



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E  
INVESTIGACIÓN  
SECRETARÍA DE SALUD  
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA**

**DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PACIENTES  
MEXICANOS CON SÍNDROME DE KLEEFSTRA 1**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA**

**PRESENTA:  
DR. GERARDO RODRÍGUEZ GONZÁLEZ**

**TUTOR:  
DR. CAMILO ERNESTO VILLARROEL CORTÉS**

**CO-TUTOR:  
DRA. VICTORIA DEL CASTILLO RUIZ**

**ASESORES:  
DRA. PATRICIA CRAVIOTO  
FÍS. MAT. FERNANDO GALVÁN CASTILLO**

**2022**

**CIUDAD DE MÉXICO 2022**



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.


**“DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PACIENTES MEXICANOS CON  
SÍNDROME DE KLEEFSTRA 1”**




**DR. JOSÉ NICOLÁS REYNÉS MANZUR  
DIRECTOR DE ENSEÑANZA**





**DR. MANUEL ENRIQUE FLORES LANDERO  
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PRE Y POSGRADO**



**DRA. VICTORIA DEL CASTILLO RUÍZ  
PROFESORA TITULAR DEL CURSO DE LA ESPECIALIDAD  
EN GENÉTICA MÉDICA  
COTUTORA DE TESIS**



**DR. CAMILO ERNESTO VILLARROEL CORTÉS  
TUTOR DE TESIS**



**DRA. PATRICIA CRAVIOTO QUINTANA  
FIS. MAT. FERNANDO GALVAN CASTILLO  
ASESORES METODOLÓGICOS**

## ÍNDICE

1.- ANTECEDENTES	
1.1 Definición del Síndrome de Kleefstra.....	4
1.2 Epidemiología del Síndrome de Kleefstra.....	4
1.3 Etiología del Síndrome de Kleefstra 1.....	5
1.4 <i>EHTM1</i> .....	6
1.5 Manifestaciones del síndrome de Kleefstra tipo 1.....	9
1.6 Diagnóstico del síndrome de Kleefstra tipo 1.....	10
1.7 Diagnóstico del diferencial síndrome de Kleefstra tipo 1.....	11
1.8 Manejo del síndrome de Kleefstra tipo 1.....	13
1.9 Asesoramiento.....	14
2.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
3.- JUSTIFICACIÓN.....	15
4.- OBJETIVOS	
4.1 General.....	16
4.2 Específicos.....	16
4.3 Secundarios.....	16
5.- METODOLOGÍA	
5.1 Tipo de estudio.....	16
5.2 Universo de estudio .....	16
5.3 Criterios de selección.....	16
5.3.1 Criterios de inclusión.....	17
5.3.2 Criterios de exclusión.....	17
5.4 Operacionalización de variables.....	18
5.5 Plan general.....	20
6.- TAMAÑO DE LA MUESTRA.....	20
7.- ANALISIS ESTADISTICO.....	21
8.- CONSIDERACIONES BIOÉTICAS.....	21
9.- RESULTADOS.....	22
10.- DISCUSIÓN.....	24
11.- CONCLUSIONES.....	25
12.- BIBLIOGRAFIA.....	26
13.- ANEXOS.....	31

## 1.- ANTECEDENTES

### 1.1 Definición del Síndrome de Kleefstra

Es un síndrome potencialmente reconocible que se debe en la mayoría de los casos a una deleción submicroscópica de la región 9q34.3, involucrando al gen *EHMT1* (607001 OMIM). Se caracteriza por discapacidad intelectual, rasgos autistas, hipotonía infantil y rasgos faciales distintivos. El espectro de discapacidad intelectual se presenta de moderado a severo en la mayoría de los pacientes, aunque algunos tienen un retraso leve y un coeficiente intelectual total dentro del rango bajo-normal. El área del desarrollo más afectada es el lenguaje, pero es posible la comunicación no verbal. Dentro de otros hallazgos se pueden encontrar defectos cardíacos, defectos renales o urológicos, defectos genitales en varones, infecciones respiratorias graves, epilepsia o convulsiones febriles, y trastornos psiquiátricos, tales como apatía extrema o características catatónicas después de la pubertad.

El síndrome de Kleefstra actualmente se considera dentro de un espectro clínico (KSS) ya que se han encontrado 5 genes, cuyas mutaciones pueden dar un fenotipo similar. Los genes identificados son: *EHMT1* (607001), *KMT2C* (606833), *MBD5* (611472), *SMARCB1* (601607) y *NR1I3* (603881), que codifican para reguladores epigenéticos interrelacionados. *EHMT1* se ha asociado al síndrome de Kleefstra 1 (KLEFS1), tema central de esta tesis. Mientras que el gen *KMT2C* se ha reportado en pacientes con el síndrome de Kleefstra tipo 2 (KLEFS2). *MBD5* y *SMARCB1* han sido reportados raramente en pacientes con fenotipo Kleefstra, y más comúnmente en pacientes con deleción 2q23.1 y Coffin-Siris 3. Existe un solo reporte de un paciente con fenotipo Kleefstra y mutación en *NR1I3*.

### 1.2 Epidemiología del Síndrome de Kleefstra

La deleción 9q34 se reconoció por primera vez después de estudios subteloméricos de FISH (Knight et al. 1999, Dawson et al. 2002) en niños con discapacidad intelectual de etiología desconocida y dismorfias. Después de la identificación de un individuo con un fenotipo similar y una translocación balanceada de novo con disrupción de *EHMT1*, se planteó la hipótesis de que la haploinsuficiencia de este

gen causa el fenotipo presente en individuos con la delección (Kleefstra et al. 2005). La identificación posterior de individuos adicionales con defectos *EHMT1* intragénicos llevó a OMIM a reconocer al síndrome con el epónimo Kleefstra. Desde principios de la década de 1990, se han descrito 85 pacientes, de los cuales la mayoría tuvo una microdelección 9q34.3 (> 85%). Las cifras confiables sobre penetrancia aún no están disponibles, pero parece tener penetrancia completa. Según los datos de otros trastornos raros que involucran discapacidad intelectual (McRae et al. 2017), se estima que el síndrome de Kleefstra afecta al menos a 1:120,000 personas. De acuerdo con la prevalencia e incidencia de enfermedades raras reportada en 2019 por ORPHANET, existen 114 casos reportados en el mundo; 86 casos debido a la microdelección de 9q34 y 23 casos por mutación puntual, y no todos los reportes de estas variantes cuentan con descripción clínica del paciente. Como muchas personas con esta afección no son diagnosticadas, la verdadera prevalencia puede ser mucho mayor. El síndrome se ha identificado en todos los grupos étnicos, afectando a hombres y mujeres por igual. En México no hay un reporte formal, pero en literatura gris (Diario de Coahuila, septiembre del 2017), hay dos casos referidos. Un masculino de 5 años de edad en Saltillo, Coahuila y una femenina en el estado de Michoacán.

### **1.3 Etiología del Síndrome de Kleefstra tipo 1**

Como se mencionó, KLEFS1 (610253 OMIM) puede ser causado por una microdelección en la región cromosómica 9q34.3 o por una mutación en el gen de la eucromatina histona metiltransferasa 1 (*EHMT1*).

En 28 individuos no relacionados con la delección 9q34.3, se identificaron tres categorías distintas (Yatsenko et al. 2009):

- 50% de deleciones terminales
- 25% de deleciones intersticiales
- 25% de reordenamientos complejos o cromosomas derivados

Como en otros síndromes de microdelección, tanto las deleciones terminales como las intersticiales han sido demostradas o consideradas de *novo*. Sin embargo, en tres familias se demostró que uno de los padres tenía una delección de tipo mosaico

somático. En una familia, un padre con dificultades de aprendizaje tenía dos hijos gravemente afectados; y en otra familia, un padre con dificultades de aprendizaje tuvo un hijo afectado (Willemsen et al. 2011, de Boer et al. 2018).

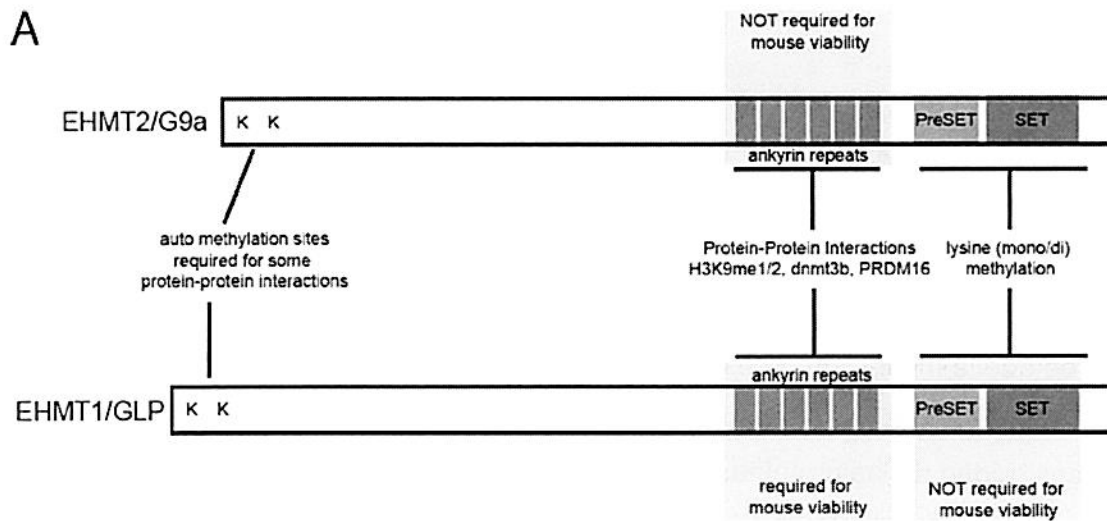
#### **1.4 EHMT1**

El gen *EHMT1* se localiza en el cromosoma 9q, región 3, banda 4, sub banda 3. Está constituido por 27 exones, y su sitio de inicio de la traducción (codón ATG) se localiza en el exón 1. Codifica para la proteína eucromatina histona metiltransferasa 1, un polipéptido de 1298 aminoácidos cuya función es la metilación de histonas. Se cree que la metilación de estas colas de histonas (en especial histonas H3 lisina 9 y 27 (H3K9 and H3K27)) regula el proceso de plegamiento del ADN, alterando así la accesibilidad de las proteínas que median la transcripción (Martin y Zhang 2005). La expresión restringida de *EHMT1* en el cerebro del ratón (bulbo olfatorio, pared ventricular anterior / ventral, hipocampo y corteza piriforme) respalda el papel de la modificación epigenética de histonas en el desarrollo normal del cerebro (Kleefstra et al. 2005). En humanos, solo se ha estudiado el efecto en la proteína de las variantes más comúnmente descritas el *KLEF1*, las que provocan corrimiento en el marco de lectura y las de sentido erróneo. Se realizaron ensayos *in vitro* de la actividad enzimática de la histona metiltransferasa y se encontró que las variantes C1073Y y R1197W impactan severamente sobre la actividad de la enzima formando también heterocomplejos con G9a, esenciales para la función *in vivo* y en modelos murinos (Yamada et al. 2018). Además, las personas con mosaicismo en *EHMT1* parecen tener una mayor vulnerabilidad para desarrollar psicopatología severa, especialmente trastorno del espectro autista y trastornos del estado de ánimo. Aunque a primera vista parecen estar bien adaptados en su funcionamiento diario, pueden experimentar síntomas psiquiátricos significativos y mostrar una flexibilidad cognitiva reducida en comparación con la población general (de Boer et al. 2018).

Las EHMT se caracterizan por la presencia de un dominio N-terminal SET y Pre-SET, precedido por una serie de repeticiones de ankirina (ANK) (Shinkai y Tachibana 2011) (Figura 1). El dominio SET / Pre-SET pertenece a una familia con



dominio evolutivamente conservado que cataliza mono, di o tri-metilación de residuos de lisina.



**Figura 1.** Dominios proteicos de las isoformas de EHMT mediadores de metilación de histonas.

Las EHMT sirven como mediadores de H3K9me1/2 *in vivo*. H3K9me2 está asociado con regiones eucromáticas reprimidas del genoma, en contraste con H3K9me3, que se encuentra principalmente en heterocromatina pericéntrica (Peters et al. 2003, Rice et al. 2003). Las repeticiones ANK de las proteínas EHMT son necesarias para las interacciones proteína-proteína. Principalmente por su capacidad de interactuar con H3K9me1 y H3K9me2 (Collins et al. 2008). Esto ha llevado a la opinión general de que las proteínas EHMT reprimen la transcripción de genes eucromáticos a través de la dimetilación H3K9 en los genes blanco.

Las proteínas EHMT son bastante grandes, van desde 130 hasta 185 kDa, sin embargo, la función de la vasta mitad N-terminal de la proteína no está caracterizada en gran medida, con la excepción de dos residuos de lisina N-terminal que pueden ser auto metilados (Sampath et al. 2007, Chang et al. 2011). Se requiere de la metilación de estos sitios para las interacciones proteína-proteína (Lanouette et al. 2014). Además de la autometilación, se sabe que las proteínas EHMT metilan una serie de otras proteínas que no son histonas.



En general, el mecanismo preciso de la regulación transcripcional mediada por EHMT y el papel de los EHMT en los procesos celulares y de desarrollo siguen siendo poco conocidos. Los estudios iniciales indicaron que G9a y GLP (denominación original de EHMT2 y EHMT1) están presentes en un complejo heterodimérico, y que esta conformación es necesaria para su actividad catalítica (Tachibana 2002). Sin embargo, informes posteriores han demostrado que G9a y GLP poseen funciones fisiológicas independientes (Ohno et al. 2013, Liu et al. 2015), lo que sugiere que la formación de un complejo heterodimérico puede depender del tejido y la etapa de desarrollo que se está investigando.

La haploinsuficiencia resultante de la delección o inactivación de un alelo *EHMT1* es la causa del KLEFS1. La mayoría de las variantes patogénicas alteran el marco de lectura de *EHMT1* y es probable que no se traduzcan, pues se pronostica que conducirán a una degradación del mensajero mediada por variantes sin sentido. La única variante sin sentido patogénica descrita hasta la fecha, de traducirse, tendría influencia en la conformación local del dominio pre-SET de la proteína EHMT1, lo que refleja un alelo nulo (Kleefstra et al. 2009). Además de *EHMT1*, otros genes asociados con discapacidad intelectual (por ejemplo, *MECP2*, *RSK2* y *XNP*) parecen desempeñar un papel en la remodelación de la cromatina (Ausió et al. 2003). La pérdida de la regulación adecuada de la estructura de la cromatina puede dar como resultado la desregulación de la transcripción de otros genes y la consecuente expresión inapropiada de proteínas. Esto a su vez puede contribuir a diferentes trastornos genéticos complejos, incluida la discapacidad intelectual.

Además de la discapacidad intelectual, la pérdida de la función de *EHMT1* ocasiona también la mayoría de las características del síndrome, pues los datos actuales indican que las personas con una variante patogénica intragénica *EHMT1* y aquellas con una pequeña delección 9q34.3 (<1 Mb) tienen hallazgos clínicos similares. Sin embargo, las personas con delecciones más grandes ( $\geq 1$  Mb) generalmente tienen una discapacidad intelectual más grave y mayor riesgo de anomalías congénitas, problemas de alimentación y problemas respiratorios, especialmente infecciones pulmonares y aspiración. Las delecciones pueden ser de ambos orígenes parentales;

en el estudio de Yatsenko et al. (2009) reportan que en 19 familias estudiadas se encontraron 11 pacientes con delección de novo 9q de origen paterno (65%) mientras que el resto fue de origen materno.

### **1.5 Manifestaciones clínicas del Síndrome de Kleefstra tipo 1**

La mayoría de los pacientes con KLEFS1 presentan inicialmente hipotonía y retraso psicomotor; la mayoría logra la marcha a los 3 años y posteriormente discapacidad intelectual sin desarrollo del lenguaje verbal. Además, presentan microcefalia, braquicefalia, y rasgos faciales distintivos tales como: hipertelorismo, sinofris, hipoplasia medio facial, hélix grueso, nariz corta con fosas nasales antevertidas y arco de cupido marcado o apariencia en "carpa" del bermellón del labio superior, lengua protuberante, labio inferior evertido y prognatismo. Con la edad, la apariencia facial se vuelve más tosca, con persistencia de retrusión medio facial y prognatismo. Se han observado también anomalías dentales, específicamente dientes neonatales y retención de la dentición primaria (Kleefstra et al. 2007).

Los afectados nacen con peso alto para la edad y durante la niñez cursan con obesidad en un 20% (Willemsen et al. 2012). Además, estos hallazgos se pueden acompañar de defectos cardíacos destacando los conotruncales en el 50% de los casos reportados, tales como defectos septales, tetralogía de Fallot, coartación aortica, válvula aortica bicúspide o estenosis pulmonar.

Los defectos renales, se observan hasta en 30% de las personas afectadas, comprenden reflujo vesicoureteral, hidronefrosis, quistes renales e insuficiencia renal crónica. Se reportan defectos genitales como hipospadias, criptorquidia y pene pequeño en el 30% de los hombres.

Otras alteraciones de sistema nervioso central son convulsiones en un 30%, que van desde tónico clónicas hasta complejas parciales. Las estructuras cerebrales son normales en la mayoría de los sujetos, pero algunos mostraron ventrículos dilatados, mielinización anormal u otros cambios leves. Los que alcanzan la edad adulta mostraron cambios de comportamiento abruptos alrededor de la adolescencia con alguna recuperación posterior. Las anomalías incluyeron apatía, períodos agresivos, psicosis, características autistas, catatonía, trastorno del

estado de ánimo bipolar y regresión en la función diaria y las habilidades cognitivas (Verhoeven et al. 2010).

Algunos pacientes pueden presentar hipermetropía, sordera conductiva y neurosensorial desde edades tempranas, también se ha observado traqueo/broncomalacia con insuficiencia respiratoria.

### **1.6 Diagnóstico del Síndrome de Kleefstra tipo 1**

KLEF1 se ha sospechado en pacientes con los siguientes datos: por discapacidad intelectual, dismorfias faciales e hipotonía durante la infancia. En los pacientes con sospecha de este síndrome se ve afectada mayormente el área del lenguaje, también es posible encontrar hipermetropía, sordera sensorial y/o conductiva, retraso del desarrollo motor, defectos cardíacos y renales, infecciones respiratorias recurrentes, epilepsia, autismo, trastornos de la conducta, apatía severa y defectos estructurales del sistema nervioso central como: hipoplasia de cuerpo caloso, hipoplasia cortical y defectos en la sustancia blanca (He et al. 2016).

La mayoría de los casos han sido confirmados mediante la técnica de Hibridación in situ con fluorescencia (FISH) que permite el diagnóstico de más del 85% de la etiología reportada en la literatura, sin embargo, el FISH no puede detectar deleciones de <50-100 kb de manera confiable y no se indica rutinariamente. La deleción típica 9q34.3 no puede identificarse mediante análisis cromosómico de rutina (Cariotipo con bandas G). En raras ocasiones, el síndrome de Kleefstra puede ser causado por un reordenamiento cromosómico balanceado que interrumpe la expresión de *EHMT1*. Si esto se sospecha, se puede considerar el análisis de cariotipo y FISH para la región 9q34.3. Cabe mencionar que varios casos con deleción cromosómica se identificaron mediante panel de FISH con sondas subteloméricas, estrategia que ha caído en desuso y ha sido sustituida actualmente por técnicas de microarreglos cromosómicos (CMA). Ambas estrategias son bastante más costosas que el FISH de sonda única, pero no requieren una sospecha clínica a priori.

En el resto de los casos, el diagnóstico se confirma con estudio molecular, ya sea encontrando una deleción intragénica o una variante patogénica del gen *EHMT1*.

Aproximadamente el 5% de las personas con síndrome de Kleefstra tienen una deleción intragénica detectable por un ensayo diseñado para detectar deleciones o duplicaciones de un solo exón (por ejemplo, amplificación múltiple de sondas dependiente de la ligadura (MLPA) o qPCR). Las deleciones que no son intragénicas, pero demasiado pequeñas para ser detectadas por CMA (por ejemplo, que contienen la última parte de *C90RF37* y el primer exón de *EHMT1*) requieren otros métodos como CMA dirigida a genes diseñados para esta región (Yatsenko et al. 2009).

Una de las series sometidas a microarreglos para este síndrome es la de Yatsenko et al. (2009), en donde se caracterizaron a 28 pacientes, incluyendo 2 casos reportados por Iwakoshi et al. en 2004. En el estudio de Simovich et al. (2007) se utilizaron para diagnóstico prenatal en producto con cariotipo 46,XY,t(2;9)(q11.2;q34). La serie más grande reportada con esta metodología es la de Shao et al. (2008) con una muestra de 5380 individuos con discapacidad intelectual, aunque no reportaron pacientes con la deleción 9q34.3.

### **1.7 Diagnóstico Diferencial del Síndrome de Kleefstra tipo 1; Síndromes "Down syndrome-like"**

El diagnóstico diferencial es amplio, pues incluye síndromes que cursan con retraso del desarrollo, hipotonía infantil, baja estatura, dismorfias faciales y alteración conductual. Sin embargo, las entidades que destacan por el aspecto facial similar son las denominadas "tipo Down" (Down syndrome-like en inglés) que se pueden distinguir mediante análisis citogenético o molecular.

El Síndrome de Down (trisomía 21) con una prevalencia de 1/750 recién nacidos vivos es el primer diagnóstico diferencial para descartar. Los afectados, además de la hipotonía y el retraso del desarrollo, comparten características faciales tales como: braquicefalia, protrusión lingual, telecanto y perfil plano (Antonarakis et al. 2020).

El síndrome de Smith-Magenis con una prevalencia de 1/15 000, debido a una deleción o mutación de *RAI1* en 17p11.2, presenta letargia, trastornos del sueño y perfil plano, telecanto y sinofris que pueden encontrarse también en KLEF1. Los

casos son de *novo*. Aproximadamente el 95% de las personas con síndrome de Smith-Magenis tienen el trastorno como resultado de una deleción intersticial 17p11.2, que puede haber sido excluida previamente por FISH (Falco, Amabile, Acquaviva 2017).

También se deben considerar como diagnósticos diferenciales las polisomías de cromosomas sexuales como: variante de Klinefelter XXXXY que se presenta en 1/100 000 varones, presenta talla baja, trastornos de conducta y discapacidad intelectual además de hipotonía y epilepsia en algunos casos. Otra polisomía a considerar es el síndrome triple X con una prevalencia de 1/1000 recién nacidas que presentan epicanto, clinodactilia, hipotonía en la infancia y epilepsia (Tartaglia et al. 2010). El síndrome de Jacobs XYY con una prevalencia 1/1000 varones presenta hipotonía, clinodactilia, hipertelorismo, epilepsia y discapacidad intelectual por lo que debe ser tomado en cuenta como diferencial en varones.

El síndrome de Ayme-Gripp o Fine Lubinsky con tan solo 10 casos reportados en el mundo se caracteriza por retraso psicomotor, braquicefalia con puente nasal deprimido, nariz pequeña, microstomía, paladar hendido, cataratas, sordera, escroto hipoplásico y anomalías digitales. Este síndrome es causado por el gen *MAF* cuyo locus es 16q23.2 y es diagnóstico diferencial de *KLEF1* (Niceta et al. 2015).

Entre otras entidades diferenciales sin semejanza con Down, se describen los síndromes, habitualmente esporádicos, de Pitt-Hopkins y de Angelman. El primero con solo 50 casos reportados en el mundo, comparte retraso en el lenguaje, convulsiones y trastornos del sueño con *KLEF1*. Este síndrome es causado por haploinsuficiencia del gen *TCF4* (Zollino et al. 2019). En el síndrome de Angelman, con una prevalencia de 1/10 000, al igual que en *KLEF1* se puede presentar: lenguaje receptivo mejor que habilidades de lenguaje expresivo, trastornos del sueño con múltiples despertares y perfil plano con prognatismo. Su etiología se debe a la falta de expresión del alelo materno de *UBE3A* por una deleción en la mayoría de los casos (Buiting, Williams, Horsthemke 2016).

Finalmente, *KLEF1* debe diferenciarse de los raros fenotipos asociados a *KMT2C* y la haploinsuficiencia de *MBD5* o *SMARCB1*. Como ya fue mencionado, *KMT2C* es

responsable del síndrome Kleeftstra tipo 2, y el resto de los genes se han asociado con un fenotipo similar, aunque en muy pocos casos (Kleeftstra et al. 2006b).

En concreto, para fines de este protocolo de tesis un paciente "Down syndrome-like" será aquel paciente con retraso del neurodesarrollo/discapacidad intelectual en cuya evaluación diagnóstica, se haya considerado como diferencial y posteriormente descartado la posibilidad de Síndrome de Down mediante cariotipo. En el Departamento de genética no existe un conteo formal de cuantos casos "Down syndrome-like" se atienden anualmente, pero por experiencia clínica del investigador, se ven uno o 2 casos al mes de pacientes dismorfológicos cuyo fenotipo facial hizo considerar este diagnóstico.

### **1.8 Manejo del Síndrome de Kleeftstra tipo 1**

El manejo y tratamiento se desglosa a continuación por aparatos y sistemas afectados. Se debe valorar el estado nutricional del paciente sobre todo en mayores de dos años, y en menores revisar sintomatología de reflujo gastroesofágico. Si se diagnostica obesidad se debe referir al nutriólogo. También requieren evaluación dental completa para detectar y tratar retenciones en la dentición primaria, evaluación ocular para descartar errores de refracción, los cuales se tratan de manera convencional. Evaluación audiológica por riesgo de hipoacusia, con indicación de auxiliar auditivo en caso de requerirlo. Se debe realizar electrocardiograma y ecocardiograma para evaluar defectos cardíacos estructurales y trastornos del ritmo, en caso de presentar estas alteraciones se referirá al cardiólogo. También ultrasonografía renal para descartar alteraciones estructurales renales e hidronefrosis (Kleeftstra de Leeuw 2019).

Se deben valorar los hitos del desarrollo con especial atención en el área motora y del lenguaje. En el aspecto neuropsiquiátrico, requieren evaluación del sueño, y en caso de encontrar alteraciones, referencia a la clínica del sueño. Además, evaluación por neurología, electroencefalograma ante la sospecha de crisis convulsivas y resonancia magnética si hay convulsiones o trastorno del movimiento, apatía / catatonía extrema, o regresión en el desarrollo psicomotor (Vermeulen et al. 2017). La evaluación psiquiátrica es necesaria en mayores de 12 años, debido a



posibles problemas de comportamiento, incluidos trastornos del sueño, problemas de humor, trastornos psicóticos, ansiedad o rasgos sugestivos de TEA (Trastorno de espectro autista) (Samango-Sprouse et al. 2016).

### **1.9 Asesoramiento Genético**

KLEFS1 se puede heredar de manera autosómica dominante a partir de un afectado, pero casi todos los casos reportados hasta la fecha han sido esporádicos, que corresponden a mutaciones *de novo*. Se ha reportado recurrencia familiar cuando un padre tiene una translocación balanceada que involucra la región 9q34.3 o mosaicismo para una delección intersticial 9q34.3. (Kleefstra, de Leeuw 2019), y aunque es una situación rara, esto justifica el estudiar a los padres de los casos positivos y brindarles asesoramiento genético de acuerdo a sus resultados. A excepción de los individuos con mosaicismo somático para una delección 9q34.3, no se sabe que ningún individuo con síndrome de Kleefstra con descendencia, pues la discapacidad intelectual es una limitante para la reproducción (de Boer et al. 2018).

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA (PREGUNTA DE INVESTIGACION).**

El síndrome de Kleefstra tipo I (KLEFS1) se debe, mayoritariamente a una microdelección en el cromosoma 9q34.3, que involucra al gen EHMT1 y que se puede evidenciar por estudio de hibridación fluorescente in situ (FISH). Se caracteriza por discapacidad intelectual, rasgos autistas, hipotonía infantil, alteraciones conductuales y rasgos faciales que pueden ser reconocibles.

Estudios previos han sugerido que KLEFS1 se encuentra subdiagnosticado y por lo general los casos han sido identificados mediante estudios no dirigidos a sospecha específica, tales como CMA. Al respecto, no existen reportes o estudios formales sobre esta entidad en México, ya que hasta ahora sólo se conocen 2 casos de KLEFS1, uno proveniente del Estado de Coahuila y otro del Estado de Michoacán, lo que limita el conocimiento acerca del espectro particular de manifestaciones fenotípicas y del pronóstico de los afectados en nuestra población.



KLEFS1 es un diagnóstico diferencial incluido en los síndromes que cursan con retraso del desarrollo y un fenotipo facial que recuerda a síndrome de Down (Down syndrome-like). Esta característica hace posible la sospecha dirigida que se puede confirmar sin la necesidad de estudios altamente costosos como los CMA. Por lo tanto, nos planteamos la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuáles son las características de los pacientes con síndrome de Kleefstra 1 diagnosticados a partir de pacientes con discapacidad intelectual y dismorfias "Down-like"?

### 3. JUSTIFICACIÓN

El síndrome de KLEFS1 impacta sobre la calidad de vida de los pacientes y sus familias, ya que principalmente condiciona una discapacidad intelectual moderada a grave. Además, conlleva un costo económico significativo; de acuerdo al programa TELETON en México, cuesta alrededor de \$250,000 al año la rehabilitación de niños con discapacidad intelectual, retraso psicomotor y rasgos autistas.

Carecemos de conocimiento acerca de esta entidad en nuestra población, con respecto a su frecuencia en la población infantil, etiología citogenética, espectro de manifestaciones y pronóstico.

La técnica de FISH y la técnica de cariotipo son asequibles en nuestro medio, y permitirán realizar el diagnóstico, definir la etiología citogenética y posible herencia. Los resultados de este estudio son importantes ya que pueden brindarnos el conocimiento acerca de las características clínicas, citogenéticas de este síndrome en nuestra población. Además, su difusión podrá facilitar el diagnóstico de futuros casos.

### 4. OBJETIVOS.

#### 4.1 Objetivo General

Caracterizar al síndrome de Kleefstra tipo I (microdelección 9q34.3) en pacientes con abordaje de discapacidad intelectual y dismorfias Down syndrome-like del Instituto Nacional de Pediatría.

## **4.2 Objetivos Específicos**

Por medio de la detección por FISH o alternativamente CMA a tales casos:

2-Describir las características demográficas en pacientes positivos.

3-Describir las características citogenéticas en pacientes positivos.

4-Describir las características clínicas, incluidas las referidas en el expediente clínico en pacientes positivos.

5-Documentar mediante fotografías el fenotipo facial de los pacientes positivos.

6-Mediante la realización de FISH y en su caso cariotipo a los padres de pacientes positivos, establecer si se trata de un caso de novo o heredado por algún rearrreglo cromosómico familiar.

## **4.3 Objetivos secundarios**

1-Estimar frecuencia del síndrome de Kleeftstra tipo I (microdelección 9q34.3) en pacientes con abordaje de discapacidad intelectual y dismorfias tipo Down del Instituto Nacional de Pediatría.

## **5. MATERIAL Y METODO.**

### **5.1 Tipo de estudio**

Observacional, descriptivo, ambispectivo.

### **5.2 Universo de estudio**

#### **POBLACIÓN OBJETIVO**

Pacientes pediátricos mexicanos con retraso del neurodesarrollo/discapacidad intelectual y dismorfias faciales que recuerdan al síndrome de Down (Down syndrome-like)

#### **POBLACIÓN ELEGIBLE**

Pacientes con retraso del neurodesarrollo/discapacidad intelectual y dismorfias "Down syndrome-like" sin diagnóstico, atendidos por el servicio de Genética Humana en el Instituto Nacional de Pediatría (INP) de la Secretaría de Salud Federal durante el periodo de marzo del 2020 a marzo del 2023.

### 5.3 Criterios de selección

#### CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1. Niños y niñas con retraso del neurodesarrollo/discapacidad intelectual y dismorfias "Down syndrome-like" sin diagnóstico establecido.
2. Edad entre 0 años y 17 años 11 meses.
3. Con expediente clínico disponible.
4. Cuyos padres acepten que sus hijos participen en el estudio y firmen las cartas de asentimiento y consentimiento informado.

#### CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

1. Pacientes con estudio de CMA (microarreglos cromosómicos).

### 5.4 Operacionalización de variables

Variable Independiente	Definición	Indicadores	Unidades	Escala de Medición	Estadísticas
<b>Edad</b>	Es el tiempo de vida desde el nacimiento hasta la fecha actual.	Años, meses y días	Frecuencia (%)	Intervalo	Paramétrica
<b>Sexo</b>	Estará acorde a los genitales externos del paciente. Ésta variable es importante para determinar la frecuencia en el genero	Femenino Masculino	Frecuencia (%)	Nominal	No paramétrica

<b>Resultado del FISH</b>	Se refiere a si es positivo o negativo para la delección 9q34.3	Positivo Negativo	Frecuencia (%)	Nominal	No paramétrica
<b>Grado de coeficiente Intelectual CI</b>	Es un estimador de la inteligencia general resultado de alguno de los test estandarizados.	Normal >99 Leve (55-69) Moderado (35-54) Severo (20-34)	Frecuencia	Intervalo	Paramétrica
<b>Rasgos autistas</b>	Deficiencias persistentes en la comunicación y en la interacción social y patrones restrictivos y repetitivos de comportamiento, intereses o actividades.	Presentes Ausentes	Frecuencia (%)	Nominal	No paramétrica
<b>Cardiopatía</b>	Tipo de enfermedad que afecta el corazón o los vasos sanguíneos.	Presente Ausente	Frecuencia (%)	Nominal	No paramétrica
<b>Defecto cerebral</b>	Daño en el sistema nervioso o defecto en el desarrollo estructural.	Presente Ausente	Frecuencia (%)	Nominal	No paramétrica
<b>Protrusión lingual</b>	La lengua empuja contra o entre los dientes mientras esta en reposo, deglute o habla.	Presente Ausente	Frecuencia (%)	Nominal	No paramétrica

<b>Perfil plano</b>	Ausencia de concavidad o convexidad de la cara cuando es visto de perfil.	Presente Ausente	Frecuencia (%)	Nominal	No paramétrica
<b>Sinofris</b>	Encuentro de las cejas mediales en la línea media.	Presente Ausente	Frecuencia (%)	Nominal	No paramétrica
<b>Hipertelorismo</b>	Distancia interpupilar por encima del percentil 97 (0-15 años de edad).	Presente Ausente	Frecuencia (%)	Nominal	No paramétrica
<b>Hipoplasia medio facial</b>	Posicionamiento posterior y / o acortamiento vertical de la región infraorbital y perialar, o aumento de la concavidad de la cara y / o ángulo nasolabial reducido.	Presente Ausente	Frecuencia (%)	Nominal	No paramétrica
<b>Narinas antevertidas</b>	La punta de la nariz está hacia arriba y está superior a la base nasal.	Presente Ausente	Frecuencia (%)	Nominal	No paramétrica
<b>Prognatismo</b>	Protrusión anterior de la cresta alveolar mandibular más allá del plano vertical de la cresta alveolar maxilar, mejor apreciado de perfil.	Presente Ausente	Frecuencia (%)	Nominal	No paramétrica
<b>Convulsiones</b>	Contracción involuntaria, violenta y patológica de un	Presente Ausente	Frecuencia (%)	Nominal	No paramétrica

	músculo o de otra parte del cuerpo.				
<b>Arco de cupido marcado</b>	Picos paramedios y mediana más pronunciados y muesca del arco de Cupido.	Presente  Ausente	Frecuencia (%)	Nominal	No paramétrica

### 5.5 Plan general

Se tomará una muestra de sangre periférica de 5ml mediante venopunción de los pacientes que cumplan con los criterios de inclusión; posteriormente se utilizará FISH o alternativamente CMA para la detección de la deleción 9q34.3. A los casos positivos se les tomarán dos fotografías para documentar a detalle el fenotipo facial. A los padres de los casos positivos se les tomará una muestra de sangre periférica para realizar FISH en ellos y en caso de detectar algún hallazgo sugestivo de rearreglo cromosómico, se les realizará cariotipo. Todos los resultados citogenéticos se les brindarán a los padres. Una vez obtenidos los resultados, se realizará un análisis descriptivo con los datos de la información clínica, incluyendo la consignada en el expediente clínico y demográfica de los pacientes positivos a la deleción (Ver Anexos para descripción detallada de las técnicas).

### 6. TAMAÑO DE LA MUESTRA

Se trata de una entidad rara con 144 casos reportados a nivel mundial, por lo que se incluirán sin muestreo y de manera exhaustiva todos los casos que cumplan los criterios de inclusión.

### 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se presentarán los resultados clínicos y moleculares solo mediante la realización de estadística descriptiva. Este análisis estadístico descriptivo se llevará a cabo con

el apoyo del programa Excel versión 2010 (Microsoft). Sustentada en la base de datos del proyecto.

## 8. CONSIDERACIONES BIOÉTICAS

Los pacientes y sus padres serán invitados a participar en el estudio, el cual es mínimamente invasivo (venopunción para obtener 5ml de sangre), se les explicarán las características y objetivos del estudio y su aceptación será por escrito mediante firma de carta de consentimiento informado, donde se especifican las ventajas y posibles riesgos para los participantes. Por ser un estudio que implica un diagnóstico causal, el resultado del FISH o alternativamente CMA será proporcionado a los padres por el médico responsable del proyecto. Una vez concluido el estudio, las muestras de los pacientes serán desechadas o almacenadas de acuerdo a la voluntad expresada por los participantes. Aquellos que opten por el almacenamiento de la muestra conocerán el uso del mismo en otros estudios del mismo síndrome y se les pedirá nuevo consentimiento informado; de la misma manera, podrán retirar su muestra del cuando así lo decidan. La información personal de identidad y los resultados se manejarán en forma estrictamente confidencial. El proyecto se centrará en las siguientes consideraciones bioéticas: Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. Adoptada por la 18 Asamblea Médica Mundial, Helsinki, Finlandia, Junio 1964, y enmendada por la 29 Asamblea Médica Mundial, Tokio, Japón, Octubre 1975, 35 Asamblea Médica Mundial, Venecia, Italia, Octubre 1983, 41 Asamblea Médica Mundial, Hong Kong, Septiembre 1989, 48 Asamblea General, Somerset West, Sudáfrica, Octubre 1996 y la 52 Asamblea General, Edimburgo, Escocia, Octubre 2000. Nota de clarificación sobre el párrafo 29 añadida por la Asamblea General, Washington 2002. El uso de la información de datos genéticos humanos en este estudio se fundamenta en el inciso b del artículo 9 de la Declaración Internacional sobre Datos Genéticos Humanos aprobada por unanimidad en la 32ª sesión de la Conferencia General de la UNESCO el 16 de octubre de 2003.



## 9.- RESULTADOS

En esta tesis, además de la construcción formal del protocolo, se lograron reclutar a 3 pacientes para un estudio inicial exploratorio del síndrome de Kleefstra tipo 1; dos masculinos y un femenino que cumplían los criterios de selección. No se contó con la obtención de la sonda específica para realizar el estudio de FISH, sin embargo, se pudo obtener el recurso para la realización de estudio de CMA.

Los CMA que se utilizaron para este estudio exploratorio fueron del tipo hibridación genómica comparativa (aCGH's), donde se emplean secuencias únicas de oligonucleótidos de alrededor de 60 pares de bases de longitud que hibridan en el DNA del paciente problema y el control, pudiendo identificar ganancias o pérdidas en el número de copias (CNV's) en el paciente comparando con el control, exón por exón dependiendo de la resolución de los oligonucleótidos y a partir de una muestra de sangre periférica. El análisis de este estudio no arrojó ningún desbalance o CNV patogénico en la región 9q34 y tampoco en el resto de genoma en ninguno de los 3 pacientes. (Anexos)

### Paciente 1

Femenino de 11 años de edad, madre y padre de 25 años de edad al momento del embarazo, niegan consanguinidad, endogamia negativa, sin antecedentes familiares similares, embarazo normoevolutivo. La paciente tiene un peso de 20 kg (p75), talla 106.5 cm (p50) PC 48 cm (p50). Presenta hipoplasia del tercio medio facial, tendencia a la sinofris, puente nasal plano, fosas nasales antevertidas y clinodactilia bilateral del quinto dedo. Comunicando habilidades con el lenguaje de señas y retraso en el desarrollo neurológico, tiene antecedentes de neumopatía por aspiración, foramen oval permeable y malrotación intestinal. Somatometría apropiada para la edad. Resonancia magnética cerebral que informa áreas focales probables de gliosis en la sustancia blanca subcortical frontoparietal de tipo inespecífico. La polisomnografía informa una leve apnea obstructiva del sueño. Reporte de cariotipo 46, XX [15] 450-550 bandas de resolución G, FISH .ish 17p11.2 (SMSX2) [15]. aCGH normales.

### Paciente 2

Masculino de 4 años de edad, madre de 25 y padre de 31 años de edad al momento del embarazo, niegan consanguinidad, endogamia negativa, sin antecedentes familiares similares, embarazo con antecedente de hiperémesis gravídica y preeclampsia. El paciente tiene un peso de 12.8 kg (Z-2.81), talla 96 cm (Z-2.17) PC 45 cm (Z-4). Presenta microcefalia, braquidactilia, tendencia a sinofris, fisuras palpebrales dirigidas hacia arriba, clinodactilia del quinto dedo del pie bilateral, pie equino varo bilateral. Solo dice 3 palabras, comportamiento obsesivo, rabietas, apenas duerme y retraso en el desarrollo neurológico. Somatometría por debajo de los percentiles de población. aCGH normales.

### Paciente 3

Masculino de 9 años de edad, madre de 34 y padre de 35 años de edad al momento del embarazo, niegan consanguinidad, endogamia negativa, sin antecedentes familiares similares, embarazo normoevolutivo. El paciente tiene un peso de 24.6 kg (p50-75), talla 124 cm (p50) PC 49 cm (p<3). Presenta microcefalia, puente nasal deprimido e hipoplasia del tercio medio facial. Tiene alteraciones del comportamiento, retraso en el desarrollo neurológico, antecedentes de comportamiento autodestructivo y retraso en el lenguaje. Somatometría normal. El cariotipo informa bandas G de resolución 46, XY [15] 450-550, FISH .ish 17p11.2 (SHMT1, TOP3, FL11, LLSI2) x2 [15] y aCGH normales.

## 10.- DISCUSIÓN

En la literatura se ha reportado que en un 15% el síndrome de Kleefstra tipo 1 se debe a variantes puntuales en el gen *EHMT1*, la detección de estas variantes se puede realizar a través de estudios de secuenciación del gen. Ya sea por Sanger o secuenciación de nueva generación o masiva en paralelo. Es probable que estos pacientes presenten una variante intragénica que condicione esta entidad debido a que cumplen con las características clínicas y fenotípicas antes descritas para el síndrome de Kleefstra tipo 1. Además, otras posibilidades diagnósticas de tipo cromosómico, incluyendo las submicroscópicas, fueron razonablemente descartadas por medio de los estudios de cariotipo y de los mismos CMA. Otro dato a destacar es que en dos de los tres casos incluyeron en su abordaje previo la realización de FISH 17p11.2 para descartar la delección causal del síndrome de Smith-Magenis. Como se mencionó en los antecedentes esta entidad también se considera diferencial con el síndrome de Down y al igual que en el síndrome de Kleefstra, una minoría de casos son ocasionados por mutaciones puntuales (en el gen *RAI1*) que no se pueden detectar por medio de los estudios de FISH y de CMA. El tipo de CMA que se realizó no detecta la presencia de pérdidas de heterocigocidad (LOH), que pueden indicar disomía uniparental. Sin embargo, esta posibilidad la consideramos remota tanto por su baja frecuencia como por que el fenotipo de los casos no sugiere alguno de los cuadros conocidos asociados a regiones de impronta en el genoma. Finalmente, por lo arriba expuesto, consideramos que estos tres pacientes deben seguir su abordaje diagnóstico ya sea mediante la secuenciación dirigida del gen *EHMT1* o más convenientemente mediante exoma clínico, estudios que en este momento escapan al alcance de este trabajo.

## 11.- CONCLUSIONES

Basados en la revisión de la literatura, este trabajo nos permitió redefinir los criterios de sospecha para el síndrome de Kleefstra tipo 1, creemos que estos tres pacientes tienen una variante intragénica que condiciona la enfermedad. En el Instituto Nacional de Pediatría y en México se encuentra subdiagnosticada esta entidad, por lo que se deben encontrar los recursos necesarios para diagnosticar este síndrome y así poder ofrecer un asesoramiento, pronóstico y tratamiento más dirigido y personalizado a los pacientes.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

Antonarakis, S. E., Skotko, B. G., Rafii, M. S., Strydom, A., Pape, S. E., Bianchi, D. W., Sherman, S. L., & Reeves, R. H. (2020). Down syndrome. *Nature reviews. Disease primers*, 6(1), 9. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0143-7>

Arora V, Joshi A, Lall M, Agarwal S, Bijarnia Mahay S, Dua Puri R, et al. (2018). Fetal valproate syndrome as a phenocopy of Kleeftstra syndrome. *Birth Defects Res.* 110(15):1205-1209. doi: 10.1002/bdr2.1379.

Ausió J, Levin DB, De Amorim GV, Bakker S, Macleod PM. Syndromes of disordered chromatin remodeling. *Clin Genet.* 2003;64(2):83-95. doi:10.1034/j.1399-0004.2003.00124.x

Balemans MC, Kasri NN, Kopanitsa MV, Afinowi NO, Ramakers G, Peters TA, et al. (2013). Hippocampal dysfunction in the Euchromatin histone methyltransferase 1 heterozygous knockout mouse model for Kleeftstra syndrome. (2013). Hippocampal dysfunction in the Euchromatin histone methyltransferase 1 heterozygous knockout mouse model for Kleeftstra syndrome. *Hum Mol Genet.* 22(5):852-66. doi: 10.1093/hmg/dds490.

Buiting, K., Williams, C., & Horsthemke, B. (2016). Angelman syndrome - insights into a rare neurogenetic disorder. *Nature reviews. Neurology*, 12(10), 584–593. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.133>

Campbell CL, Collins RT, Zarate YA. (2014). Severe neonatal presentation of Kleeftstra syndrome in a patient with hypoplastic left heart syndrome and 9q34.3 microdeletion. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 100(12):985-90. doi: 10.1002/bdra.23324.

Chang, Y., et al. (2011). MPP8 mediates the interactions between DNA methyltransferase Dnmt3a and H3K9 methyltransferase GLP/G9a. *Nature communications*, 2, 533. <https://doi.org/10.1038/ncomms1549>

Ciaccio C, Scuvera G, Tucci A, Gentilin B, Baccarin M, Marchisio P, et al. New Insights into Kleeftstra Syndrome: Report of Two Novel Cases with Previously Unreported Features and Literature Review. *Cytogenet Genome Res.* 156(3):127-133. doi: 10.1159/000494532.

Collins, R. E., Northrop, J. P., Horton, J. R., Lee, D. Y., Zhang, X., Stallcup, M. R., & Cheng, X. (2008). The ankyrin repeats of G9a and GLP histone methyltransferases are mono- and dimethyllysine binding modules. *Nature structural & molecular biology*, 15(3), 245–250. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1384>

de Boer, A., Vermeulen, K., Egger, J., Janzing, J., de Leeuw, N., Veenstra-Knol, H. E., den Hollander, N. S., van Bokhoven, H., Staal, W., & Kleeftstra, T. (2018). EHMT1 mosaicism in apparently unaffected parents is associated with autism

spectrum disorder and neurocognitive dysfunction. *Molecular autism*, 9, 5.  
<https://doi.org/10.1186/s13229-018-0193-9>

Falco M, Amabile S, Acquaviva F. RAI1 gene mutations: mechanisms of Smith-Magenis syndrome. *Appl Clin Genet*. 2017;10:85-94. Published 2017 Nov 3.  
doi:10.2147/TACG.S128455

Guterman S, Hervé B, Rivière J, Fauvert D, Clement P, Vialard F. (2018). First prenatal diagnosis of a 'pure' 9q34.3 deletion (Kleefstra syndrome): A case report and literature review. *J Obstet Gynaecol Res*. 44(3):570-575. doi: 10.1111/jog.13517.

Hadzsiev K, Komlosi K, Czako M, Duga B, Szalai R, Szabo A, et al. (2016). Kleefstra syndrome in Hungarian patients: additional symptoms besides the classic phenotype. *Mol Cytogenet*. 9:22. doi: 10.1186/s13039-016-0231-2.

Harada N, Visser R, Dawson A, Fukamachi M, Iwakoshi M, Okamoto N, et al. (2004). A 1-Mb critical region in six patients with 9q34.3 terminal deletion syndrome. *J Hum Genet*. 49(8):440-4.

He X, Caluseriu O, Srivastava R, Denny AM, Bolduc FV. (2016). Reversible white matter lesions associated with mutant EHMT1 and Kleefstra syndrome. *Neurol Genet*. 2(2):e58. doi: 10.1212/NXG.0000000000000058.

Iwakoshi M, Okamoto N, Harada N, Nakamura T, Yamamori S, Fujita H, et al. (2004). 9q34.3 deletion syndrome in three unrelated children. *Am J Med Genet A*. 126A(3):278-83.

Kleefstra T, de Leeuw N. (2019) Kleefstra Syndrome. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle.

Kleefstra T, Koolen DA, Nillesen WM, de Leeuw N, Hamel BC, Veltman JA, et al. (2006). Interstitial 2.2 Mb deletion at 9q34 in a patient with mental retardation but without classical features of the 9q subtelomeric deletion syndrome. *Am J Med Genet A*. 140(6):618-23.

Kleefstra T, van Zelst-Stams WA, Nillesen WM, Cormier-Daire V, Houge G, Foulds N, et al. (2009). Further clinical and molecular delineation of the 9q subtelomeric deletion syndrome supports a major contribution of EHMT1 haploinsufficiency to the core phenotype. *J Med Genet*. 46(9):598-606. doi: 10.1136/jmg.2008.062950.

Lanouette, S., Mongeon, V., Figeys, D., & Couture, J. F. (2014). The functional diversity of protein lysine methylation. *Molecular systems biology*, 10(4), 724.  
<https://doi.org/10.1002/msb.134974>

Liu, N., et al. (2015). Recognition of H3K9 methylation by GLP is required for efficient establishment of H3K9 methylation, rapid target gene repression, and

mouse viability. *Genes & development*, 29(4), 379–393.  
<https://doi.org/10.1101/gad.254425.114>

Martens MB, Frega M, Classen J, Epping , Bijvank E, Benevento M, et al. (2016). Euchromatin histone methyltransferase 1 regulates cortical neuronal network development. *Sci Rep*. 6:35756. doi: 10.1038/srep35756.

Niceta, M., et al. (2015). Mutations Impairing GSK3-Mediated MAF Phosphorylation Cause Cataract, Deafness, Intellectual Disability, Seizures, and a Down Syndrome-like Facies. *American journal of human genetics*, 96(5), 816–825.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.03.001>

Ohno, H., Shinoda, K., Ohyama, K., Sharp, L. Z., & Kajimura, S. (2013). EHMT1 controls brown adipose cell fate and thermogenesis through the PRDM16 complex. *Nature*, 504(7478), 163–167. <https://doi.org/10.1038/nature12652>  
Peters, A. H., et al. (2003). Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Molecular cell*, 12(6), 1577–1589.  
[https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00477-5](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00477-5)

Rice, J. C., et al. (2003). Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains. *Molecular cell*, 12(6), 1591–1598.  
[https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00479-9](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00479-9)

Samango-Sprouse C, Lawson P, Sprouse C, Stapleton E, Sadeghin T, Gropman A. (2016) Expanding the phenotypic profile of Kleefstra syndrome: A female with low-average intelligence and childhood apraxia of speech. *Am J Med Genet A*. 170A(5):1312-6. doi: 10.1002/ajmg.a.37575.

Sampath, S. C., et al. (2007). Methylation of a histone mimic within the histone methyltransferase G9a regulates protein complex assembly. *Molecular cell*, 27(4), 596–608. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.026>

Samango-Sprouse, C., et al. (2016). Expanding the phenotypic profile of Kleefstra syndrome: A female with low-average intelligence and childhood apraxia of speech. *American journal of medical genetics. Part A*, 170A(5), 1312–1316.  
<https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37575>

Schmidt S, Nag HE, Hunn BS, Houge G, Hoxmark LB. (2016). A structured assessment of motor function and behavior in patients with Kleefstra syndrome. *Eur J Med Genet*. 59(4):240-8. doi: 10.1016/j.ejmg.2016.01.004.

Shao, L., et al. (2008). Identification of chromosome abnormalities in subtelomeric regions by microarray analysis: a study of 5,380 cases. *American journal of medical genetics. Part A*, 146A(17), 2242–2251.  
<https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32399>



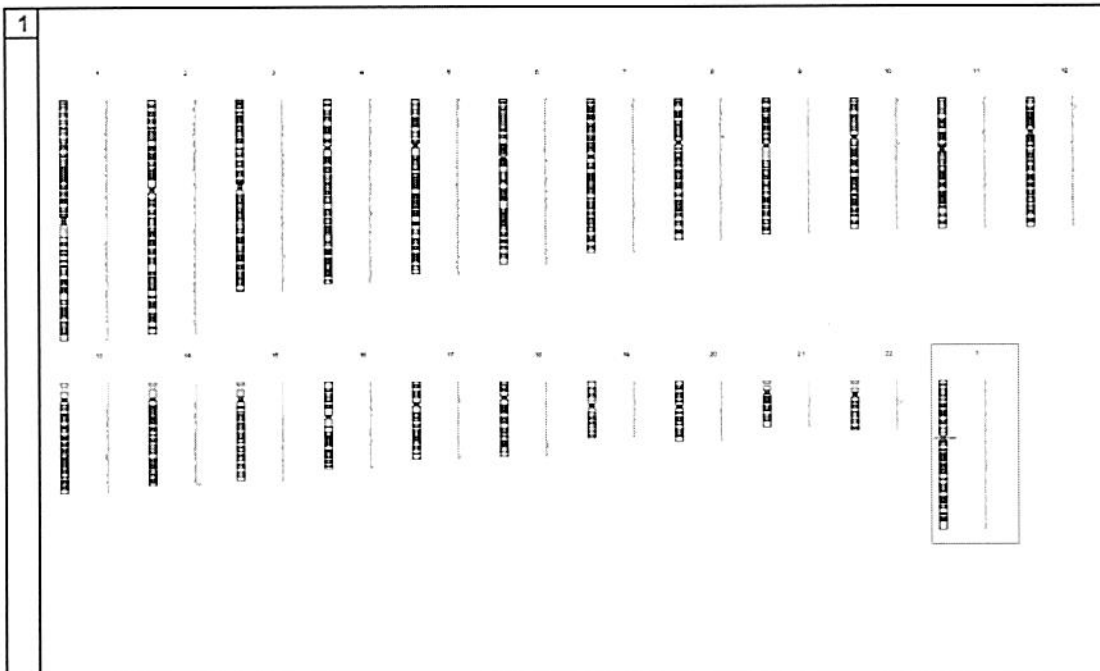
- Shinkai Y, Tachibana M. (2011). H3K9 methyltransferase G9a and the related molecule GLP. *Genes Dev.* 25(8):781-788. doi:10.1101/gad.2027411
- Simovich, M. J., et al. (2007). Prenatal diagnosis of a 9q34.3 microdeletion by array-CGH in a fetus with an apparently balanced translocation. *Prenatal diagnosis*, 27(12), 1112–1117. <https://doi.org/10.1002/pd.1841>
- Tachibana, M., et al. (2002). G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes & development*, 16(14), 1779–1791. <https://doi.org/10.1101/gad.989402>
- Tartaglia, N. R., Howell, S., Sutherland, A., Wilson, R., & Wilson, L. (2010). A review of trisomy X (47,XXX). *Orphanet journal of rare diseases*, 5, 8. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-5-8>
- Verhoeven, W. M., Egger, J. I., Vermeulen, K., van de Warrenburg, B. P., & Kleefstra, T. (2011). Kleefstra syndrome in three adult patients: further delineation of the behavioral and neurological phenotype shows aspects of a neurodegenerative course. *American journal of medical genetics. Part A*, 155A(10), 2409–2415. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.34186>
- Vermeulen, K., et al. (2017). Adaptive and maladaptive functioning in Kleefstra syndrome compared to other rare genetic disorders with intellectual disabilities. *American journal of medical genetics. Part A*, 173(7), 1821–1830. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38280>
- Wang JC, Mahon LW, Ross LP, Anguiano A, Owen R, Boyar FZ. (2016). Enrichment of small pathogenic deletions at chromosome 9p24.3 and 9q34.3 involving DOCK8, KANK1, EHMT1 genes identified by using high-resolution oligonucleotide-single nucleotide polymorphism array analysis. *Mol Cytogenet.* 9:82.
- Willemsen MH, Beunders G, Callaghan M, de Leeuw N, Nillesen WM, Yntema HG, et al. (2011). Familial Kleefstra syndrome due to maternal somatic mosaicism for interstitial 9q34.3 microdeletions. *Clin Genet.* 80(1):31-8. doi: 10.1111/j.1399-0004.2010.01607.x.
- Willemsen MH, Vulto-van Silfhout AT, Nillesen WM, Wissink-Lindhout WM, van Bokhoven H, Philip N, et al. (2012). Update on Kleefstra Syndrome. *Mol Syndromol.* 2(3-5):202-212.
- Yatsenko SA, Brundage EK, Roney EK, Cheung SW, Chinault AC, Lupski JR. (2009). Molecular mechanisms for subtelomeric rearrangements associated with the 9q34.3 microdeletion syndrome. *Hum Mol Genet.* 18(11):1924-36. doi: 10.1093/hmg/ddp114.

Zollino, M., et al. (2019). Germline pathogenic variant in PIK3CA leading to symmetrical overgrowth with marked macrocephaly and mild global developmental delay. *Molecular genetics & genomic medicine*, 7(8), e845.  
<https://doi.org/10.1002/mgg3.845>

13.- ANEXOS

Paciente 1



RESULTADO					
<p>Se analizaron 500 nanogramos de DNA genómico purificado de células de sangre periférica. El DNA fue marcado con fluorescencia, se comparó con respecto a un DNA control de referencia femenino y se hibndó con un microarreglo genómico humano (Agilent, AMADID Code #31746, hg19) mediante hibndación genómica comparativa (aCGH). Las variantes de número de copia (CNVs), fueron comparadas con nuestra base de datos interna, y con las bases de datos genéticas (OMIM, UCSC, DECIPHER, DGV, ClinGen, ClinVar), con referencia a la clínica del paciente.</p> <p>Los resultados obtenidos no revelan la existencia de alteraciones de número de copia (CNVs) asociadas a enfermedad. Asimismo, podemos descartar la existencia de duplicaciones y/o deleciones que tengan un tamaño por encima de la resolución del array (~10 Kb de media en regiones codificantes de proteínas, pericentroméricas, subteloméricas y de reordenamiento recurrente; y ~50-90 Kb en el resto del genoma). A tenor de este resultado, podemos descartar cientos de síndromes genéticos asociados a enfermedad y descritos en la base de datos analizadas.</p> <p>Hay que recordar que debido a las limitaciones intrínsecas de esta técnica, no es posible descartar reordenamientos balanceados, mutaciones, así como otras alteraciones del número de copia de menor tamaño o en regiones del genoma no interrogadas por el microarreglo.</p>					
RESULTADO <u>P4463-942SE</u> :			arr (1-22,X)x2		
INTERPRETACIÓN CITOGENÉTICA-MOLECULAR:			CARIOTIPO MOLECULAR FEMENINO NORMAL		
OBSERVACIONES: - El cariotipo molecular completo se muestra en la Figura 1, Página 2 - Se ha identificado otras variantes de número de copia (CNV) que afectan a regiones polimórficas y la evidencia científica actual las considera benignas (Tabla, Pág. 4).					
Fecha	Código	Genetista	Firma	Dirección Científica	Firma
25/06/2021	P4463_942SE	Silvia Ávila Flores, Ph.D CERTIFICACIÓN CMG Nº 143 (2025)		José Luis Castrillo, Ph.D	

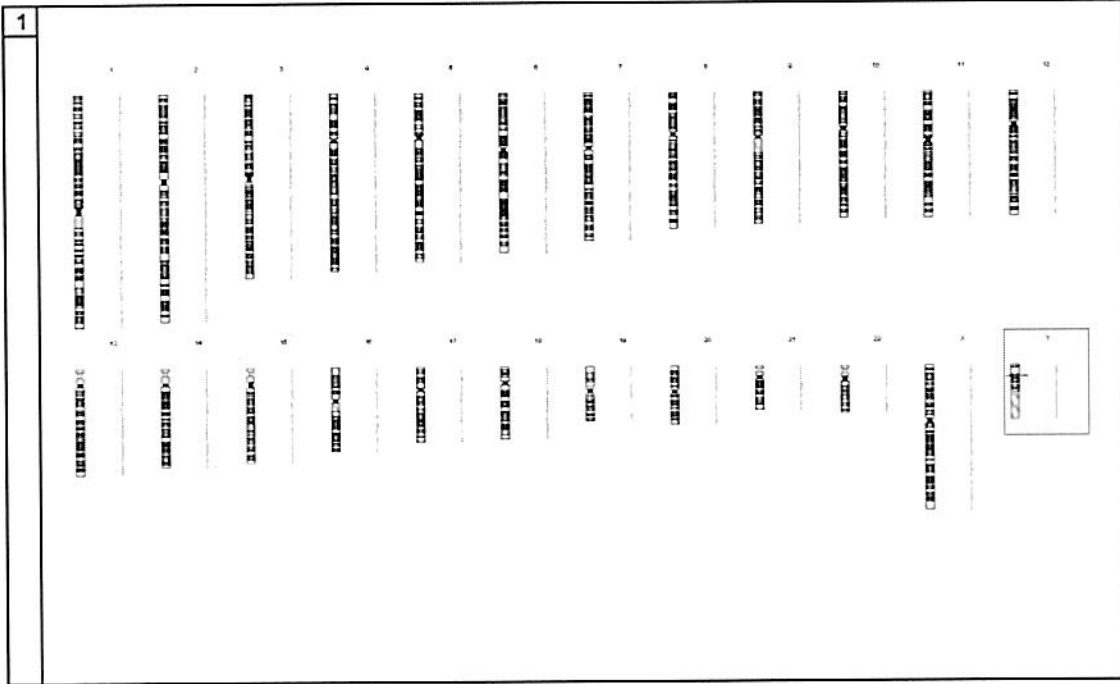


Amp/Del Intervals Table							
Chr	Start-Stop(bp)	Size(bp)	Cytoband	#Probes	Amp/Del	P-value	Annotations
chr4	45882-68211	22,330	p16.3	7	0.588178	NA	ZNF595, ZNF718
chr10	46949255-47655146	705,892	q11.22	7	0.536168	NA	SYT15, GPRIN2, PPYR1, LOC643650, LOC728643, ANXA8, ANXA8L1, FAM25C, FAM25G, FAM25B, AGAP9, LOC642826...
chr14	106405703-106513022	107,320	q32.33	3	4.537846	NA	ADAM6
chr14	106665119-106957950	292,832	q32.33	6	0.900066	NA	NCRNA00226, NCRNA00221
chr14	107148739-107182858	33,920	q32.33	9	-0.434423	NA	
chr22	23056562-23208022	151,461	q11.22	4	3.924032	NA	MIR550

Amp=Amplification  
Del=Deletion  
**Total Amp/Del Intervals: 6**

## Paciente 2

RESULTADO					
<p>Se analizaron 500 nanogramos de DNA genómico purificado de células de sangre periférica. El DNA fue marcado con fluorescencia, se comparó con respecto a un DNA control de referencia masculino y se hibridó con un microarreglo genómico humano (Agilent, AMADID Code #31746, hg19) mediante hibridación genómica comparativa (aCGH). Las variantes de número de copia (CNVs), fueron comparadas con nuestra base de datos interna, y con las bases de datos genéticas (OMIM, UCSC, DECIPHER, DGV, ClinGen, ClinVar), con referencia a la clínica del paciente.</p> <p>Los resultados obtenidos no revelan la existencia de alteraciones de número de copia (CNVs) asociadas a enfermedad. Asimismo, podemos descartar la existencia de duplicaciones y/o deleciones que tengan un tamaño por encima de la resolución del array (~10 Kb de media en regiones codificantes de proteínas, pericentroméricas, subteloméricas y de reordenamiento recurrente, y ~50-90 Kb en el resto del genoma). A tenor de este resultado, podemos descartar cientos de síndromes genéticos asociados a enfermedad y descritos en la base de datos analizadas.</p> <p>Hay que recordar que debido a las limitaciones intrínsecas de esta técnica, no es posible descartar reordenamientos balanceados, mutaciones, así como otras alteraciones del número de copia de menor tamaño o en regiones del genoma no interrogadas por el microarreglo.</p>					
<b>RESULTADO P4464-943SE:</b>			arr (1-22)x2,(XY)x1		
<b>INTERPRETACIÓN CITOGENÉTICA-MOLECULAR:</b>			<b>CARIOTIPO MOLECULAR MASCULINO NORMAL</b>		
<p><b>OBSERVACIONES:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- El cariotipo molecular completo se muestra en la Figura 1, Página 2.</li> <li>- Se ha identificado otras variantes de número de copia (CNV) que afectan a regiones polimórficas y la evidencia científica actual las considera benignas (Tabla, Pág. 4).</li> </ul>					
Fecha	Código	Genetista	Firma	Dirección Científica	Firma
25/06/2021	P4464_943SE	Silvia Ávila Flores, Ph.D CERTIFICACIÓN CMG Nº 143 (2025)		José Luis Castrillo, Ph.D	



T

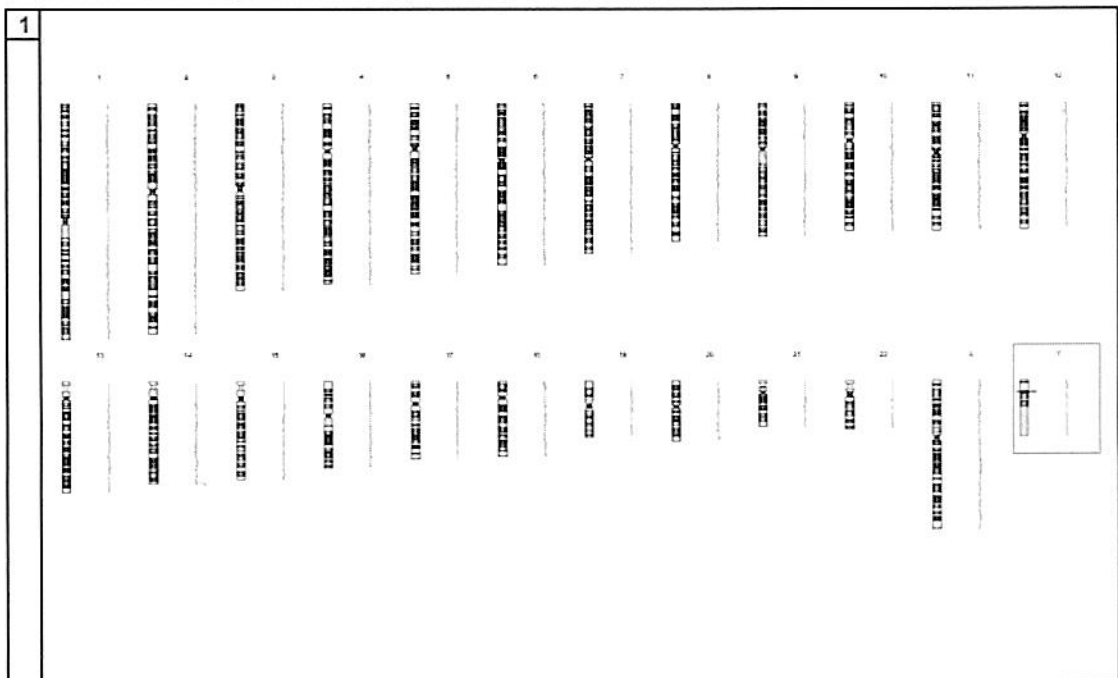
**Amp/Del Intervals Table**

Chr	Start-Stop(bp)	Size(bp)	Cytoband	#Probes	Amp/Del	P-value	Annotations
chr14	106405703-106716404	310,702	q32.33	5	4,442772	NA	ADAM6
chr14	106716405-107214893	498,489	q32.33	31	0,946660	NA	NCRNA00226, NCRNA00221
chr15	32065000-32509926	444,927	q13.3	34	0,619036	NA	CHRNA7
chrY	4786477-7232787	2,446,311	p11.2	40	0,255337	NA	PCDH11Y, TTY23, TTY23B, TSPY2, TTY1B, TTY1, TTY2, TTY2B, TTY21, TTY21B, TTY7, TTY7B...

Amp=Amplification  
Del=Deletion  
**Total Amp/Del Intervals: 4**

Paciente 3

RESULTADO					
<p>Se analizaron 500 nanogramos de DNA genómico purificado de células de sangre periférica. El DNA fue marcado con fluorescencia, se comparó con respecto a un DNA control de referencia masculino y se hibridó con un microarreglo genómico humano (Agilent, AMADID Code #31746, hg19) mediante hibridación genómica comparativa (aCGH). Las variantes de número de copia (CNVs), fueron comparadas con nuestra base de datos interna, y con las bases de datos genéticas (OMIM, UCSC, DECIPHER, DGV, ClinGen, ClinVar), con referencia a la clínica del paciente.</p> <p>Los resultados obtenidos no revelan la existencia de alteraciones de número de copia (CNVs) asociadas a enfermedad. Asimismo, podemos descartar la existencia de duplicaciones y/o deleciones que tengan un tamaño por encima de la resolución del array (~10 Kb de media en regiones codificantes de proteínas, pericentroméricas, subteloméricas y de reordenamiento recurrente; y ~50-90 Kb en el resto del genoma). A tenor de este resultado, podemos descartar cientos de síndromes genéticos asociados a enfermedad y descritos en la base de datos analizadas.</p> <p>Hay que recordar que debido a las limitaciones intrínsecas de esta técnica, no es posible descartar reordenamientos balanceados, mutaciones, así como otras alteraciones del número de copia de menor tamaño o en regiones del genoma no interrogadas por el microarreglo.</p>					
<b>RESULTADO P4465-944SE:</b>		<b>arr (1-22)x2,(XY)x1</b>			
<b>INTERPRETACIÓN CITOGENÉTICA-MOLECULAR:</b>		<b>CARIOTIPO MOLECULAR MASCULINO NORMAL</b>			
<p><b>OBSERVACIONES:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- El cariotipo molecular completo se muestra en la Figura 1, Página 2</li> <li>- Se ha identificado otras variantes de número de copia (CNV) que afectan a regiones polimórficas y la evidencia científica actual las considera benignas (Tabla, Pág. 4).</li> </ul>					
Fecha	Código	Genetista	Firma	Dirección Científica	Firma
25/06/2021	P4465_944SE	Silvia Ávila Flores, Ph.D CERTIFICACIÓN CMG Nº 142 (2025)		José Luis Castrillo, Ph.D	



T

**Amp/Del Intervals Table**

Chr	Start-Stop(bp)	Size(bp)	Cytoband	#Probes	Amp/Del	P-value	Annotations
chr2	50600243-50620298	20,056	p16.3	3	-0.919396	NA	NRXN1
chr6	229815-439290	209,476	p25.3	23	-0.276695	NA	DUSP22, IRF4
chr14	106405703-106716404	310,702	q32.33	5	4.865096	NA	ADAM6
chr14	106716405-107214893	498,489	q32.33	31	0.930792	NA	NCRNA00226, NCRNA00221

Amp=Amplification

Del=Deletion

**Total Amp/Del Intervals: 4**