.2 a 15q13.1 (BP1-BP3), indicada por una duplicación en la intensidad de señal de las sondas dirigidas a dicha región, en comparación con las muestras control y las sondas de referencia interna (Tabla 8).

De manera conjunta, se detectó una ganancia de metilación en el *loci* correspondiente a los genes *SNRPN* y *NDN*, comparada con el patrón esperado para individuos sin alteraciones de dosis o metilación en la región 15q11-q13. Este resultado es esperado para aquellos individuos que presentan dos copias maternas adicionales de la región 15q11.2-q13.1 (Figuras 25 y 26).

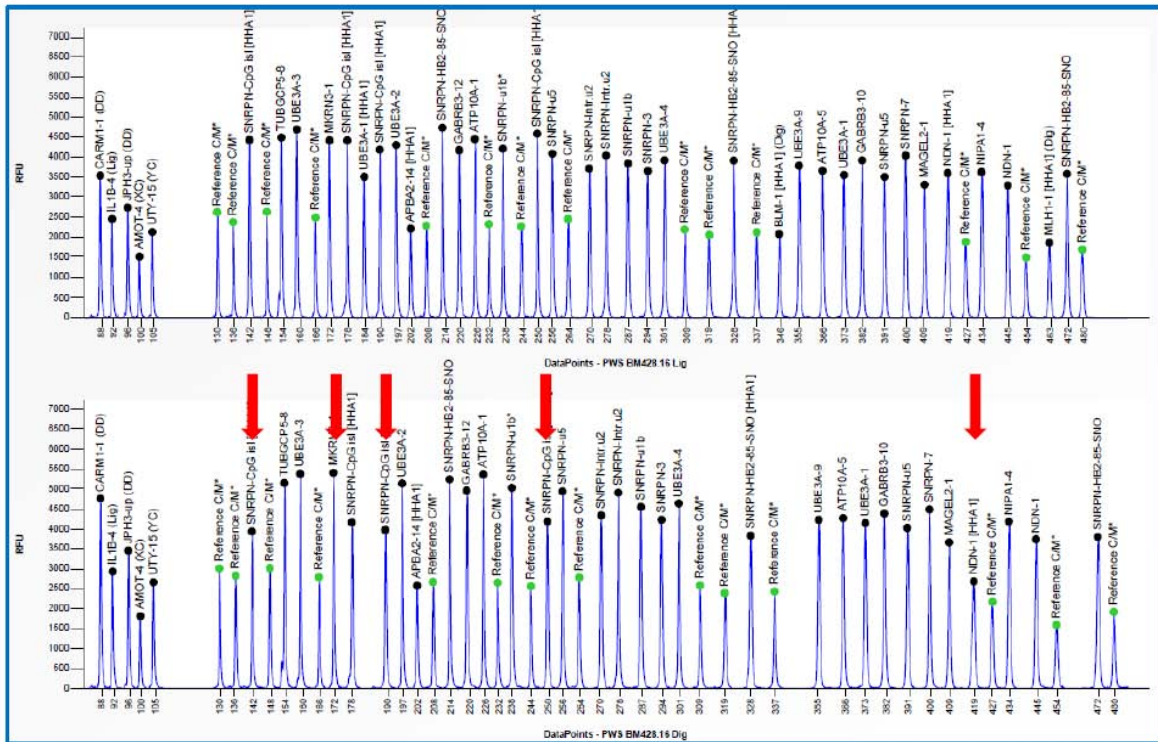


Figura 25 Electroferograma de la electroforesis en capilar del estudio de MS-MLPA. En panel superior se muestran las regiones amplificadas del paciente y sus referencias. En el panel inferior, las flechas rojas indican las sondas digeridas por la enzima de restricción. (Laboratorio Genos-médica)

En panel superior se muestra patrón de amplificación de las sondas en el paciente y las referencias internas, donde se observa una duplicación de la señal para las sondas dirigidas 15q11.2-q13.1. En panel inferior patrón de restricción posterior a la digestión con enzima *HhaI*; las flechas en rojo indican las sondas parcialmente digeridas (25%) por la enzima (142, 178, 190, 250 y 419), revelando una ganancia de metilación para los loci.

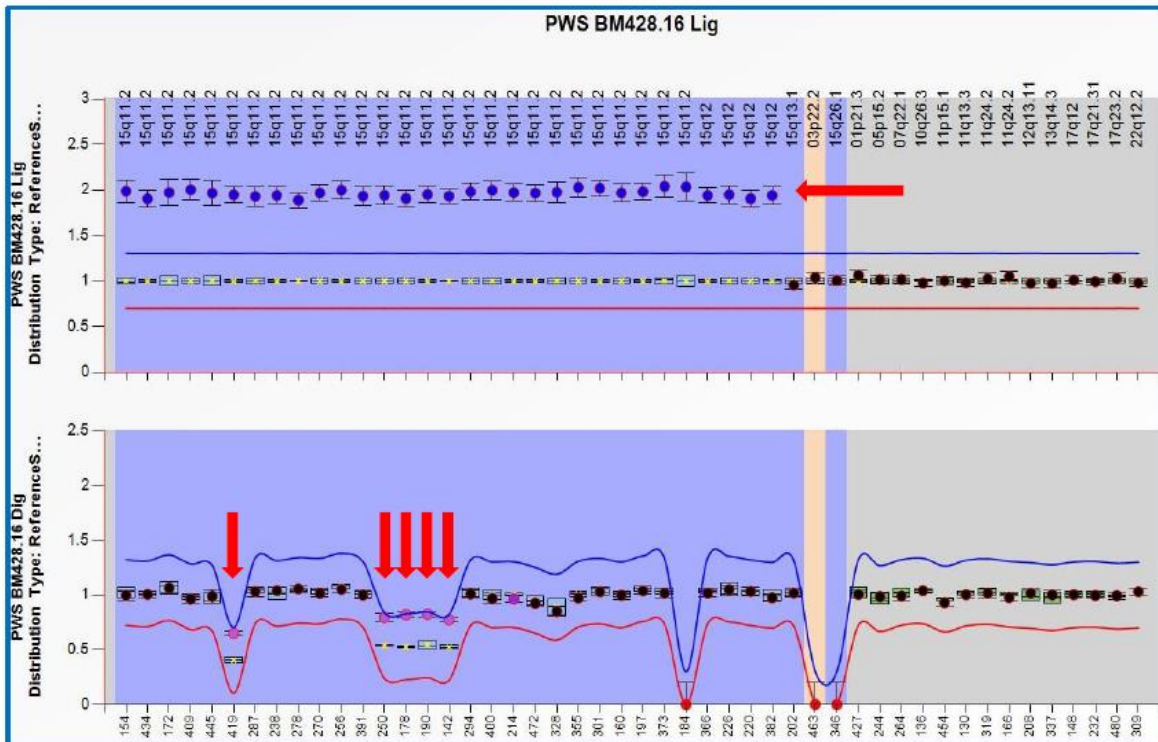


Figura 26 Análisis comparativo en la región 15q11-q13. En la parte superior se observa duplicación de la señal en la región 15q11.2-15q12. Y en la parte inferior las flechas rojas muestran una ganancia de metilación en los *loci* con impronta materna (Laboratorio Genos- Médica).

En el panel superior se observa el patrón de amplificación de las sondas en el paciente y las referencias internas, la flecha roja indica una duplicación de la señal para las sondas dirigidas a la región 15q11.2-q13.1.

En el panel inferior se observa un patrón de restricción posterior a la digestión con enzima *Hha*1; lo que revela una ganancia de metilación para los *loci* con impronta materna.

7.3 Discusión de la Fase B

En este trabajo se incluyó a 2 pacientes masculinos con diagnóstico de dismorfias menores, hipotonía y retraso del desarrollo psicomotor (caso 1) y del déficit intelectual (caso 2), en ambos pacientes se diagnosticó síndrome idic15q ó tetrasomía 15q. En el caso 1, el paciente fue conocido a los 10 meses de edad por presentar retraso en el desarrollo psicomotor, antecedente de hipotonía y dismorfias menores. El caso clínico 2 concierne a un paciente del sexo masculino que acudió por primera vez a la consulta externa de Genética a la edad de 6 años, por antecedente de retraso en el desarrollo psicomotor, trastorno de la conducta y microtia grado I derecha, Estas características son indicaciones para realizar estudio citogenético en ambos casos. (Jafari Ghahfarokhi, et al., 2015) (Galán, 2010).

En el cariotipo se reportó la presencia de un cromosoma marcador supernumerario, en estos casos se debe descartar que se trate de un cambio originado por una alteración cromosómica balanceada en alguno de los padres o se trate de un cambio *de novo*. El cariotipo solo pudo realizarse a la madre (caso1) y en ambos padres (caso 2) con resultado normal. El análisis de FISH con sondas PW/AS (CEP15, SNRPN: 15q11-q13 y PML: 15q22) compatible con tetrasomía de dicha región. Se concluyó que los *propositus* presentaron un cromosoma marcador supernumerario con inversión duplicación de la región 15q11-q13.1, por lo tanto la alteración se presentó *de novo* en ambos pacientes, una situación que se ha reportado hasta en el 70% de los casos de marcadores cromosómicos (Jafari-Ghahfarokhi, et al., 2015).

Dicha región tiene características particulares ya que se trata de una región rica en genes, en la que se han descrito puntos de ruptura recurrentes. Esto se debe a su conformación molecular en relación a la presencia de secuencias repetidas (Coppola et al., 2013). Además de lo anterior, en esta región existe regulación de la expresión génica por la presencia del centro de control de la impronta o ICR, por lo que es importante determinar el origen parental del marcador supernumerario.

Ante ésta situación, se realizó estudio molecular de tipo MS-MLPA a ambos pacientes, que resultó compatible con tetrasomía 15q11.2-15q13.1, ya que las sondas (*NIPA1*, *MAGEL2*, *MKRN3*, *NDN*, *SNRPN-SNURF*, *UBE3A*, *ATP10A*, *GABR3G3*) utilizadas en el estudio (Figura 19, caso 1; Figura 25, caso 2) se encuentran en dicha región. Por lo que se sugiere que el punto de ruptura de dichos marcadores es BP3:BP3. Este punto de ruptura es el más frecuente encontrado en los casos con marcador cromosómico supernumerario, con características clínicas particulares como lo reporta Algeeli et al., 2013. Además con el estudio también se determinó la ganancia de metilación en los genes *SNRPN* y *NDN*, correspondientes a la región

15q11.2-q13.1 con impronta materna. Lo que indica la presencia de dos copias adicionales de la región 15q11.2-q13.1 con impronta materna.

Se realizó el análisis de la relación fenotipo-genotipo de nuestros pacientes comparándolos con los de pacientes con invdup15q11-q13 de origen materno, reportados en la literatura (Tabla 9). En este análisis fueron incluidos en total 34 pacientes, los cuales tenían el diagnóstico confirmado de síndrome de invdup15q11-q13 de origen materno mediante diferentes técnicas citogenéticas moleculares (Bassecourt, et al., 2011), (Galizia et al., 2012), (Al Ageeli, et al., 2013) (Aypar U, 2014) (Szabo A. et al., 2015).

Además de estos estudios en donde se identificó el origen parental, existen diversas publicaciones desde 1970 hasta las consideradas en la Tabla 9 en donde se refiere un total de aproximadamente 200 pacientes con este diagnóstico pero no se conoce en todos el origen parental. Por esta razón no sería posible compararlos entre ellos directamente debido a las modificaciones en el fenotipo ocasionados por la impronta de la región. Estas fuentes nos demuestran que si bien no existe una estadística específica sobre la frecuencia de esta alteración, se trata de un evento poco frecuente, por lo que nuestros pacientes amplían el conocimiento de esta patología. Además se resalta la importancia en la aplicación de las indicaciones de cariotipo, de manera particular las que consideran a las malformaciones mayores y el retraso en el desarrollo psicomotor en pacientes que no cuentan con un diagnóstico definido. El resultado del cariotipo nos orienta a utilizar un algoritmo diagnóstico.

El fenotipo del síndrome de inversión duplicación 15q11-q13 resultante de un cromosoma marcador supernumerario es muy variable y no presenta características dismórficas específicas (Battaglia, et al., 2010). Sin embargo, esta alteración se ha reportado como el cromosoma marcador más frecuente derivado de los cromosomas acrocéntricos presente en hasta el 65% de los casos. (Liehr, et al., 2013). En casos de déficit intelectual estas alteraciones pueden estar presentes en hasta el 0.288% de los casos (Jafari-Ghahfarokhi, et al., 2015). Fue posible considerar este diagnóstico, en primera instancia a partir de los resultados de los análisis cromosómicos por bandas GTG en nuestros 2 pacientes que además fueron confirmados por FISH.

La variabilidad fenotípica es evidente en pacientes portadores de cromosomas supernumerarios isodicéntricos 15 de origen materno. Han sido reportados pacientes con características clínicas similares a las que tienen los individuos con duplicaciones intersticiales maternas de la misma región, pero con una mayor gravedad (Al Ageeli et al., 2013). Las malformaciones mayores y las características dismórficas no suelen ser parte prominente del cuadro clínico pero son datos que ameritan que el paciente sea evaluado de manera interdisciplinaria para establecer diagnóstico y a su vez manejo y asesoramiento genético (Battaglia, et al., 2016).

En relación al género, como se observa en la Tabla 9, se ha descrito una relación mayor de pacientes masculinos (20/34, 58%) en relación al sexo femenino en (14/34, 42%), por lo que existe una discreta preferencia hacia el sexo masculino (Tabla 9) (Aypar U, 2014). Esta preferencia en relación a la afectación por género, se corrobora ya que en nuestro caso ambos afectados son masculinos si bien se debe tomar en cuenta que se trata de una muestra de solo dos pacientes.

Tabla 9. Características clínicas de pacientes con invdup 15q11-q13 de origen materno.

Características Clínicas	Bassecourt Serra et al. 2011	Galizia E, et al. 2012	Al Ageeli, et al. 2013	Aypar et al., 2014	Szabo et al. 2015	TOTAL (%)	Caso clínico 1	Caso clínico 2
	n=3	n=1	n=8	n=20	n=2	34		
Estudios citogenéticos moleculares	BG, FISH, CGH, MICROSAT, MS-MLPA	BG, FISH, CGH, MICROSAT	BG, FISH, CGH, MICROSAT, MS-MLPA	BG, FISH, CGH, MS-MLPA	BG, FISH, CGH, MICROSAT		BG, FISH, MS-MLPA	BG, FISH, MS-MLPA
Sexo M:F	1:2	F	5:3	13:7	1:1	20:14 (58:42)	M	M
Edad materna								
>35 años	NR	NR	3/8	NR	NR	3/8 (37.5)	+	
<35 años	NR	NR	5/8	NR	2/2	7/10 (70)		+
SDG	39	NR	NR	NR	40	39-40	40	33
Somatometría								
Peso <2DE	NR	-	-	NR	1/2	1/4 (25)	+	-
Peso >2DE	NR	NR	1/8	NR	NR	1/8 (12.5)		
Talla <2DE	NR	+	1/8	NR	NR	1/9 (11.1)	+	+
Talla >2DE	NR	NR	-	NR	NR	0/1		
RDPM	3/3	+	8/8	NR	2/2	14/14	+	+
Coficiente intelectual	NR	40-50	NR	NR	NR	40-50	66	NR
Alteraciones del lenguaje	2/3	NR	NR	20/20	2/2	24/25 (96)	+	+
Sin lenguaje	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	+
Alteraciones en el comportamiento								
Trastorno del espectro Autista	2/3	-	7/8	20/20	NA	29/32 (90.6)	+	+
Hiperfagia	1/3	+	NR	NR	NR	2/4 (50)	-	-
Alteración en el sueño	NR	-	2/8	NR	NR	2/9 (22.2)	-	-
Hipoacusia leve	NR	-	NR	NR	NR	NR	-	+
Contacto ocular reducido	1/3	-	NR	NR	NR	1/4 (25)	+	+
Alteraciones en la pigmentación	NR	-	2/8	NR	NR	2/9 (22.2)	-	+
Dermatosis	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	+
Características faciales								
Microcefalia	1/3	+	1/8	NR	2/2	5/14 (35.7)	-	-
Occipucio plano	NR	NR	NR	NR	2/2	2/2 (100)	+	-
Epicanto	NR	+	3/8	20/20	1/2	25/31 (80.6)	+	+
Hipertelorismo	NR	NR	NR	NR	1/2	1/2 (50)	-	-
Fisuras palpebrales descendentes	NR	+	3/8	20/20	2/2	26/31 (83.7)	+	+
Blefarofimosis	NR	-	2/8	NR	NR	2/9 (22.2)	-	-
Nariz ancha/ narinas antevertidas	NR	+	4/8	20/20	NR	25/29 (86)	+	+
Micrognatia	NR	NR	NR	NR	1/2	1/2 (50)	-	-
Microftia	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	+

+: Características presentes, -: características ausentes, BG: cariotipo con bandas G, MICROSAT: microsatélites, F: Femenino, M: Masculino, Mat: Materno, SDG: semanas de gestación, DE: desviación estándar, RDPM: Retraso en el desarrollo psicomotor, NR: no reportado, NA: no aplica.

Continuación **Tabla 9.** Características clínicas de pacientes con invdup 15q.

Características Clínicas	M. Bassecourt Serra et al. 2011	Galizia E, et al. 2012	Ageeli E, et al. 2013	Aypar et al., 2014	Szabo et al. 2015	TOTAL	Caso clínico 1	Caso clínico 2
	n=3	n=1	n=8	n=20	n=2			
Alteraciones cardíacas								
Transposición de grandes arterias	NR	-	NR	NR	NR	0/1	-	-
Extrasístoles	NR	NR	NR	NR	1/2	1/2 (50)	-	-
Alteraciones Urogenitales								
Pubertad Precoz	NR	NR	2/4	NR	NR	2/4 (50)	NA	-
Hipospadias/ criptorquidia	NR	NA	1/3	NR	NR	1/3 (33.3)	-	-
Micropene	NR	NR	1/7	NR	NR	1/7 (14.2)	-	-
Pelvis renal bífida	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	+
Alteraciones neurológicas								
Hipotonía muscular	3/3	+	6/8	20/20	2/2	31/33 (93.9)	+	+
Ataxia, incoordinación	NR	-	NR	NR	NR	0/1	-	-
Hiperreflexia	NR	-	NR	NR	NR	0/1	-	-
Epilepsia	NR	+	3/8	NR	2/2	6/11 (54.5)	-	-
Alteraciones EEG	NR	+	4/8	NR	2/2	7/11 (63.6)	+	+
RMN encéfalo alterada	NR	+	2/8	NR	NR	3/8 (37.5)	+	-
Aumento de espacios pericerebrales	1/3	NR	NR	NR	1/3	2/6 (33.3)	+	-
Atrofia cortical	NR	NR	NR	NR	NR	NR	+	-
Ventriculos laterales grandes	NR	+	NR	NR	NR	1/1	-	-
Movimientos anormales en manos	NR	-	NR	NR	1/2	1/3 (33.3)	-	+
Braquidactilia	NR	-	1/8	NR	NR	1/9 (11.1)	-	-

+: Características presentes, -: características ausentes, F: Femenino, M: Masculino, RDPM: Retraso en el desarrollo psicomotor, RMN: Resonancia Magnética Nuclear, EEG: electroencefalograma, NR: no refiere, NA: no aplica.

En relación a los factores considerados en los diferentes pacientes, se ha propuesto que la edad avanzada de los padres es un factor predisponente para la presentación de anomalías cromosómicas numéricas y puede tener un papel específico en el caso de marcador supernumerario del cromosoma 15 (Loane et al., 2013). La edad materna al nacimiento fue elevada en el caso uno, con 37 años; en el caso dos, la edad materna fue de 27 años. Al Ageeli et al., 2013 consideraron a la edad materna un riesgo, ya que la reportaron en el 37% de los casos de su serie.

En cuanto al período gestacional en la mayoría de los casos se reportó con una duración entre 39-40 semanas de gestación (Bassecourt et al., 2011) (Szabo et al., 2015). El paciente del caso clínico 2 fue obtenido a las 33 semanas por inicio de labor de parto prematuro y sufrimiento fetal, esto se pudo haber debido a varios factores que se sabe pueden influenciar el parto pretérmino, entre ellos infecciones maternas, ruptura prematura de membranas, sufrimiento fetal, que no se encuentran relacionados con la presentación del síndrome.

En los pacientes de nuestro estudio, la somatometría se encontró con peso y talla bajos, además en el caso 2 se reportó acidosis tubular renal que influyó en la patología. En la literatura se han reportado pacientes con peso y talla bajos, sin encontrarse una relación significativa. (Al Ageeli, et al., 2013 y Szabo, Czako, Hadzsiev, Duga, Komlosi, & Melegh, 2015).

Las alteraciones del desarrollo psicomotor fue un rasgo que se reportó en 14 pacientes (14/14 ; 100%; Tabla 9)1. En nuestro estudio en el caso 1 se pudo aplicar la prueba de Battelle para la evaluación del neurodesarrollo, con un cociente total del desarrollo de 66 lo que corresponde a retraso significativo. El caso 2 presentó déficit intelectual moderado, en la literatura Galizia et al., 2012 reportó un caso con un coeficiente intelectual de 40-50. Además, nuestros casos también presentaron problemas en el lenguaje, debemos considerar que esta situación pudo ser influenciada por la microtia en el paciente 2, sin embargo se encontró en el 96% de nuestros casos (24/25; Tabla 9).

En el síndrome de invdup(15) o idic(15), la gravedad de los trastornos de la conducta es variable: en la cohorte de casos presentados (Tabla 9) se reportó en 29 pacientes (29/32; 90%), quienes tuvieron trastorno del espectro autista. El contacto ocular reducido también fue descrito en nuestros pacientes y se ha reportado en por lo menos un paciente (Al Ageeli, et al., 2013). Se ha propuesto que ciertos genes localizados entre BP2 y BP3 como son *MAGEL2* y *NDN*, se asocian con retraso del desarrollo neurológico y trastorno del espectro autista. Estos genes se expresan en el cerebro y codifican proteínas importantes en el desarrollo neuronal (Marini, et al, 2013).

Dentro de las manifestaciones clínicas que tuvieron frecuencia alta en la serie de casos estudiados (Tabla 9), se consideraron muy frecuentes a aquellas que estaban presentes en más del 80% de los casos. Dichas alteraciones fueron epicantero, fisuras palpebrales descendentes y nariz ancha con narinas antevertidas. Las manifestaciones clínicas con frecuencia entre 35.7%-50%, son: microcefalia, hipertelorismo y micrognatia. En nuestros pacientes se reportaron características similares a las que fueron descritas en la literatura. Por lo que podemos considerar que la mayoría de pacientes con un cromosoma con invdup15q presentan características clínicas similares, sin embargo la sospecha diagnóstica específica es difícil. En el caso dos, nuestro paciente presentó además microtia derecha y pelvis renal bífida, hallazgos no reportados previamente en la literatura.

En relación a la microtia que presentó el paciente 2, el fenotipo del espectro Óculo aurículo vertebral (OAVS, MIM164210) es clínicamente heterogéneo y está caracterizado por desarrollo anormal del pabellón auricular, microsomía hemifacial, defectos renales y de la columna vertebral. Tiene un patrón de herencia multifactorial, se ha visto más frecuentemente en varones, unilaterales en 79-93% de los casos, y el 60% de los cuales afecta al pabellón auricular derecho. A menudo se asocia con atresia o estenosis del conducto auditivo, trastornos de déficit de atención y retraso en el desarrollo del lenguaje por las complicaciones de hipoacusia. Se ha descrito en varios síndromes genéticos y en rearrreglos cromosómicos pero no se ha reportado en pacientes con síndrome de idic(15) (Meireles, Smith, & Tassabehji, 2014).

Se ha considerado que el desequilibrio genómico en el síndrome de idic15 también podría estar causalmente vinculado al desarrollo de epilepsia que se ha reportado en 54.4% de los pacientes (Al Ageeli et al., 2013) (Szabo, et al., 2015), el 63% de los cuales tiene alteraciones en el EEG desde temprana edad.

Las convulsiones nocturnas, ciertas crisis convulsivas (del tipo Lennox-Gastaut o Síndrome Lennox) así como alteraciones en el ciclo habitual del sueño, se han reportado en 22% de los pacientes con idic(15) (Al Ageeli et al., 2013). Además pueden presentarse alteraciones en el EEG sin que haya ningún episodio de crisis convulsivas (Battaglia et al., 2016). Es importante resaltar que ambos pacientes están en tratamiento con medicación anticonvulsivante como profilaxis de las mismas.

Se identificó hipotonía en 31 de nuestros casos (31/33; 94%; Tabla 9). Al Ageeli, et al., 2013 observó la expresión reducida en los genes expresados paternalmente en la región con duplicación 15q11-q13, en particular de los genes *MKRN3*, *MAGEL2* y *NDN*; y la hipermetilación de ICR. Ambas alteraciones se han observado relacionadas con hipotonía severa. Una situación que fue similar a lo encontrado en nuestros pacientes.

La epilepsia se ha observado en pacientes con microdeleciones en 15q13.3 que incluyen el gen *CHRNA7* localizado entre el BP4 y BP5, a lo que se le considera un factor de riesgo (Helbig et al., 2009). El síndrome de invdup15q11-q13 podría afectar la expresión de *CHRNA7*. Las sondas que se usaron en nuestro estudio no abarcaron los genes entre los puntos de ruptura BP4-BP5 por lo que no podríamos descartar la ausencia de expresión en esos genes (Aypar U, 2014).

Se ha afirmado que la gravedad del fenotipo depende del origen parental. Marini et al., 2013 observaron que la inversión duplicación de la región 15q11-q13 es de origen materno en la mayoría de los casos. Los pacientes con cromosomas paternos derivados de la invdup15q11-q13 generalmente son normales o presentan un fenotipo leve que incluye discapacidad intelectual leve, retraso en el lenguaje, problemas en el comportamiento, alteración en la coordinación motora, así como hipotonía (Al Ageeli et al., 2013).

Se han postulado diversas hipótesis para explicar esta heterogeneidad clínica, la gravedad de las manifestaciones clínicas puede estar vinculada al tamaño del segmento duplicado y a la participación de la región PW/AS (Coppola, et al., 2013). La patogénesis de las manifestaciones fenotípicas podría deberse a efectos de dosis génica y/o en la impronta. Estos podrían incluir a los genes con expresión bialélica en la región de PW/AS, como los que pertenecen al agrupamiento que codifica para los receptores GABA.

Sin embargo, la observación de que el fenotipo de la duplicación materna suele ser más grave sugiere al mismo tiempo un papel patogénico para los genes improntados *UBE3A* y *ATP10A*, que se expresan exclusivamente en el cromosoma 15 materno (Marini et al., 2013).

El gen *UBE3A* está localizado entre BP2 y BP3 y tiene un patrón de expresión improntado en el cerebro. Este gen produce tres isoformas, pero la significancia funcional respecto a la localización en tejidos específicos de estas isoformas sigue siendo desconocida. *UBE3A* funciona como ligasa E3 en la vía ubiquitina-proteasoma y como un co-activador transcripcional de esteroides (Bi, Sun, Ji, & Baudry, 2016). Recientemente, otros dos genes expresados en el alelo paterno, *MAGEL2* y *NDN*, localizados entre BP2 y BP3 se asociaron con retraso del desarrollo neurológico y trastorno del espectro autista (Sell & Seth, 2015). Estos genes se expresan en el cerebro y codifican proteínas importantes en el desarrollo neuronal.

El gen *NDN* se expresa en neuronas pos-mitóticas. En nuestros pacientes se encuentra alterada su dosis y su expresión, por lo que podría existir una relación entre la dosis génica y estado de metilación y así explicar el déficit intelectual y el trastorno del espectro autista observado en ellos.

El tamaño y el contenido de la región involucrada también juega un papel en la expresión fenotípica, todos los pacientes con inversión duplicación 15q heredada y con anomalías fenotípicas reportados en la literatura internacional, tuvieron un desequilibrio que implicaba por lo menos el intervalo BP2-BP3. Las duplicaciones de dichas regiones corresponden a las deleciones consideradas comunes en la región de PWS/AS (Castronovo et al., 2015).

En los casos reportados en la literatura internacional, se observó la alteración en la dosis y metilación de la región BP1-BP2, incluyendo los genes *TUBGCP5*, *CYFIP1*, *MKRN3*, *MAGEL2*, *NDN*, *SNRPN*, *UBE3A*, *ATP10A*, *GABRB3*, *GABRA5*, *GABRG3* y *OCA2*. *TUBGCP5* se encuentra en el intervalo BP1-BP2, que también incluye *CYFIP1*, *NIPA2* y *NIPA1*, que podrían estar involucrados en las manifestaciones clínicas presentes en las duplicaciones inversiones maternas como reportó Marini en 2013. Es importante mencionar que en nuestros pacientes se reportó una alteración en la dosis génica y estado de metilación en los genes *NDN*, *SNRPN*, *UBE3A*.

La sospecha clínica del síndrome idic(15) debe considerarse en cualquier niño, niña o adolescente con hipotonía central temprana de grado variable, características dismórficas, retraso del desarrollo, discapacidad intelectual, epilepsia difícil de controlar y TEA. En este síndrome las malformaciones mayores son raras, lo que constituye la razón principal por la cual el análisis cromosómico no se indica en estos pacientes, probablemente dejando un número de individuos sin diagnóstico si no se considera el déficit intelectual. Sin embargo, es importante que en la actualidad la presencia de crisis epilépticas de control difícil se considera por sí sola una indicación para realizar estudio citogenético.

En la mayoría de los casos el cromosoma con idic(15) se produce de novo durante la meiosis materna y origina un espectro variable del fenotipo por lo que las correlaciones genotipo-fenotipo son difíciles de identificar. Los pacientes con duplicación intersticial tienen un retraso del desarrollo psicomotor más leve y puede mejorar con el tiempo más a menudo que aquellos con idic(15). El origen paterno del segmento duplicado es generalmente asociado con un fenotipo normal o leve, pero también se ha observado en estos casos a pacientes con retraso del desarrollo psicomotor, retraso en el habla y TEA (Al Ageeli et al., 2013).

La evaluación neuropsiquiátrica debe considerarse en éstos pacientes, se recomienda la RMN y el EEG para todos los pacientes con síndrome de invdup 15q11-q13, ya que hay que considerar que anomalías cerebrales y EEG anormal pueden estar presente incluso en ausencia de epilepsia. (Battaglia, Bernardini, Torrente, Novelli, & Gloria, 2016).

El determinar el pronóstico de los pacientes con esta anomalía cromosómica sigue siendo un reto y se plantean muchas dificultades en el asesoramiento genético. En el primer caso, el *propositus* fue producto único de madre de 41 años, sin otras comorbilidades, en cual el riesgo de recurrencia es menor al 1%, pero hay que tomar en cuenta la edad materna y el riesgo para otras aneuploidías. En el caso 2 fue producto de la gesta 2 de padres jóvenes no consanguíneos aparentemente sanos, el *propositus* fue producto de un re-arreglo cromosómico *de novo*, por lo que el riesgo de recurrencia para los padres del paciente en embarazos futuros es menor al 1%; asimismo, el riesgo de recurrencia para la malformación del pabellón auricular que se presentó en este paciente de forma esporádica es de 3-6% (Meireles, Smith, & Tassabehji, 2014).

8. Conclusiones

Se identificaron 24 reportes de pacientes con marcadores cromosómicos supernumerarios en el Laboratorio de Citogenética del Departamento de Genética del HIMFG entre el 1 de enero 2007 y el 31 de diciembre de 2016. Estos representan el 0.39% de los reportes de cariotipo del período de estudio.

En 10 de los 24 casos (41.6%) fue posible identificar el origen del cromosoma marcador. De ellos, 5/10 (50%) correspondieron a derivados de cromosomas acrocéntricos, dos de los cuales correspondieron al síndrome de *idic(15)*; otros dos fueron derivados del cromosoma 22 y el otro fue derivado de la segregación 3:1 de una *t(9;15)(q34;q11)mat*. En los otros 5 pacientes en quienes se identificó el origen del marcador se encontraron isocromosoma de 18p en tres de ellos, en uno se reportó un isocromosoma de 9p, y en el otro paciente un derivado de una segregación 3:1 de una *t(3;9)mat*.

De acuerdo a la literatura la frecuencia es de 0.044%. Estas alteraciones son poco frecuentes y la incidencia observada en este trabajo que es 0.39% refleja que nuestra Institución es un centro de referencia para pacientes con posibles cromosomopatías.

Los dos pacientes reportados en la fase B presentaron características clínicas y dismorfias que corresponden al síndrome de *idic(15)*. Es importante nombrar que a la edad de 3 años 10 meses, el paciente 1 comenzó con rasgos característicos del trastorno del espectro autista. Este rasgo también se presentó en el segundo caso quien además tuvo alteraciones en el pabellón auricular y renal que no habían sido previamente descritas en pacientes con este síndrome.

El análisis molecular por MS-MLPA de los dos pacientes fue compatible con una tetrasomía de la región 15q11.2-15q13.1 y se detectó una ganancia de metilación en los genes *SNRPN* y *NDN*, esperado para aquellos individuos que presentan dos copias maternas adicionales en dicha región.

Se considera la posibilidad de que los genes improntados en esta región *podrían* estar involucrado en las manifestaciones clínicas. Los datos obtenidos en nuestros casos coinciden con los reportes de la literatura internacional, donde se concluye que la patogénesis de las manifestaciones fenotípicas podría deberse a efectos de dosis génica y/o en la impronta.

Ambos casos fueron referidos por discapacidad Intelectual y trastorno de la conducta, además en el caso dos por malformación del pabellón auricular, razones por las que se realizó cariotipo y a partir de este se realizó el abordaje

citogenético molecular. Lo que demuestra la importancia de considerar las indicaciones del estudio cromosómico en pacientes con síndrome cromosómico con baja frecuencia o sin diagnóstico preciso para establecer la relación fenotipo-genotipo y brindar a las familias asesoramiento genético con bases citogenéticas moleculares.

9. Bibliografía

- Al Ageeli, E., Drunat, S., Delano, C., Perrin, L., Baumann, C., Capri, Y., Moncla, A. (2013). Duplication of the 15q11-q13 region: Clinical and genetic a study of 30 new cases. *European Journal of Medical Genetics*;57(1): 5-14.
- Alberts, B., Johnson, A., & Lewis, J. (2014). DNA and chromosomes. En *Molecular Biology of the cell* (3era edición ed., págs. 171-202). New York, E.U.A: Garland Science. Recuperado el 2002.
- APA, A. A. (2014). *Guía de Consulta de los Criterios Diagnósticos del DSM-5*. New York: Médica Panamericana.
- Aypar U, Brodersen PR, Lundquist PA, Dawson DB, Thorland EC, Hoppman N.. (2014). Does parent of origin matter? Methylation studies should be performed on patients with multiple copies of the Prader–Willi/Angelman Syndrome critical region. *American Journal of Medical Genetics Part A*; 164(10): 2514–2520.
- Bajrami, E., & Spirosk, M. (2016). Genomic imprinting. *Journal of Medical Sciences*; 4(1): 181-184.
- Bassecourt, M., Miramar, M. D., Alcaine, M. J., Calvo, M. T., & López, J. (2011). Síndrome de inversión duplicación del cromosoma 15 (invdup15) «de novo»: presentación de tres casos clínicos. *Revista del Laboratorio Clínico* ;2:186-195.
- Battaglia, A. (2008). The inv dup (15) or idic (15) syndrome (Tetrasomy 15q). *Orphanet Journal of Rare Diseases*; 3(30): 1-7.
- Battaglia, A., Bernardini, L., Torrente, L., Novelli, A., & Gloria, S. (2016). Spectrum of epilepsy and electroencephalogram patterns in Idic (15) Syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*; 170(10): 1-9.
- Battaglia, A., Parrini, B., & Tancredi, R. (2010). The behavioral phenotype of the Idic(15) syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part C*; 154 C, (4): 448–455.
- Bi, X., Sun, J., Ji, A., & Baudry, M. (2016). Potential therapeutic approaches for Angelman syndrome. *Expert opinion ther targets.*, 20(5), 601–613.
- Bird, L. M. (2014). Angelman syndrome: review of clinical and molecular aspects. *The Application of Clinical Genetics*;16(7): 93-104.
- Botezatu, M., Puiu, N., Cucuc, C., Diaconu, A., Badiud, C., Arsene, J.,Anton. (2015). Comparative molecular approaches in Prader–Willi syndrome diagnosis. *Gene*; 575(4): 1-6.

- Buiting, K., Williams, C., & Horsthemke, B. (2016). Angelman syndrome — insights into a rare neurogenetic disorder. *Nature Review Neurology*; 12(10): 584-593.
- Castronovo, C., Crippa, M., Bestetti, I., Rusconi, D., Russo, S., Larizza, Finelli, P. (2015). Complex de novo chromosomal rearrangement at 15q11–q13 involving an intrachromosomal triplication in a patient with a severe neuropsychological phenotype: clinical report and review of the literature. *American Journal of Medical Genetics*; 167 A(1): 221–230.
- Cataletto, M., Angulo, M. G., & Butler, M. E. (2015). Prader-Willi syndrome: a review of clinical, genetic, and endocrine finding. *Journal of Endocrinology Investigation*; 38(12): 1249–1263.
- Centeno, M., Pérez, B., Ruiz, A., Labarga, C., & Centeno, T. (2011). Chromosome aberrations in malformed newborns. *Anales Españoles de Pediatría*; 54(6): 582-587.
- Chen CP, Lin SP, Chern SR, Wu PS, Chen YN, Chen SW, Lee CC, Town DD, Yang CW, Wang W. (2016) *Taiwan Journal of Obstetric Gynecology* ;55(5):728-732.
- Cheon, C. K. (2016). Genetics of Prader-Willi syndrome and Prader-Will-Like. *Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism*; 21(3): 126-135.
- Coppola, A., Ruosi, P., Santulli, L., Striano, S., Zara, F., Striano, P., & Sisodiya, S. (2013). Neurological features and long-term follow-up in 15q11.2-13.1 duplication. *European Journal of Medical Genetics.*; 56(11): 614-618.
- Cox, D. M., & Butler, M. G. (2015). The 15q11.2 BP1–BP2 Microdeletion Syndrome: A review. *International Journal of Molecular Sciences*; 16(2): 4068-4082.
- Ensembl. (Diciembre de 2013). Obtenido de Ensembl: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/Genome
- Finucane, B., Lusk, L., Arkilo, D., & al., e. (2016). 15q Duplication syndrome and related disorders. (R. Pagon, M. Adam, & H. e. Ardinger, Edits.) *GeneReviews*® [internet], 1-46.
- Galán, E. (2010). Indicaciones del estudio genético. En Guillén, & Encarna., *Protocolos de Genética/Dismorfología* (Vol. 2, págs. 18-23). España: Exlibris.
- Gardner, R. J., Sutherland, G., & Shaffer, L. G. (2011). Chromosome abnormalities and genetic counseling. En R. J. Garner, G. Sutherland, & L. G. Shaffer, *Chromosome abnormalities and genetic counseling* (págs. 42-44). Oxford New York: oxford monographs on medical genetics no. 61.

- Gersen, S., & Keagle, M. (2013). Clinical cytogenetics. En S. Gersen, & M. Keagle, *The Principles of Clinical Cytogenetics* (págs. 9-23). New York, E.U.A: Springer.
- Gos, M. (2013). Epigenetic mechanisms of gene expression regulation in neuronal disease. *Acta Neurobiologica Experimentalis*; 73(1): 19-37.
- Henkhaus, R. S., Kim, S.-J., Kimonis, V. E., Gold, J.-A., Dykens, E. M., Driscoll, D. J., & Butler, M. G. (2012). Methylation-Specific Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification and identification of deletion genetic subtypes in Prader-Willi Syndrome. *Genetic Testing and molecular biomarkers*; 52(7): 178–186.
- Hsieh, C.-L. (2011). Cytogenetic Techniques. En Jonh Wiley and Sons. Ltd. Chichester: Encyclopedia of Life Sciences (eLS). doi:10.1002/9780470015902.a0002650.pub2
- Ishida, M., & Moore, G. (2013). The role of imprinted genes in humans. *Molecular Aspects of Medicine*; 34(4): 826–840.
- Jacobs, P. (2014). An opportune life: 50 years in human cytogenetics. *The Annual Review of Genomics and Human Genetics*; 15: 29–46; doi: 10.1146/annurev-genom-090413-025457.
- Jafari Ghahfarokhi, H., Chaleshtori, M. M., Liehr, T., Chaleshtori, M. H., Ghasemi-Dehkordi, T. H., & Dehkordi, P. G. (2015). Small supernumerary marker chromosomes and their correlation with specific syndromes. *Advanced Biomedical Research*; 4(140): 1-11.
- Kalish, K., Jiang, C., & Bartolomei, M. (2014). Epigenetics and imprinting in human disease. *International Journal of Developmental Biology*; 58(2-4): 291-298.
- Kalsner, L., & Chamberlain, S. (2015). Prader-Willi, Angelman, and 15q11-q13 duplication syndromes. *Pediatric Clinics of North America*; 62(3): 587–606.
- Khatlaji, L., Jaillard, S., Andrieux, J., Pasquier, L., & Perrin, L. (2015). Clinical and molecular delineation of tetrasomy 9p syndrome: Report of 12 new cases and literature review. *American Journal of Medical Genetics*; 167(3): 1252–1261.
- Krishnan, V., Stoppel, D., Nong, Y., Johnson, M. A., Nadler, M. J., Ozkaynak, E., Cruz, T. (2017). Autism gene *UBE3A* and seizures impair sociability by repressing VTA *Cbln1*. *Nature*, 543(7646): 507-529.
- Lemke, K., Weier, J., Weier, H.-U., & O'Brien, A. R. (2015). High performance DNA probes for perinatal detection of numerical chromosome aberrations. *Advanced Techniques in Biology & Medicine - Journals*; 3(155): 1-9.


- Liehr, T. (2009). Molecular Cytogenetics: The standard FISH and PRINS procedure. En *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) application guide* (págs. 43-47). Alemania: Springer.
- Liehr, T., Cirkovic, S., Lalic, T., Guc-Scekic, M., De Almeida, C., Weimer, J., Dilek., A. (2013). Complex small supernumerary marker chromosomes – an update. *Molecular Cytogenetics*; 6(46): 40-46.
- Lisker, R., Zentella, A., & Grether, P. (2013). Introducción a la Genética Humana. En R. Lisker, A. Zentella, & P. Grether, *Conceptos básicos de genética*. (págs. 11-44). México: 3° edición. Manual Moderno.
- Liu, A., Tang, W., Lau, E., Chan, K., Kan, A., Wong, K., Chung, B. (2013). Expanded Prader–Willi Syndrome due to chromosome 15q11.2–14 deletion: Report and a review of literature. *American Journal of Medical Genetics Part A*; 161^a(6):1309-1318.
- Loane, M., Morris, J., Addor, M.-C., Arriola, L., Budd, J., Doray, B., Haeusler, M. (2013). Twenty-year trends in the prevalence of Down syndrome and other trisomies in Europe: impact of maternal age and prenatal screening. *European Journal of Human Genetics*; 21(1): 21-27.
- Luthardt, F., & Keitges, E. (2011). Chromosomal syndromes and genetic disease. En John Wiley & Sons Ltd. *Encyclopedia of life of sciences (eLS)* (págs. 1-12). Chichester. doi:10.1038/npg.els.0001446
- Maarri, O., Buiting, K., Peery, E., Kroisel, P., Balaban, B., Wagner, K., Horsthemke, B. (2001). Maternal methylation imprints on human chromosome. *Nature Genetics*; 27(3):341-344.
- Malvestiti, F., De Toffol, S., Grimi, B., Chinetti, S., Marcato, L., Agrati, C., Frascoli, G. (2014). De novo small supernumerary marker chromosomes detected on 143 000 consecutive prenatal diagnoses: chromosomal distribution, frequencies, and characterization combining molecular cytogenetics approaches. *Prenatal Diagnosis*; 34(5): 460-468.
- Marini, C., Cecconi, A., Contini, E., Pantaleo, M., Metitieri, T., Guarducci, S., Genuardi, M. (2013). Clinical and genetic study of a family with a paternally inherited 15q11–q13 duplication. *American Journal of Medical Genetics*; 161A(6): 1459–1464.
- Meireles, A. B., Smith, J. C., & Tassabehji, M. (2014). Oculo auriculo vertebral spectrum: a review of the literature. *Genetic Syndromes & Gene Therapy*; 51(10): 1-11.
- Moore, C., & Best, R. (2001). Chromosomal genetic disease: Structural aberrations. En John Wiley & Sons, Ltd. Chichester.: *Encyclopedia of Life Sciences (eLS)*. doi:10.1038/npg.els.0001452

- Mori, M. A., Mansilla, E., García-Santiago, F., Vallespín, E., Palomares, M., Martín, R., Nevado, J. (2012). Diagnóstico prenatal y array-hibridación genómica comparada (CGH) (I). *Gestaciones de elevado riesgo. Diagnóstico prenatal*; 23(2):34-48.
- MRC-Holland. (30 de Noviembre de 2016). Obtenido de MRC-Holland: www.mlpa.com
- Nygren, A. O., Ameziane, N., Duarte, H. M., Vijzelaar, R. N., Waisfisz, Q., Hess, C. J., Errami, A. (2005). Methylation-Specific MLPA (MS-MLPA9: simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Research*; 33(14):1-9.
- Pérez de Nanclares, G., & Lapunzina, P. (2015). Síndrome de Prader-Willi. En M. Guitart, C. Camprubí, C. Fernandez, & B. Gener, *Enfermedades de Impronta*. (págs. 113-140). Barcelona, España: Publicaciones David Ulivarri.
- Plaiasu, V., Ochiana, D., Motei, G., & Georgescu, A. (2011). A rare chromosomal disorder Isochromosome 18p syndrome. *Journal of Clinical Medicine*; 6(2):132-136.
- Riegel, M. (2014). Human molecular cytogenetics: From cells to nucleotides. *Genetics and Molecular Biology*; 37(1): 194-209.
- Robinson, W., & McFadden, D. (2001). Chromosomal genetic disease: Numerical aberrations. En John Wiley & Sons, Ltd. Chichester: Encyclopedia of life of sciences (eLS). doi:10.1038/npg.els.0001451
- Romana, M. (2015). Diagnóstico de las anomalías cromosómicas en patología constitucional. *EMC Tratado de medicina*, 1-8.
- Rosenberg, L., & Rosenberg, D. (2012). *Human Genes and Genomes Science, Health, Society*. Boston, E.U.A: Elsevier.
- Russo, A., Pacchierotti, F., Cimini, D., Ganem, N., Genes, A., Natarajan, A., Degrassi, F. (2015). Genomic instability: crossing pathways at the origin of structural and numerical chromosome changes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*; 56: 563-580.
- Sell, G., & Seth, M. (2015). From UBE3A to Angelman syndrome: a substrate perspective. *Frontiers in Neurociencia*; 9(322): 1-6.
- Shaffer, L. G. (2005). Karyotype Interpretation. En John Wiley & Sons, Ltd. Chichester: Encyclopedia of life of sciences (eLS). doi:10.1038/npg.els.0005778
- Speicher, M. (2006). Chromosome. En John Wiley & Sons, Ltd. Chichester: Encyclopedia of life of sciences (eLS). doi:10.1038/npg.els.0005783


- Speicher, M. R., & Carter, N. P. (2005). The new cytogenetics: Blurring the boundaries with molecular biology. *Nature Reviews Genetics*; 6(10): 782-792.
- Strachan, T., & Read, A. (2010). Human molecular genetics. En T. Strachan, & A. Read, *Human molecular genetics* (4th ed., págs. 7-10). Garland Publishing.
- Suzanne B. Cassidy, Stuart Schwartz, Jennifer L. Miller, & Daniel J. Driscoll. (2011). Prader-Willi syndrome. *Genetics in medicine*; 14(1): 10-26.
- Szabo, A., Czako, M., Hadzsiev, K., Duga, B., Komlosi, T., & Melegh, B. (2015). Partial tetrasomy of the proximal long arm of chromosome 15 in two patients: the significance of the gene dosage in terms of phenotype. *Molecular Cytogenetics*; 41(8): 1-8.
- Tan, W., & Birds, L. (2016). Angelman syndrome: Current and emerging therapies in 2016. *American Journal of Medical Genetics Part C*; 172(4): 384-401.
- Taylor, T., Gitlin, S., Patrick, J., Crain, J., Wilson, M., & Griffin, D. (2014). The origin, mechanism, incidence and clinical consequences of chromosomal mosaicism in humans. *Human Reproductive Update*; 20(4): 571-581.
- Venkatesan, S., Natarajanb, A., & Handea, P. (2015). Chromosomal instability—mechanisms and consequences. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*; 111(6): 176–184.

Anexos

Anexo I Carta de consentimiento informado para fotografías



**HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO
FEDERICO GOMEZ**
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
DR. MÁRQUEZ NO. 162 COL. DOCTORES,
DELEGACIÓN CUAUHTÉMOC, C.P. 06720 MÉXICO, D.F.
INSTITUCIÓN DE SERVICIO MÉDICO, ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN
AFILIADO A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

 5228-9917

México, D.F. a ____ de ____ de 20__

A QUIEN CORRESPONDA:

Por medio de la presente deseo manifestar que estoy de acuerdo con la invitación que me _____ ha/han _____ hecho _____ el _____ Doctor/Doctores _____

del Departamento de Genética de Hospital Infantil de México Federico Gómez para que sean publicadas y/o presentadas en congresos científicos nacionales e internacionales las características clínicas de mi caso y/o el de mi hijo, en forma escrita o en fotografías.

Se me ha explicado que ello obedece al interés científico de compartir conocimiento con la comunidad médica y científica internacional que pudiese en un futuro redundar en un mejor conocimiento y entendimiento de la enfermedad de que se trate además del que actualmente se tiene. Se me ha explicado que de realizarse dicha publicación o presentación en congreso, esta será un medio científico, reconocido nacional e internacionalmente, que se tomarán todas las medidas necesarias para preservar la confidencialidad del caso y todo aquello que pudiese permitir la identificación de la persona de quien se trate, incluyendo la modificación de las fotografías clínicas para preservar el anonimato.

Por lo anterior establezco aquí que he tomado esta decisión libremente y que se me ha explicado que no es obligatorio el participar y que no percibiré por ello ningún beneficio en especie o económico de ninguna naturaleza y de la misma manera que de negarme a participar ello no influiría en el trato y prestaciones que recibo por parte del Hospital Infantil de México Federico Gómez, obedeciendo a los derechos que como paciente tengo y al respeto a mi toma de decisiones y de mi dignidad.


Por lo anterior firmo este documento de conformidad y recibo una copia del documento.

Nombre y firma _____

Paciente/tutor _____
Parentesco con el paciente _____

Testigo 1 _____ Testigo 2 _____

Anexo II: Consentimiento informado para toma de muestra de sangre periférica para cariotipo y FISH.

 Hospital General de México Filiación Clínica Secretaría de Salud	FORMATO DE CONSENTIMIENTO BAJO INFORMACION HIM-LC-PR.01-RE.01
---	--

CUBICULO No. FECHA / /

NOMBRE DEL PACIENTE _____ **Sexo** M F **Edad** _____ AÑOS

PROCEDIMIENTO PROPUESTO Y EXPLICACION DEL MISMO:
Toma de muestra SANGUINEA ORINA MATERIA FECAL OTRO (explique) _____

Beneficios : DIAGNOSTICO OPORTUNO DE PADECIMIENTO Y/O SEGUIMIENTO AL TRATAMIENTO

Riesgos y complicaciones: MINIMOS, SI SE PRESENTA ALGUNA CONTAMOS CON PERSONAL CAPACITADO EN ATENDER LA URGENCIA.
EL MATERIAL ES NUEVO, ESTERIL Y DESECHABLE.

Yo _____ **de** _____ años de edad. Reconozco que se me explicó y entendí el procedimiento para realizar los exámenes, estoy enterado de los beneficios, sé de los riesgos y las probables complicaciones que se me pueden presentar. Consciente de que se busca un beneficio, doy mi consentimiento sin obligación y por decisión propia para que los exámenes se efectúen así mismo para realizar la atención de contingencias y urgencias derivadas del acto autorizado, con base al principio de libertad prescripta.

FIRMA DEL PACIENTE O SU REPRESENTANTE LEGAL _____

TESTIGO FAMILIAR (Nombre y Firma) _____

TESTIGO SUPERVISOR (Nombre y Firma) _____

NOMBRE Y FIRMA DEL FLEBOTOMISTA _____

Este consentimiento deberá llenarse para todo procedimiento de Toma de Muestras en el Laboratorio a realizarse en todo paciente sin excepción alguna. El responsable de recabarlo es quien vaya a realizar el mismo. Esta carta es renovable mientras no se concluya el procedimiento y no obligará al Químico, Técnico o Médico a realizar u omitir un procedimiento cuando ello entrañe un riesgo hacia el paciente. La muestra podrá ser utilizada para fines de investigación.

REFERENCIA: LEY GENERAL DE SALUD cap. IV, Art. 80,81,82, y 83. NOM-188-SSA1-1998

Anexo III: Consentimiento informado para toma de muestra de DNA.



HOSPITAL INFANTIL de MÉXICO
FEDERICO GÓMEZ
Instituto Nacional de Salud

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA TOMA DE MUESTRA DE
ADN PARA EVALUACIÓN DIAGNÓSTICA

México D.F., a ___ de _____ de 201

Por medio de la presente autorizamos al Dr. (a) _____ para
realizar el siguiente procedimiento.

1.- Extracción de 3ml de sangre venosa del brazo de nuestro (a) hijo (a)

Nombre: _____

El propósito de la toma de la muestra es la obtención de ADN para realizar el estudio de _____

Nuestro consentimiento se condiciona a que se mantenga en forma confidencial los
datos de nuestro hijo (a) y nuestra familia. Entendemos que el procedimiento de
obtención de sangre puede causar molestias.

Nuestra firma en este documento manifiesta nuestra participación voluntaria, la
responsabilidad de los investigadores respecto a nuestras personas y nuestros derechos,
y que podemos terminar en cualquier momento la participación en este estudio sin que
se perjudique la futura atención de nuestro hijo (a). Se nos entrega una copia del
documento.

La información anterior fue explicada por _____

Para cualquier duda contactar a la Dra. Verónica Fabiola Morán Barroso en el
Departamento de Genética del Hospital Infantil de México Federico Gómez Tel: 52 28
99 17 Ext. 2037 o a la Dra. Rebeca Gómez-Chico Velasco, Subdirectora de Pediatría
Ambulatoria.

Nombre y Firma de la Madre o Tutora _____

Testigo _____

Nombre y Firma del Padre o Tutor _____

Testigo _____



INSTITUCIÓN DE SERVICIO MÉDICO, ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN, AFILIADA A LA UNAM
Dr. Márquez 162, Col. Doctores, C.P. 06720, México, D. F.
Teléfono: 52 28 99 17 www.himfg.edu.mx



Anexo IV: Técnica de cariotipo bandas GTG

Material:

- Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4
- Solución Buffer de fosfatos pH 6.8
- Tripsina
- Colorante Wrioth
- Colorante Giemsa
- Cubreobjetos
- Gasas
- Guantes
- Jarras coplin
- Vaso de Precipitados
- Pipeta graduada
- Probeta graduada
- Pipeta de transferencia
- Pipeta Pasteur
- Entellón

Equipo:

- Cronómetro
- Microscopio
- Pinzas punta roma
- Método
- Preparar en tren: 4 jarras coplin y 1 vaso de precipitados cada una de las siguientes soluciones:
 - 49 ml de la solución buffer pH 7.4 y 1 ml de tripsina
 - Solución buffer pH 7.4
 - 48 ml solución buffer pH 6.8 y 2 ml de colorante Wrioth

- 48 ml de solución buffer pH 6.8 y 2 ml de colorante Giemsa
- Vaso de precipitados con agua corriente

Procedimiento:

- 1) Se obtienen 1.5ml de sangre periférica por punción directa, en jeringa previamente heparinizada con 0.1ml de heparina sódica de 1,000 UI.
- 2) Se agregan 700µl de muestra en 2 tubos de ensayo Falcon desechables de polipropileno esterilizados.
- 3) Se agregan 5ml de medio de cultivo PB-MAX (contiene RPMI 1640, fitohemaglutinina, suero bovino fetal, antibióticos estreptomicina y penicilina, L-glutamina).
- 4) Se incuba por 72 horas a 37-37.5°C.

Cosecha

- 5) A las 72 hrs se agregan 20µl de colchicina a cada tubo, se agita y se incuban 30min más a 37-37.5°C.
- 6) Se centrifuga por 10 minutos a 2,500rpm.
- 7) Se decanta el sobrenadante y se resuspende agitando en vortex y se agrega solución hipotónica para completar un volumen de 12ml.
- 8) Se incuba 30 minutos a 37-37.5°C.
- 9) Centrifugar 10 minutos a 2,500rpm.
- 10) Con pipeta se retira el sobrenadante y en agitación se agrega fijar frío o solución de Carnoy, gota a gota para completar un volumen de 80ml.
- 11) Se refrigera por 20 minutos.
- 12) Se centrifuga y se retira el sobrenadante, se lleva a un volumen de 8ml para el primer lavado.

- 13) Se centrifuga nuevamente, se retira el sobrenadante y se lleva a un volumen de 6ml para el segundo lavado.
- 14) Se gotea el cultivo en laminillas de vidrio y se revisa el material determinando la calidad y cantidad de metafases presentes para bandas GTG
- 15) Las laminillas obtenidas se incuban en una estufa a 60°C por espacio de 24 horas
- 16) Sumergir de 10-30 segundos una laminilla en el primer coplin, (digestión)
- 17) Sacar la laminilla al término del tiempo y enjuagarla en el segundo coplin (parar actividad)
- 18) Sumergir la laminilla en el siguiente coplin 2 minutos (tinción con Wright)
- 19) Sumergir la laminilla en el siguiente coplin 2 minutos (tinción con Giemsa)
- 20) Sumergir y enjuagar la laminilla en el vaso de precipitados
- 21) Secar
- 22) Montar inmediatamente con 3 gotas de entellán y cubreobjetos
- 23) Revisar la calidad de las bandas
- 24) Dejar secar a temperatura ambiente

Modificada de Freshney RI. Specialized Techniques. In: Culture of Animal Cells. A manual of basic technique and specialized applications. Wiley-Blackwell; 2010. pp 517-529.

Anexo IV: Técnica de FISH

Técnica de FISH (Hibridación *in situ* con fluorescencia). De acuerdo a la metodología propuesta por Vysis (Vysis, 2001, New York) www.invitrogen.com/manual del fabricante Vysis para sondas LSI.

- 1) Se realiza la técnica de cariotipo hasta la preparación de laminillas.
- 2) El ambiente de humedad relativa debe de estar en un rango de 50 - 60% y la temperatura entre 24–26°C.
- 3) Se resuspende el botón con la cantidad de solución fijadora para tener la concentración de metafases adecuada.
- 4) Sobre una laminilla pre-lavada (FISHER brand™) se gotea el material celular en un área de acuerdo a la cantidad de sonda que se va a hibridar.
- 5) Se verifica la calidad del material celular en un microscopio de contraste de fase, los cromosomas se deben observar de color “gris rata” y libres de citoplasma para obtener una buena hibridación.
- 6) Se procede a la maduración de la muestra.
- 7) Las preparaciones celulares se incuban a 37°C en SSC 2X por 30 min, al término de esta, se deshidratan en series de etanol al 70%, 85% y 100% por 2 minutos en cada uno y se deja secar.
- 8) Se procede a la co-desnaturalización.
- 9) Las sondas previamente mezcladas con el buffer se colocan sobre la laminilla madurada en el área de mejor calidad celular, se coloca un cubreobjetos limpio de 22 x 22 mm, se sella con cemento de goma. La co-desnaturalización se realiza en el HyBryte (casa comercial) a 71°C por 2 minutos, se realiza un control estricto de la temperatura y tiempo de desnaturalización.
- 10) Se procede a la hibridación.

- 11) Se colocan las laminillas en una cámara húmeda protegida de la luz a 37°C por 16 a 24 horas.
- 12) 24 horas después, se remueve con cuidado el sellador y se retira el cubreobjetos, las laminillas son lavadas en 40 ml de SSC 0.4X/NP-40 al 0.3% a 73°C por 2 min y posteriormente en 40 ml de SSC 2X/NP-40 al 0.1% a temperatura ambiente en un tiempo no mayor a un 1 min, se deja secar la laminilla al aire en la oscuridad y se agrega como contratinción 8µl de DAPI/Antifade, se coloca un cubreobjetos, se sella con cemento de goma para su análisis en un microscopio de epifluorescencia (Olympus™), con los filtros (Chroma™).

Anexo V: Técnica de MS–MLPA.

Técnica de MLPA MS De acuerdo a la metodología propuesta por Holland (Holland, 2016) www.mlpa.com /manual del fabricante.

Materiales

- Endonucleasa de restricción *HhaI*. Se recomienda Promega R6441, 10 unidades / μl .
- Termociclador con tapa calentada (99-105 ° C).
- Equipo de electroforesis capilar.
- Tubos, tiras o placas de PCR de 0,2 ml.

Procedimiento:

Protocolo para la detección / cuantificación del DNA. Utilizar una cantidad total de 50-250 ng (óptimo: 50-100 ng) de DNA humano en un volumen de 5 μl para cada MS-MLPA.

Desnaturalización del DNA (día 1)

1. Etiquetar tubos, tiras o placas de 0,2 ml.
2. Añadir 5 μl de muestra de DNA (50-250 ng, 50-100) a cada tubo.
3. Coloque los tubos en el termociclador. Desnaturalice el DNA de la muestra durante 5 minutos a 98 ° C; enfríe hasta 25 ° C antes de retirar los tubos del termociclador.

Reacción de hibridación (día 1)

1. Agite el amortiguador para MLPA y la mezcla de sondas o salsa antes de su uso.
2. Preparar la mezcla maestra de hibridación que contiene, para cada reacción: 1,5 μl de tapón MLPA (tapón amarillo) + 1,5 μl salsa (tapón negro). Mezclar bien la mezcla maestra de hibridación mediante pipeteo o vórtex.
3. Después de la desnaturalización del DNA, añadir 3 μl de mezcla maestra de hibridación a cada tubo de muestra. Mezclar bien pipeteando.
4. Continuar el programa del termociclador: incubar durante 1 minuto a 95 ° C, luego 16-20 horas a 60 ° C.

Ligación y reacciones de ligación-digestión (día 2)

1. Mezcle los dos tapones de Ligasa antes de usarlos.
2. Prepare una mezcla principal Ligasa-65. Para cada reacción, añadir: 8,25 μ l de dH₂O + 1,5 μ l de tampón de ligasa B (tapón blanco) + 0,25 μ l de enzima Ligasa - 65 (tapón verde). Mezclar bien pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo.
3. Prepare una mezcla principal de digestión-ligasa. Para cada reacción, añadir: 7,75 μ l de dH₂O + 1,5 μ l de tampón de ligasa B. A continuación, añadir 0,25 μ l de enzima Ligase-65 (tapa verde) y 0,5 μ l enzima *HhaI*. (Promega R6441, 10 unidades / μ l). Mezclar bien pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo.
4. Continuar con el programa del termociclador: pausa a 20 ° C. Retire los tubos del termociclador.
5. Añadir 3 μ l de tampón de ligasa A y 10 μ l de agua a cada tubo. Mezclar suavemente pipeteando hacia arriba y hacia abajo. Separar transfiriendo 10 μ l de toda la mezcla a un segundo tubo.
6. Coloque los tubos en el termociclador. Continuar el programa del termociclador: pausa a 48 ° C.
7. Cuando el termociclador esté a 48 ° C, añadir 10 μ l de la mezcla principal de Ligase-65 al primer tubo (número de copia prueba). Mezclar suavemente pipeteando hacia arriba y hacia abajo.
8. Añadir 10 μ l de la mezcla Ligase-Digestión al segundo tubo (prueba de metilación). Mezcle suavemente pipetando y abajo.
9. Continuar el programa del termociclador: 30 minutos de incubación a 48 ° C (para la ligadura y la digestión *HhaI*); 5 Minutos a 98 ° C para la inactivación por calor de las enzimas. Pausa a 20 ° C

Reacción por PCR (día 2)

1. Agite la SALSA PCR primer mix. Polimerasa, caliente durante 10 segundos en la mano para reducir la viscosidad.
2. Preparar la mezcla maestra de polimerasa añadiendo, para cada reacción: 3,75 μ l de dH₂O + 1 μ l de mezcla de imprimación de SALSA PCR (Tapón marrón) + 0,25 μ l SALSA Polimerasa (tapón anaranjado). Mezclar bien pipeteando hacia arriba y hacia abajo; No mezclar. Almacenar en hielo hasta su uso.
3. A temperatura ambiente, añadir 5 μ l de mezcla de polimerasa a cada tubo. Mezclar pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo. Continuar programa termociclador; 35 ciclos de 30 segundos 95 ° C; 30 segundos 60 ° C; 60 segundos 72 ° C. Fin Con 20 min de incubación a 72 ° C; Hacer una pausa a 15 ° C.

4. Después de la reacción PCR, no abra los tubos en la habitación con el termociclador. Para evitar la contaminación, utilice micropipetas diferentes para realizar reacciones de MLPA y manejo de productos de PCR MLPA.

5. El producto de la PCR puede almacenarse a 4 ° C durante 1 semana. Para períodos más largos, almacene entre -25 ° C / -15 ° C. Como los tintes fluorescentes son sensibles a la luz, almacenan los productos de PCR en caja oscura o envueltos en papel de aluminio.