



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICA,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO "FEDERICO GOMEZ"

GENÉTICA MÉDICA

TÍTULO: DETECCIÓN DE DESBALANCES CROMOSÓMICOS EN PACIENTES CON
MALFORMACIONES CONGÉNITAS MÚLTIPLES MEDIANTE CARIOTIPO
MOLECULAR

TESÍS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS MEDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PRESENTA:
JAIME TORAL LÓPEZ

TUTORES
DR. EN C. SERGIO ALBERTO CUEVAS COVARRUBIAS
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO
DR. EN C. JAVIER TADEO GRANADOS RIVERÓN,
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO
DR. EN C. ENRIQUE ISABEL MIRANDA PERALTA
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO

CIUDAD DE MÉXICO, SEPTIEMBRE DE 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

RESUMEN.....	3
ANTECEDENTES	4
Defecto o malformación congénita	4
Tipos de malformaciones congénitas	5
Malformaciones congénitas estructurales	5
Defectos congénitos funcionales	6
Malformaciones congénitas múltiples.....	9
Epidemiología	10
Etiología.....	10
Desbalances cromosómicos o variación en el número de copias	11
Microdeleciones/microduplicaciones cromosómicas.....	11
Perdida de heterocigocidad.....	13
Cariotipo humano	14
Cariotipo molecular.....	15
Microarreglos cromosómicos o SNP (Single Nucleotide Polymorphism) array.	15
Antecedente de detección de desbalances cromosómicos o VNC en casos con MC mediante cariotipo molecular.....	16
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	19
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	20
OBJETIVOS	20
MATERIAL Y MÉTODOS	21
Diseño de estudio.....	21
Universo de estudio.....	21
Criterios de estudio.....	21
Definición de las variables de estudio.....	22
Tamaño de la muestra.....	23
Diseño estadístico	23
Procedimiento del estudio	24
METODOLOGÍA CARIOTIPO MOLECULAR	25
Análisis de los datos para detección de las VNCs	27
Determinación de la significancia clínica de las VNC.....	27
Detección de LOH y determinación de la significancia clínica.....	28
Consideraciones éticas	28
Cronograma de actividades.....	29
RESULTADOS	30
Casos o pacientes estudiados.....	30
DISCUSION.....	42
REFERENCIAS	45
ANEXO	52
ARTICULO PUBLICADO.....	55

Detección de desbalances cromosómicos en pacientes con malformaciones congénitas múltiples mediante cariotipo molecular

RESUMEN

Antecedentes: Las defectos o malformaciones congénitas (MC) se observan en 2-3 % de los recién nacidos, afectando la morbi-mortalidad del infante, en un 20% son vistos como malformaciones congénitas múltiples (MCM). Dentro de sus causas genéticas están las atribuidas a desbalances cromosómicos o variaciones en el número de copias (VNC) identificadas por microarreglos cromosómicos o cariotipo molecular.

Planteamiento del problema: La etiología y presentación clínica de las MCM es heterogénea y en aproximadamente 50% de los casos no se logra integrar un diagnóstico. Después de descartarse factores teratogénicos, síndromes cromosómicos, monogénicos, o de microdelección/ microduplicación reconocibles, existe un amplio grupo de pacientes con MCM de etiología no determinada.

Justificación del estudio: Al utilizar el cariotipo molecular a una alta resolución de 1.15 Kb, nos permitirá detectar VNC <500 Kb (pequeñas) o < 100 Kb (submicroscópicas), así como regiones de pérdida de heretocigocidad (LOH o ROH) que pudiera tener una relación patológica con el fenotipo de nuestro paciente con MC de etiología no determinada, también, permitirá conocer la frecuencia y el tamaño de la VNC (desbalance cromosómico) y de las ROH. Existen pocos estudios acerca de la detección de los desbalances cromosómicos o LOH mediante cariotipo molecular de alta resolución en pacientes con MC, con o sin retraso del desarrollo, discapacidad intelectual.

Objetivo: Describir el tamaño, frecuencia, novedad, patogenicidad de las VNC y ROH detectados mediante cariotipo molecular de alta resolución en los pacientes con MCM de etiología no determinada.

Material y métodos: Se analizaron 5 casos con MCM de etiología no determinada mediante oligo-SNP array de alta resolución. Las VNCs fueron observadas mediante log₂ de la razón de intensidad de los SNP. El tamaño, la frecuencia, novedad y patogenicidad de las VNCs y LOH fueron valoradas usando las guías de la CAMG, así como las bases de datos DGV, ClinGen, ClinVar, OMIM, PubMed y DECIPHER. También se utilizó la herramienta "Genomic Oligoarray-SNP array evaluation", para

la búsqueda de genes recesivos dentro de la ROH que pudieran tener una relación con el fenotipo de los pacientes. El contenido genético dentro de las VNCs y LOH fueron referenciados con el NCBI build 38 (hg19).

Resultados: En los 5 casos estudiados, se detectaron 71 VNC (77% fueron polimórficas, 21 % de significancia clínica incierta y una patogénica). El tamaño promedio de los VNC polimórficas fue de 143 Kb, los de significado incierto de 118 Kb. 95% de las VNC fueron <500 Kb. También, 3 pacientes mostraron segmentos de LOH en 10 cromosomas diferentes.

Conclusiones: Este es el primer estudio en casos mexicanos con MCM de etiología no determinada, analizados mediante SNP array HD que describe la frecuencia de VNC polimórficas, de significado incierto y patogénicas, Este estudio corrobora que todavía es posible detectar VNC pequeñas/ submicroscópicas, nuevas y patogénicas. Además, la detección de LOH en nuestros pacientes puede ser más relacionado a autocigocidad de ancestros distantes. Hipotetizamos que cualquiera de los genes desconocidos localizados en las VNC de significado incierto en combinación con los segmentos LOH podrían tener alguna relación directa con el fenotipo de nuestros pacientes.

I. ANTECEDENTES

I.1. DEFECTO O MALFORMACIÓN CONGÉNITA (MC)

El término CONGÉNITO significa “presente desde el nacimiento”. Las malformaciones congénitas (MC), también, llamados defectos o anomalías congénitas son alteraciones del desarrollo morfológico, estructural, funcional o molecular presente en un recién nacido (aunque pueda manifestarse más tarde), sea externa o interna, familiar o esporádica, hereditaria o no, única o múltiple, que resulta de una embriogénesis o fetogénesis defectuosa, presentes desde el nacimiento, visibles o no **(1, 2, 3)**.

Las malformaciones congénitas presentan una heterogeneidad y expresión clínica variable. Algunas suelen ser detectados durante los primeros días después del nacimiento e incluso, en muchas ocasiones, se detectan antes del nacimiento (prenatalmente). Existen algunas anomalías con alta severidad que generan letalidad intrauterina **(4)**.

I.2. TIPO DE MALFORMACIONES CONGÉNITAS

I.2.1. LAS MALFORMACIONES CONGÉNITAS ESTRUCTURALES.

Entendemos por malformaciones congénitas estructurales aquellas que involucran alteraciones morfológicas. Es decir, que afectan algún tejido, órgano o conjunto de órganos del cuerpo. Algunos ejemplos son hidrocefalia, espina bífida, fisura de labio y/o paladar, cardiopatía congénita.

Entre las malformaciones congénitas estructurales pueden encontrarse las malformaciones mayores y menores **(3,5)**.

Los defectos mayores implican un daño significativo en la salud. Explican la mayor parte de las defunciones, la morbilidad y la discapacidad. Tienen consecuencias médicas, sociales o estéticas significativas para los afectados y, por lo general, requieren de tratamiento médico y/o quirúrgico y de rehabilitación. Por ejemplo: la displasia de cadera, requiere un tratamiento ortopédico o, las fisuras de labio y/o paladar, que deben ser reparadas quirúrgicamente. La mayoría de los defectos mayores requiere un abordaje multidisciplinario o integral del defecto (Fonoaudiólogos, kinesiólogos, etc), a fin de restablecer lo más cercano a la normalidad la condición del paciente **(3, 5)**.

Algunos de los defectos mencionados son externos, o evidentes a simple vista, como la espina bífida abierta, las fisuras del labio o del paladar o la gastrosquisis y otras son internas, no visibles a simple vista y requieren instrumentos diagnósticos para su identificación: por ejemplo, las cardiopatías, las malformaciones renales, espina bífida oculta y la malrotación intestinal, no se ven, pero, si se sospechan, se pueden descubrir mediante radiografías, ecografías y otros estudios (3, 4, 5).

Los defectos menores, frecuentes en la población, generalmente no implican ningún problema de salud importante, ni tienen consecuencias sociales o cosméticas. Ejemplos de anomalías congénitas menores son: dismorfias faciales, cuello corto, angiomas pequeños, una sola arteria en el cordón umbilical, entre muchas otras (3, 4, 5).

Sin embargo, en muchos casos, la presencia de una o más anomalías menores (visibles), se puede asociar a una o más anomalías mayores (que pueden estar ocultas). Las personas que tienen 2 anomalías menores tienen una probabilidad de aproximadamente el 10% de presentar una anomalía mayor. Si el individuo tiene 3 o más anomalías menores, esta probabilidad aumenta al 25% (3, 4, 5).

Las malformaciones congénitas fueron clasificadas y codificadas de acuerdo a la clasificación internacional de enfermedades "*International Classification of Diseases-ICD-10*" y son definidos de acuerdo a la Clasificación Europea de Vigilancia de las Anomalías Congénitas "*the European Surveillance of Congenital Anomalies classification (EUROCAT; www.eurocat-network.eu)*" (Tabla1) (6, 7).

I.2.2. DEFECTOS CONGÉNITOS FUNCIONALES

Son aquellas que interrumpen procesos biológicos sin implicar un cambio macroscópico de forma; involucran alteraciones metabólicas, hematológicas, del sistema inmune, entre otras. Algunos ejemplos son: hipotiroidismo congénito, discapacidad intelectual, tono muscular disminuido, ceguera, sordera, convulsiones de inicio neonatal.

Tabla 1	Definición de los Códigos ICD-10 para malformaciones congénitas de acuerdo a la “ <i>European Surveillance of Congenital Anomalies classification- Clasificación Europea de Vigilancia de las Anomalías Congénitas (EUROCAT; www.eurocat-network.eu)</i> ”.
1 Sistema nervioso	Q00: Anencefalia y malformaciones similares. Q01: Encefalocele. Q02: Microcefalia. Q03: Hidrocefalia Congénita. Q04: Otras malformaciones congénitas del cerebro. Q05: Espina bífida. Q06: Otras malformaciones congénitas de la medula espinal. Q07: Otras malformaciones congénitas del sistema nervioso.
2 Ojo	Q100: Ptosis congénita. Q104: Agenesia del aparato lagrimal. Q106: Ausencia congénita del aparato lagrimal. Q107: Malformación congénita de la órbita. Q11: Anoftalmos, microftalmos and macroftalmos. Q12: Malformación congénita del cristalino. Q13.0: Coloboma del iris. Q131: Ausencia del iris. Q132: Otras malformaciones congénitas del iris. Q133: Opacidad corneal congénita. Q134: Otras malformaciones congénitas de la córnea. Q135: Esclera azul. Q138: Otras malformaciones congénitas del segmento anterior del ojo. Q139: Malformaciones congénitas inespecíficas del segmento anterior del ojo. Q14: Malformaciones congénitas del segmento posterior del ojo. Q15: Glaucoma congénito.
3 Oreja, cara, cuello.	Q16: Malformaciones congénitas del oído causando falla de la audición. Q178: Ausencia congénita del lóbulo de la oreja. Q183: Cuello alado. Q188: Quiste, fistula o seno medial en cara o cuello.
4 Defectos cardiacos congénitos	Q20: Malformaciones congénitas de las cámaras cardíacas y conexiones. Q21: Malformaciones congénitas del septum cardiaco. Q22: Malformaciones congénitas de las válvulas pulmonar y tricúspide. Q23: Malformaciones congénitas de las válvulas aórtica y mitral. Q24: Otras malformaciones congénitas del corazón. Q25: Malformaciones congénitas de las grandes arterias. Q260: Estenosis congénita de la vena cava. Q262: conexión venosa pulmonar anómala total. Q263 Conexión venosa pulmonar anómala parcial. Q264: Conexión venosa pulmonar anómala, no especificada. Q265: Conexión venosa portal anómala. Q266: Fístula de la vena portal y arteria hepática. Q26.8 Otras malformaciones congénitas de las grandes venas. Q26.9 Malformación congénita de la vena cava.
5 Sistema Respiratorio	Q300: Malformaciones congénitas de la nariz. Q320: Traqueomalacia congénita. Q321: Otras malformaciones congénitas de la tráquea. Q322: Bronquiomalacia congénita. Q323: Estenosis congénita del bronquio. Q324: Otras malformaciones congénitas del bronquio. Q330: Pulmón quístico congénito. Q331: Lóbulo accesorio del pulmón. Q332: Secuestro de pulmón. Q333: Agenesia del pulmón. Q334: Bronquiectasias congénitas. Q335: Tejido ectópico en el pulmón. Q336: Hipoplasia congénita y displasia pulmonar. Q338: Otras malformaciones congénitas del pulmón. Q339: Malformación congénita del pulmón, no especificada. Q34: Otras malformaciones congénitas del aparato respiratorio.
6 Hendidura	Q35: Paladar hendido. Q36: Lengüeta hendida. Q37: Fisura palatina.

oro-facial	
7 Sistema Digestivo	<p>Q380: Malformaciones congénitas de los labios, no clasificadas en otra parte. Q381: Anquiloglosia. Q382: Macroglosia. Q383: Otras malformaciones congénitas de la lengua. Q384: Malformaciones congénitas de las glándulas y conductos salivales. Q385: Malformaciones congénitas del paladar, no clasificadas en otra parte. Q386: Otras malformaciones congénitas de la boca. Q387: Bolsa faríngea congénita. Q38.8 Otras malformaciones congénitas de la faringe. Q39: Malformaciones congénitas del esófago</p> <p>Q40.2 Otras malformaciones congénitas especificadas del estómago</p> <p>Q40.3 Malformación congénita del estómago, no especificada. Q40.8 Otras malformaciones congénitas especificadas del tracto alimentario superior. Q40.9 Malformación congénita del tracto digestivo superior, no especificada</p> <p>Q41: Ausencia congénita, atresia y estenosis del intestino delgado</p> <p>Q42: Ausencia congénita, atresia y estenosis del intestino grueso</p> <p>Q431: Enfermedad de Hirschsprung</p> <p>Q43.2 Otros trastornos funcionales congénitos del colon</p> <p>Q43.3 Malformaciones congénitas de la fijación intestinal</p> <p>Q43.4 Duplicación del intestino</p> <p>Q43.5 Ano ectópico</p> <p>Q43.6 Fístula congénita del recto y del ano</p> <p>Q43.7 Cloaca persistente</p> <p>Q43.8 Otras malformaciones congénitas especificadas del intestino</p> <p>Q43.9 Malformación congénita del intestino, no especificada</p> <p>Q44 Malformaciones congénitas de la vesícula biliar, los conductos biliares y el hígado</p> <p>Q45 Otras malformaciones congénitas del aparato digestivo. Q790: Hernia diafragmática congénita.</p>
8 Defecto de pared Abdominal	<p>Q792. Onfalocele. Q793: Gastrosquisis. Q795: Otras malformaciones congénitas de la pared abdominal.</p>
9 Sistema Urinario	<p>Q60: Agenesia renal y otros defectos de reducción del riñón.</p> <p>Q61: Enfermedad renal quística.</p> <p>Q62: Defectos congénitos obstructivos de la pelvis renal y malformaciones congénitas del uréter. Q63.0: Riñón accesorio. Q63.1: riñón con vaina, fundido y herradura. Q63.2: Riñón ectópico. Q63.3: Riñón hiperplásico y gigante. Q63.8: Otras malformaciones congénitas especificadas del riñón. Q63.9: Malformación congénita del riñón, no especificada. Q64: Otras malformaciones congénitas del sistema urinario. Q79.4: Síndrome del vientre de la poda.</p>
10 Órganos genitales	<p>Q50: Malformaciones congénitas de ovarios, trompas de Falopio y ligamentos anchos. Q51: Malformaciones congénitas del útero y del cuello uterino. Q52: Otras malformaciones congénitas de los genitales femeninos. Q54: Hipospadias. Q55: Otras malformaciones congénitas de los órganos genitales masculinos. Q56: Sexo indeterminado y pseudohermafroditismo.</p>

11 Extremidades	Q66.0: pie equino varo congénito. Q66.1 pie calcaneovarus congénito. Q68.1: Deformidad congénita del (de los) dedo (s) y mano. Q68.2 Deformidad congénita de la rodilla. Q688: Deformidad congénita de la clavícula, codo, antebrazo, escápula, muñeca. Dislocación congénita del codo, hombro, muñeca. Q70: Sindactilia. Q71: Defectos de reducción del miembro superior. Q72: Defectos de reducción del miembro inferior. Q73: Defectos de reducción de una extremidad no especificada Q74: Otras malformaciones congénitas de la extremidad (s).
12 Otros	Q75.0: Craneosinostosis. Q75.2: Hipertelorismo. Q82.8 Otras malformaciones congénitas especificadas de la piel Q82.9 Malformación congénita de la piel, no especificada Q890, Q89.0 Ausencia congénita y malformaciones del bazo Q89.3 Situs inversus. Q89.7 Malformaciones congénitas múltiples, no clasificadas en otra parte Q89.8 Otras malformaciones congénitas especificadas Q89.9 Malformaciones congénitas, no especificadas

1.3. MALFORMACIONES CONGÉNITAS MÚLTIPLES (MCM)

A través de una historia clínica completa y una exploración física minuciosa, además del apoyo de los estudios de laboratorio y gabinete, se puede establecer si un defecto es congénito o de aparición postnatal y si es único o múltiple. Los cambios morfológicos únicos pueden ser clasificados como malformación, deformación, disrupción y displasia (Tabla 2). Las anomalías con múltiples malformaciones se dividen en síndromes, secuencia, asociación, espectro y defectos del campo de desarrollo (1, 8) (Tabla 3).

MALFORMACIÓN	Alteración morfológica primaria debido a un desarrollo intrínseco anormal. Ejem: Labio y paladar hendido
DEFORMACIÓN	Alteración en la forma y posición de una parte del organismo por fuerzas mecánicas de una estructura normalmente programada. Ejem: Pie equino varo.
DISRUPCIÓN	Interrupción del desarrollo de estructuras normales por factores extrínsecos.
DISPLASIA	Organización celular anormal de un tejido que resulta en cambios estructurales. Ejem: hemangioma.

Tabla 3. Muestra la clasificación de los defectos múltiples	
SINDROME	Malformaciones múltiples primarias que se presentan en un patrón consistente y reconocible, originados de una etiología común. Ejem: Sx de Down.
SECUENCIA	Conjunto de alteraciones del desarrollo que son consecuencia de un defecto primario cuya etiología es heterogénea. Ejem: Secuencia de Pierre Robin.
ASOCIACIÓN	Conjunto de alteraciones del desarrollo que no representan un síndrome o secuencia y que se presentan más frecuente de lo esperado por el azar. Ejem: VATER.
ESPECTRO	Ocurrencia no aleatoria de múltiples malformaciones con expresión variable. Ejem: EOAV
DEFECTO DEL CAMPO DE DESARROLLO	Defectos que se determinan y controlan con relación al espacio y tiempo de manera coordinada, sincrónica y jerárquica. Ejem: Holoprosencefalia.

1.4. EPIDEMIOLOGÍA

Las MC comprende un grupo grande y heterogéneo de enfermedades que afectan a 3% de los recién nacidos y 7% en el primer año de vida. 20% de ellos son vistos como malformaciones congénitas múltiples. Los defectos congénitos pueden ocasionar discapacidades crónicas que tienen un impacto médico, quirúrgico y psicológico en los pacientes y sus familias, los sistemas de salud y que interfiere con la aceptación del sujeto en la sociedad (3, 4, 5).

Las MC son la segunda causa de muerte en niños después de los accidentes (9). La incidencia mundial de malformaciones congénitas oscila entre 25-62/1.000 nacimientos. En México se han reportado de 9.9- 12/1.000 nacimientos (10).

1.5. ETIOLOGÍA

La etiología de las MC comprende factores socioeconómicos y demográficos (familias y países de ingresos bajo), infecciones (rubeola, toxoplasma), estado nutricional de la madre (falta de yodo, folato, sobrepeso, diabetes mellitus), factores ambientales (plaguicidas, medicamentos, alcohol, tabaco, radiación), factores cromosómicos-genéticos (asociada en 30%) (11, 12). Dentro de las alteraciones cromosómicas están las numéricas, como las aneuploidías (trisomías, monosomías)

y las poliploidías, así como también los mosaicismos (presencia de líneas celulares diferentes en un mismo individuo). Por otro lado, las alteraciones estructurales afectan a uno o varios cromosomas (translocaciones, isocromosomas, cromosomas en anillo, cromosomas dicéntricos, fragmentos, inversiones, deleciones y duplicaciones) y son menos frecuentes que las alteraciones numéricas. Las mutaciones puntuales en los genes también causan MCM (13).

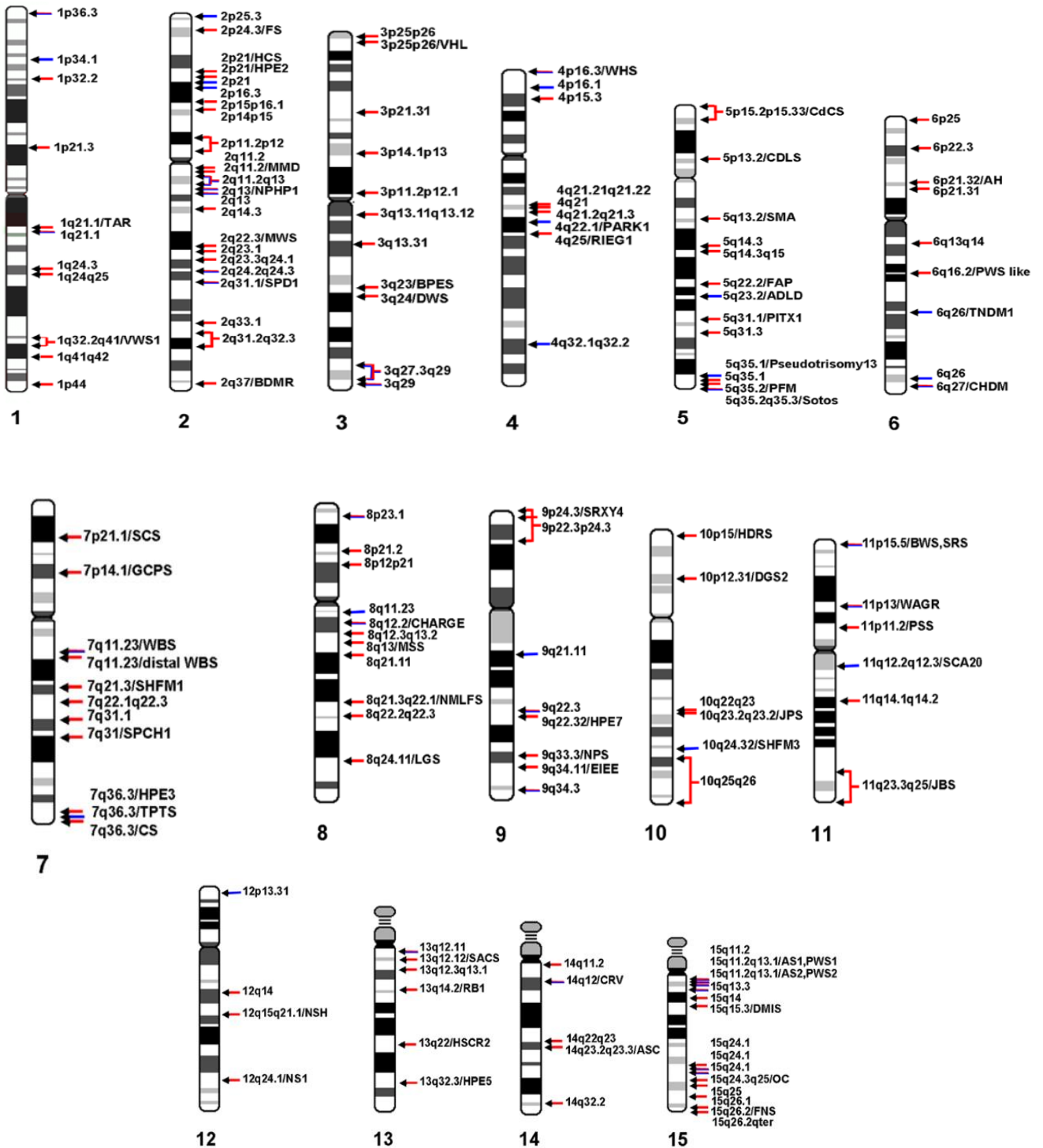
1.6. DESBALANCES CROMOSÓMICOS O VARIACIÓN EN EL NUMERO DE COPIAS (VNC)

Los desbalances cromosómicos o variación en el número de copias (VNC), son definidos como una ganancia (duplicación) o pérdida (delección) de un tramo de ADN, comparado con el ADN de referencia (14-18) y varían en talla desde un kilo base (Kb) hasta varios megabases (Mb) o incluso un cromosoma entero (monosomía, trisomía). Las VNC pequeñas o microdeleciones/microduplicaciones pueden incluir múltiples genes, uno o ninguno, y aunque algunos VNC causan enfermedad, muchos otros permanecen como variantes benignas (polimórficas) en la población y forman parte de la evolución del ser humano y de la diversidad genética entre individuos (15).

1.7. MICRODELECCIONES Y MICRODUPLICACIONES CROMOSOMICAS CONOCIDAS

Las microdeleciones y microduplicaciones cromosómicas han sido asociadas a formas sindrómicas de discapacidad intelectual (ID), retraso del desarrollo (RD), desde 1980, ejemplos clásicos incluyen delección 15q11-13 asociado con síndrome de Prader Willi, y el síndrome de Angelman (19), la delección 17p11 con síndrome de Smith Magenis (20), la delección 7q11 con síndrome de Williams (21) y la delección 22q11 con síndrome velocardiofacial (22). Weise y col., 2012, (23) en una revisión de la literatura notaron 211 síndromes de microdelección y 79 síndromes de microduplicación (Figura 1). Nevado y col., 2014 (24), observaron otras 24 nuevas regiones reportadas de microdelección/ microduplicación, interesantemente, la

mayoría de estos síndromes de microdelección/ microduplicación tienen características fenotípicas similares y traslapan con otros síndromes genéticos previamente descritos.



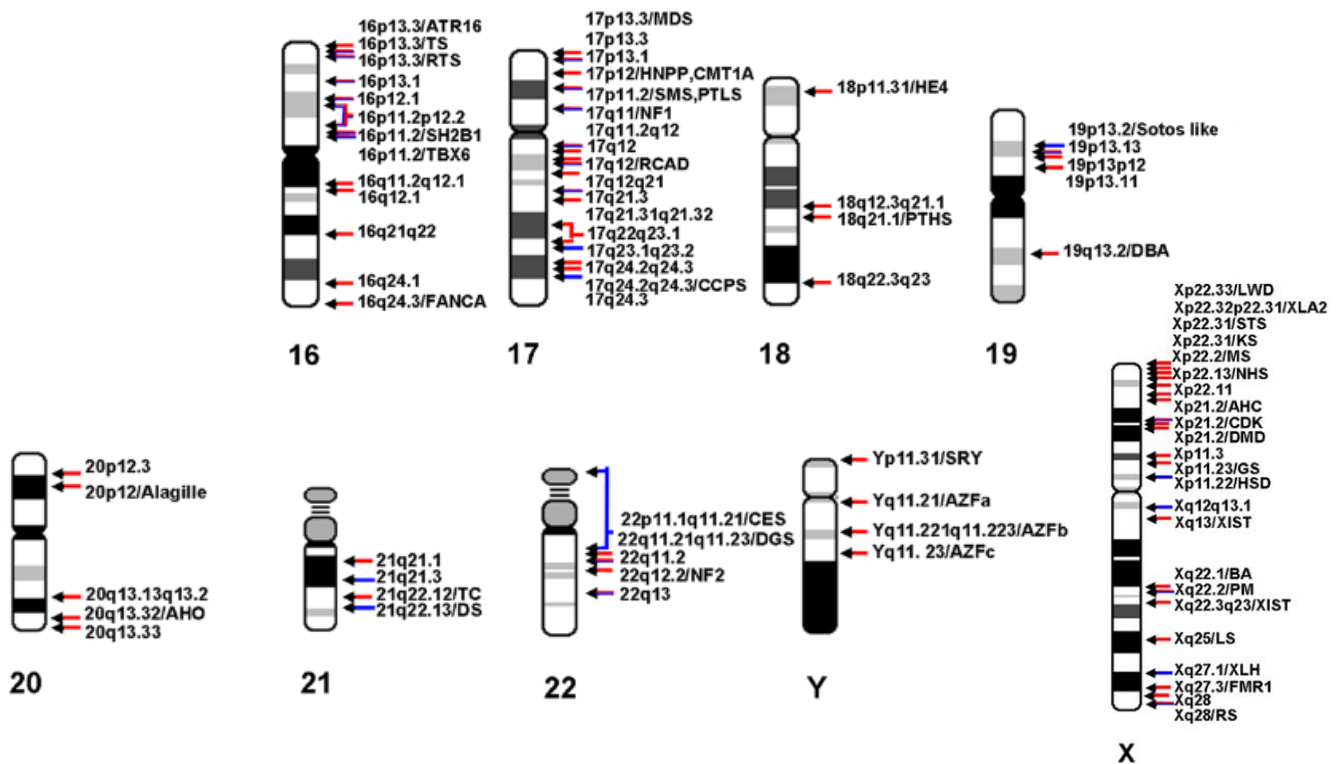


Figura 1. Representación esquemática de la mayoría de las regiones de microdelección (flecha roja) y microduplicación (flecha azul) reportadas al menos 2 veces, mezcla de flechas azul/rojo indica regiones recíprocas de microdelecciones y microduplicaciones. Tomada de Weise A y col. 2012 (23).

La última actualización de la base de datos OMIM (Online Mendelian Inheritable Man) muestra a 2874 síndromes relacionados con alguna delección, de los cuales 271 son microdelecciones, de ellas 67 están relacionadas con alguna malformación congénita y 39 con MCM, el tamaño promedio de estas delecciones es de 8.74 Mb con un rango de 3 kb a 40.4 Mb; también en la base OMIM existen 898 síndromes asociado con alguna duplicación, 44 son microduplicaciones, de estas, 10 están relacionadas con alguna malformación congénita y 5 con MCM, el promedio de estas microduplicaciones es de 5.33 Mb con un rango de 45 kb a 21.9 Mb (25).

1.8. PERDIDA DE HETEROCIGIDAD (LOH)

La pérdida de heterocigidad (LOH) o regiones de homocigidad (ROH), también nombrada disomía uniparental (DUP), se debe a la duplicación de una región cromosómica o cromosoma de origen materno o paterno y concurrente pérdida del

otro alelo. La LOH fue inicialmente identificado con estudios de microsatélites, con la aplicación sistemática del SNP array como herramienta para cariotipo, condujo a la detección de áreas clonales de LOH en varios cánceres y malignidades hematológicas. La LOH pueden ser clasificada de acuerdo a su origen (clonal/ adquirida o no clonal/ constitucional), la no clonal puede ser resultado de un evento mitótico temprano, que conduce a mosaicismo, también puede surgir por autocigocidad verdadera o eventos meióticos que incluyen rescate trisómico, complementación gamética, duplicación de un cromosoma monosómico en un cigoto aneuploide y por recombinación no homóloga, también, puede ser clasificado de acuerdo a su localización (telomérica o intersticial), o al número de cromosomas involucrados (numérica; disomía, trisomía, ganancia/trisomía) **(26)**.

1.8. CARIOTIPO HUMANO

Se le llama cariotipo al ordenamiento de los cromosomas de acuerdo a su tamaño y a la localización del centrómero. El cariotipo humano está constituido normalmente de 46 cromosomas, fue descubierto en 1956 **(27)**. El cariotipo postnatal se lleva a cabo mediante cultivo de linfocitos de sangre periférica o por medio de una mínima biopsia de piel, para observar los cromosomas al microscopio. La introducción de la técnica con bandeo G en 1970, y que actualmente es la más utilizada, permitió la identificación de los cromosomas, ordenarlas en pares, los primeros 22 se denominan autosomas y el último par se denominan cromosomas sexuales **(28)**. Un cromosoma en metafase típica contiene de 400 a 500 bandas por genoma haploide, mientras que un cariotipo con bandeo G de alta resolución alcanzan de 550 a 800 bandas y una de estas bandas corresponde a una longitud de 7.5 Mb, así estos cariotipos permiten detectar, además de alteraciones cromosómicas, las deleciones o duplicaciones relacionadas con algunos síndromes en el rango de 5 a 10 Mb **(29, 30)**, proporcionando un diagnóstico de certeza en el 10% de los pacientes con sospecha de cromosopatía.

Estudio de individuos con MC analizados mediante cariotipo convencional detectaron anomalías cromosómicas en 3 % de los casos, sin incluir al síndrome de Down y otros síndromes cromosómicos reconocibles **(31, 32)**. Estudios con la técnica de amplificación de sondas con ligación múltiple (MLPA) que combinaban 3

SALSAS Kit detectaron en promedio 18 % de desbalances cromosómicos en pacientes con sospecha de síndromes de microdelección reconocidos (15).

1.9. CARIOTIPO MOLECULAR

El cariotipo molecular inicio con el desarrollo de la hibridación genómica comparativa (CGH), una técnica que permite la detección de cambios en el número de copias cromosómico sin la necesidad de cultivo celular; esta consiste en marcar con un fluoroforo verde un ADN de interés y marcar con un rojo un ADN normal, posteriormente ambos son hibridados en una preparación de metafases cromosómicas normales (33). Esta técnica alcanza una resolución de 3-10 Mb. Posteriormente, con el surgimiento de la técnica de micro-arreglos de CGH (aCGH) en 1997 (34), se alcanzó una resolución < 3Mb. Aquí se utilizan sondas obtenidas de clonas de ADN, estos oligonucleótidos son fijados sobre un microchip (microarreglos) de regiones conocidas del genoma humano, en lugar de cromosomas en metafase, pero fundamentada en el CGH previo (35).

1.9.1. MICROARREGLOS CROMOSOMICOS O SNP (SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM) ARRAY

SNP array, es una técnica de diagnóstico molecular, usado para detectar polimorfismo de nucleótido único en el ADN. Desde que las variaciones en el número de copias (VNC) o LOH (perdida de heterocigosidad) fueron asociados con pacientes con discapacidad intelectual con o sin malformaciones congénitas (MC), su detección es de particular interés para pacientes cuyo fenotipo permanece sin explicación. La medición de la variación del número de copias, se logra mediante el *Ratio log2* de la intensidad de la fluorescencia emitidas por las sondas y se interpreta como 0.0 = diploide, -1.0 = deleción, +1.0 = duplicación (Figura 2). El SNP array de alta definición (HD) tiene una resolución de 1.15 Kb y detecta hasta el 99% de las VNC (deleciones/ duplicaciones) cromosómicas presentes en un individuo, así como también LOH o ROH (36, 37).

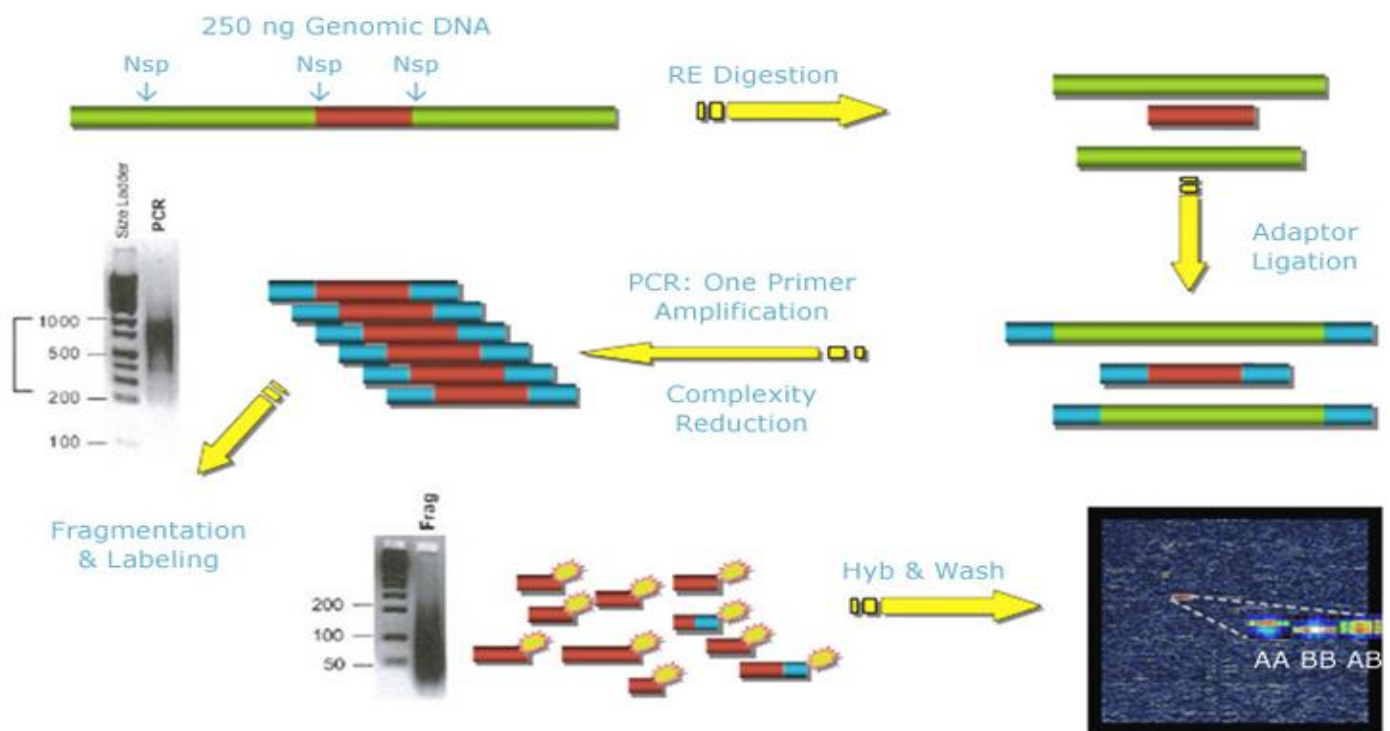


Figura 2. Muestra los pasos del cariotipo molecular o microarreglo cromosómico,

1.9.2. Antecedente de detección de desbalances cromosómicos o VNCs en casos con MC mediante cariotipo molecular

La tasa de detección de los desbalances cromosómicos mediante cariotipo molecular ha evolucionado conforme aumenta la resolución de la tecnología de escaneo del genoma humano. **Friedman JM y col., 2006 (38)**, estudiaron 100 niños con retardo mental idiopático, retraso del desarrollo, dismorfias y diversas malformaciones con cariotipo convencional normal y usando Affimetrix oligo SNP array 100K (resolución 26.3-30 kb), detectaron 10 VNC de novo (8 fueron deleciones de 178 Kb a 11 Mb y 2 duplicaciones de 1.1 Mb y 2.2 Mb).

Ming JE y col., 2006 (39), en 10 pacientes con MCM con cariotipo convencional y FISH subtelerómico normal, después mediante oligo SNP array 100K, detectaron 2 deleciones en 2 casos, uno de 1.8 y otro de 2.8 Mb, mostrando una tasa de 15- 20 % superior en la detección de desbalances cromosómicos comparado con el cariotipo

convencional. **Hoyer J y col., 2007 (40)**, en 104 pacientes con retraso mental, talla baja y diversas malformaciones de etiología desconocida, mediante oligo SNP array 100K, detectaron en 10 casos 11 aberraciones cromosómicas de novo o aparentemente causante de enfermedad (2 duplicaciones y 9 deleciones) con tamaños de 400 Kb a 14 Mb. Otras 14 aberraciones fueron consideradas heredadas por los padres con tamaño de 20 Kb a 2 Mb, llevando a una tasa de detección de 24%. **Aradhya y col., 2007 (41)**, estudiaron 20 pacientes con discapacidad intelectual (DI), retraso del desarrollo (RD), rasgos dismórficos y/o MC con cariotipo normal, mediante oligo aCGH array a una resolución de 35 kb, identificaron 10 deleciones o duplicaciones (detección en 50% de los pacientes), con rango en talla de 280 kb a 8.3 Mb, 7 de 10 desbalances fueron nuevos y 5 fueron de novo.

Fan YS y col., 2007 (42), analizaron 100 pacientes con retraso mental inexplicable, retraso del desarrollo, dismorfias, malformaciones diversas y cariotipo normal, el estudio mediante oligo array CGH 44K y oligo array CGH 244K (resolución 35 Kb), detectó desbalances patogénicos en 15% de los casos, con talla de 459 kb a 19 Mb, 9 fueron nuevas aberraciones.

Baldwin EL y col., 2008 (43), incluyeron 211 casos con retraso del desarrollo, dismorfias, falla del crecimiento, alteración del lenguaje y anomalías congénitas, mediante una combinación de oligonucleótidos CGH array con regiones dirigidas y amplio del genoma, con una resolución de 500 kb a 50 kb, detectaron anomalías de significancia clínica en 33 muestras (15.6%), el tamaño de las deleciones fueron desde 40 Kb a 47.7 Mb y las duplicaciones de 400 Kb a 30 Mb, 4 casos (1.9%) fueron identificados con desbalances publicados previamente, cuyo significado clínico fue incierto.

Bruno y col., 2009 (44), analizaron 117 pacientes mediante Affimetrix 250K SNP array (resolución 26 Kb), detectando 434 VNC, 195 deleciones y 239 duplicaciones, de los cuales 18 fueron consideradas patogénicas (4.1 %) y 9 potencialmente patogénicas, haciendo una producción diagnóstica de 23 % entre estos casos, 16 de 18 de las VNC patogénicas fueron mayor de 500 kb (media de 2.41 Mb), mientras que los potencialmente patogénicos 8 de 9 fueron mayor de 500 kb (media de 1.72 Mb), también detectaron regiones de LOH mayor de 5 MB en 5 pacientes (media de 13.9 Mb). **Gijsbers y col, 2009 (36)**, realizaron un análisis de 310 casos con retraso

mental, anomalías congénitas y cariotipo normal, con 4 tipos de array (Affymetrix GeneChip 262K y 238K Arrays (resolución de 12 kb), Illumina HumanHap 300 BeadChip y Human CNV 370 BeadChip (resolución 9 kb) detectaron VNC que traslapaban regiones con síndromes de microdelección/duplicación (6 casos) o descritos como nuevas regiones (8 casos) (4.5 % patogénicas), 62 VNC potencialmente patogénicas en 52 pacientes (17 % de la muestra) sumados hacen una producción diagnóstica de 22%. De estos 62 VNC patogénicas, 27 fueron heredados de un padre sano y 22 fueron de Novo, 13 no pudieron ser confirmados por ausencia de ADN de los padres. 4 pacientes mostraron LOH. **D'amours y col 2014 (37)**, analizaron a 21 niños con DI con o sin MC, el estudio citogenético fue normal, después mediante el Affimatrix SNP 6.0 y 2.7 M detectaron 139 y 150 VNC, de los cuales 89 (64%) y 139 (92.7 %) fueron de significado incierto, 6 VNC fueron patogénicas (4.3%) y 7 (4.7%), en 3 (14.3%) y 6 (28.6 %) casos, respectivamente. También identificaron regiones de LOH en 4 niños que contenía un gen recesivo asociado al fenotipo de los pacientes y confirmado mediante la detección de una mutación homocigota con la secuenciación del exoma en 3 de ellos. Otro estudio incluyó 54 recién nacidos con MCM analizados con CytoSure, ISCA 8 X 60K (resolución de 50 kb), detectaron 10 VNC en 10 pacientes (18%), 7 deleciones y 3 duplicaciones, 6 fueron clasificados como patogénicos (11% del total de casos) y 4 probablemente patogénicos, 8 fueron de novo. La talla fue de 50 kb a 16.36 Mb **(45)**. **Uehara y col., 2016 (46)**, estudiaron 450 casos con DI y MCM, mediante SNP array HumanOmni Express-12 v1.0 (resolución 30 Kb), detectaron 15 VNC de significancia incierta (4 de novo), 11 patogénicos (talla promedio 1.9 Mb); de estos, 3 (27 %) fueron de < 500 Kb. 12 fueron potencialmente patogénicas (talla media 3.3 Mb, 7 fueron de <500 Kb y 3 <100 Kb), la suma de estos da una tasa de detección de 8.4%. También, se detectaron 31 LOH en 5 casos con tamaño de 24-183 Mb. **Hollenberk y col., 2017 (47)**, estudiaron mediante la combinación de 3 plataformas 4417 casos con RD, DI, facies dismórficas y/o anomalías congénitas. En 383 casos (8.67 %) encontraron 435 VNC (9.8%) no recurrentes y de Novo, menores a 500 Kb, de estos, 288 VNC fueron de significado incierto (en 241 casos), 147 VNC fueron consideradas patogénicas o potencialmente patogénicas (142 casos=3.2%).

Recientes datos con Array de alta densidad, sugieren que el 95% de las VNC en el genoma humano son < 100 Kb (submicroscópicas), con una longitud media de 2.9 Kb y la mayoría se desconoce su significancia clínica **(48)**

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las MC representan el 3% de la población general, su clínica y etiología es muy heterogénea y en aproximadamente 50% de los casos no se logra integrar un diagnóstico.

Con el cariotipo molecular el estudio de las MC ha avanzado. En nuestros pacientes se descartan factores teratogénicos, síndromes cromosómicos o de microdelección/microduplicación y monogénicos reconocibles, sin embargo, permanece un grupo de pacientes con MCM cuya etiología genética no está determinada.

2.1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Al utilizar el cariotipo molecular mediante oligo-SNP array de alta resolución (HR: High Resolution) (1.15 Kb) permitirá detectar VNC pequeñas (<500 Kb) y/o submicroscópicas (<100 Kb) y regiones de LOH los cuales podrían tener una relación patológica con el fenotipo de nuestros pacientes, también, permitirá conocer la frecuencia y el tamaño del desbalance cromosómico y de las LOH en los pacientes con MCM de etiología no determinada.

En adición, la delineación precisa de los puntos de ruptura de las deleciones y duplicaciones, y de los sitios de inicio y final de las LOH proporcionara una liga directa al contenido genético en estas áreas, permitiendo reconocer genes asociados a estos defectos.

En consecuencia, la detección de los desbalances cromosómicos mediante cariotipo molecular, permitirá definir una causa, integrar un diagnóstico, así como un asesoramiento genético correcto, ayudando a disminuir la ansiedad familiar y asegurar que las personas con alto riesgo puedan ejercer el derecho a la reproducción de manera informada.

Existen pocos estudios a nivel internacional y en México no existen estudios acerca de la detección de los desbalances cromosómicos y LOH, describiendo su frecuencia, tamaño o su relación patológica con los pacientes con MCM de etiología no determinada mediante cariotipo molecular de alta resolución

2.2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Con la técnica de cariotipo molecular HR se detectarán desbalances cromosómicos pequeños-submicroscópicos, nuevos, y/o LOH patológicos, en pacientes con MCM de etiología no determinada?

2.3. HIPOTESIS

En una muestra de pacientes con MCM de etiología no determinada, si se detectaran desbalances cromosómicos patológicos en 20 % de los casos, pequeños (<500 kb) - submicroscópicos (<100 kb), nuevos y/o LOH patológicos mediante cariotipo molecular HR.

2.4. OBJETIVO

Detectar desbalances cromosómicos patológicos, pequeños, nuevos y/o LOH patológicos mediante el cariotipo molecular HR en pacientes con MCM de etiología no determinada.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio observacional, transversal, descriptivo, ambispectivo.

3.2. UNIVERSO DE ESTUDIO

Pacientes con malformaciones congénitas múltiples que cuenten con expediente clínico completo o que acudan por primera vez a la consulta externa de Genética Médica y que reúnan los criterios de estudio.

3.3. MUESTREO

A conveniencia, no probabilístico,

3.4. CRITERIOS DE ESTUDIO

Criterios de inclusión

- Sujetos de recién nacido a 15 años.
- Pacientes con 2 o más MC mayores o con 1 mayor + 2 o más menores.
- Con estudio de cariotipo convencional normal.
- Que los padres o tutores del paciente firmen la carta de consentimiento de participación en el protocolo.

Criterios de exclusión

- Pacientes con antecedentes de exposición a teratógenos o factores ambientales
- Antecedente de enfermedad gestacional en la madre.
- Diagnóstico clínico de enfermedad genética mendeliana o síndrome de microdelección/ microduplicación reconocible.

Criterios de eliminación

- Pacientes con muestra de ADN insuficiente para completar el estudio.
- Padres con muestra insuficiente de ADN para completar el protocolo.

3.5. DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES DE ESTUDIO

FRECUENCIA DEL DESBALANCE CROMOSÓMICO:

Definición conceptual: Se refiere al número de VNCs detectados con el cariotipo molecular de los pacientes.

Definición operacional: Número de deleciones, duplicaciones o LOH encontrados en los pacientes con MCM de etiología no determinada con CM- HR.

Tipo de medición: Cuantitativa, discreta

Unidad de medición: No, (%) de desbalances.

TAMAÑO DEL DESBALANCE CROMOSÓMICO:

Definición conceptual: Longitud de las VNCs detectados con el cariotipo molecular.

Definición operacional: Longitud de las deleciones, duplicaciones o LOH encontrados en los pacientes con MCM de etiología no determinada con CM- HR.

Tipo de medición: Cuantitativa, discreta

Unidad de medición: Pares de bases (pb), kilobases (Kb), megabases (Mb).

NOVEDAD DEL DESBALANCE CROMOSÓMICO:

Definición conceptual: Son las VNCs que están o no están reportados en las bases de datos de variaciones del número de copias.

Definición operacional: Las VNCs que están reportadas como patogénicas/polimórficas (recurrente) o no están reportadas (nueva) en las bases de datos DGV, UCSC, Ensembl, ClinVar, ClinGen, OMIM, pubmed, DECIPHER y que son categorizadas de acuerdo a las guías del Colegio Americano de Genética Médica (ACMG).

Tipo de medición: Cualitativa, nominal, dicotómica.

Unidad de medición: Recurrente o Nuevo

SIGNIFICANCIA CLÍNICA

Definición conceptual: Relación causal del contenido genético del desbalance cromosómico (VNC) con el fenotipo del paciente con MCM.

Definición operacional: Relación del contenido genético de la delección, duplicación o LOH con las malformaciones congénitas del paciente, después de su análisis mediante las bases de datos DGV, UCSC, OMIM, pubmed, DECIPHER o estudios complementarios y de acuerdo a las guías del colegio americano de genética médica (ACMG).

Tipo de medición: Cualitativa, policotómica.

Unidad de medición: VNC patogénica, VNC potencial patogénica o incierta, VNC benigno.

3.5. TAMAÑO DE LA MUESTRA

Cálculo del tamaño de la muestra para proporciones

Tomando en cuenta el porcentaje de detección de desbalance cromosómicos de los diferentes estudios donde se analizaron pacientes con DI, RD y/o MC por cariotipo molecular se realizó el cálculo de muestra para proporciones.

El porcentaje más alto de detección de desbalances cromosómicos patogénicos es de 28% ($\pi_0 = p = 0.28$; $q = 0.72$) **(37)** y el más bajo fue 3.2% ($\pi_1 = p = 0.032$; $q = 0.968$) **(47)**. Tomando un valor alfa de 0.05 y un poder de 90% se aplica la siguiente fórmula y obtenemos un tamaño de muestra de 10 pacientes.

$$n = \left[\frac{Z_{\alpha} \sqrt{\pi_0(1 - \pi_0)} - Z_{\beta} \sqrt{\pi_1(1 - \pi_1)}}{\pi_0 - \pi_1} \right]^2$$

3.5. DISEÑO ESTADÍSTICO

Los datos de los pacientes con MCM se recabaron de manera manual en la hoja de recolección de datos de Excell y SPSS v. 24, asignado al paciente un número. Se realizaron medidas de tendencia central y dispersión para las variables cuantitativas. Se describen frecuencias, porcentajes o proporciones para variables cualitativas y se representan mediante gráfica de pastel y barras.

3.6. PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO

Los pacientes fueron elegidos a partir de los casos que acuden por primera vez a la o de casos previos vistos en la consulta externa de genética medica que reúnen los criterios de inclusión del estudio. A continuación, el algoritmo siguiente resumen los pasos que se sigue para la determinación de la frecuencia, tamaño, novedad y significancia clínica del desbalance cromosómico (Figura 3).

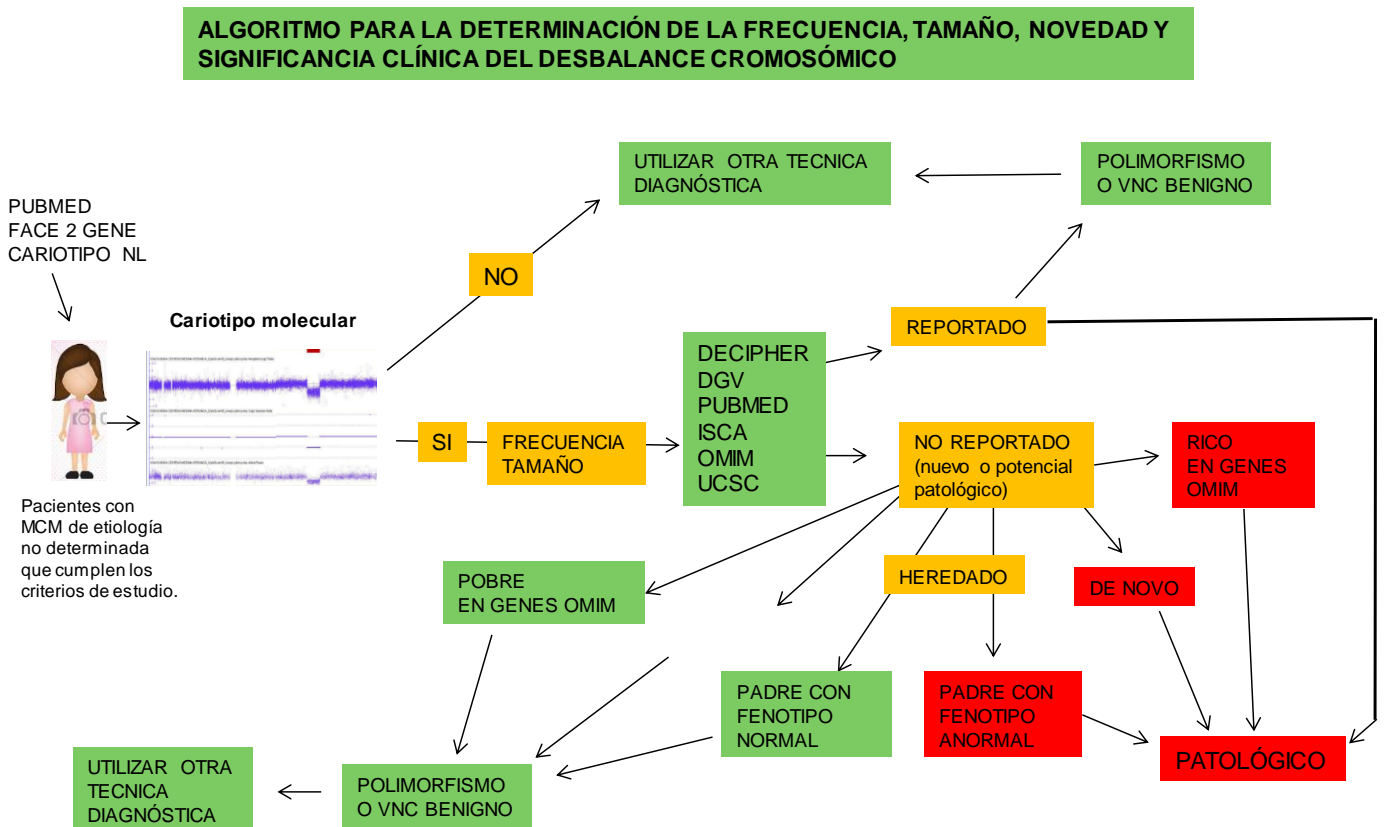


Figura 3. Algoritmo para la determinación de la frecuencia, tamaño, novedad y significancia clínica de un desbalance cromosómico. Adaptado de Gijbers 2009, Miller 2010 (50) y de la ACMG 2011.

3.7. METODOLOGÍA CARIOTIPO MOLECULAR

Extracción de ADN

Las muestras de sangre se recolectaron en tubos con anticoagulante (EDTA). La extracción del ADN se llevó con el método orgánico, utilizando el kit de Wizard bajo las indicaciones del proveedor (promega). Extraída la muestra de ADN, se procedió a la cuantificación por espectrofotometría a una longitud de onda 260/280 nm (con una aceptación de 1.8) y para verificar su integridad se realizó un gel de agarosa a una concentración de 0.8% teñido con Midorigreen y verificar que sea una molécula de alto peso molecular. Una vez extraído, el ADN de los pacientes se resguardo en el Laboratorio de Genética del HGM, a -20°C hasta que se procedió a la realización de los estudios necesarios.

A. Digestión

250ng de ADN se colocó en un tubo para PCR, se agregó 14.75 µl de Master Mix, se mezcló, se centrifugó y paso al termociclador

B. Ligación

Al ADN digerido se agregó 5.25 µl de Master Mix, se mezcló, centrifugo y se pasó al termociclador, el DNA ligado se diluyó con 75 µl de agua.

C. PCR

Se transfirió 10 µl de DNA ligado y diluido a 3 tubos de PCR, se agregó 90 µl de Master Mix de PCR a cada tubo, se mezcló en vortex, se centrifugó, pasó al termociclador y se corrió en gel al 2% en TBE.

D. Purificación y cuantificación de PCR

La base se conectó con la placa de filtrado al vacío y se reguló a 600 mbar, se adicionó 8 µl de EDTA 0.1M a cada reacción de PCR, se mezcló en vortex y se centrifugó, se colocaron las 3 reacciones en un mismo pozo de la placa y se esperó a que se secase, se lavó 3 veces con 50 µl de agua (cada lavado se llevó aproximadamente 30 minutos), se liberó el vacío y se colocó la placa sobre un papel absorbente, se adicionó 45 µl de buffer RB y colocó 10 minutos en la incubadora a 25° C y se agitó a velocidad 5, se recuperó la PCR purificada, y se diluyó el producto 198 µl de agua y 2 µl de producto de PCR y se cuantificó.

E. Fragmentación

El termociclador precalentado a 37° C, en un tubo de PCR se colocó 90 µg de producto de PCR, se ajustó el volumen a 45 µl con buffer RB, se adicionó 5 µl de buffer de fragmentación 10X a cada muestra y 5 µl de mix de fragmentación, se mezcló, se centrifugó y paso al termociclador, se corrió en gel al 4% en TBE (se obtuvieron fragmentos < a 180 pb)

F. Marcaje

En un tubo de PCR se colocó 50.5 µl de producto de fragmentación, se adiciono 19.5 µl de mix de marcaje, se mezcló, centrifugo y paso al termociclador, se centrifugó para colectar el producto marcado.

G. Hibridación

Se precalentó el horno a 50° C, 1 hora antes de usarlo. En un tubo de PCR se agregó 70 µl de producto marcado, se adicionó 190 µl de mix de hibridación, se mezcló, centrifugo y desnaturalizó a 99° C por 10 minutos, se colocó en hielo 10 segundos, se centrífugo y se calentó a 50° C por 1 minuto, se inyectó en el chip 200 µl de este producto, hibridó a 50° C por 16-18 hrs a 60 rpm, después de la hibridación se recuperó la muestra y se almacenó a <80° C

H. Lavado del CHIP

Se preparó la estación de fluidos con los buffers correspondientes (buffer de lavado A, B y agua). Se inició la estación de fluidos con PRIME-450. Se colocó en tubos de 1.5 ml las soluciones: 1) SAPE (600 µl), 2) anticuerpo biotinilado (600 µl), 3) buffer array holding (820 µl), se recuperó la muestra y se llenó el chip con 270 µl de buffer array holding, el lavado inició de acuerdo al protocolo, se revisa que el chip no tenga burbujas, se escanea el chip, y se culmina el proceso de la estación de fluidos.

I. Análisis

El análisis se llevó a cabo utilizando la matriz CytoScan HD (SNP-array) siguiendo el protocolo proporcionado (Affymetrix, Santa Clara, CA, EE.UU.). La matriz se escaneo utilizando el escáner Affymetrix GeneChip 7G 3000, y los datos se analizaron mediante GType (GeneChip Genotipado Análisis de Software, versión 1.0.12) para detectar los desbalances o variaciones en el número de copias. La resolución de este procedimiento se estima en 1,15 kb.

3.8. Análisis de los datos para detección de las VNCs

La normalización entre muestras de los datos de intensidad log₂ se realizó utilizando muestras de referencia analizadas internamente que minimizaron la SD ("ruido") para cada muestra. Las VNC se detectaron mediante inspección visual de las gráficas de intensidad log₂ normalizadas, así como análisis numérico del *ratio* de intensidad log₂ del SNP. La salida de GTYPE se exportó a Microsoft Excel, que luego se filtró en busca de grupos de SNP que cumplan los criterios descritos anteriormente. El reconocimiento de VNC también fue ayudado por las inferencias automáticas del Modelo oculto de Markov (HMM) del número de copias de ADN en GTYPE. Los puntos de ruptura de VNC se determinaron inspeccionando las relaciones de intensidad log₂ de SNP dentro y flanqueando las regiones de ganancia o pérdida detectadas.

3.9. Determinación de la significancia clínica de las VNCs

La interpretación de la significancia clínica de todos los cambios observados en el número de copias se compararon con los VNC catalogados en la Base de datos de variantes genómicas (DGV; <http://projects.tcag.ca/variation/>) y el UCSC genome browser (<http://genome.ucsc.edu/>). Cytogenomics Array Group CNV Database, Ensembl Resources, OMIM, ClinGen, ClinVar. El genoma humano de referencia utilizado para observar el contenido de genes dentro las CNV de interés fue NCBI 38 (hg38). Para las regiones candidatas putativas que contenían al menos un gen, la evaluación incluyó búsquedas de casos similares en PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) y DECIPHER (<https://decipher.sanger.ac.uk/>) y la patogenicidad de las VNC se evaluaron utilizando las guías de Working Group of the American College of Medical Genetics (ACMG) **(36, 49)**. Las VNC se clasificaron en 3 grupos: tipo I, las CNV conocidas patogénicamente (síndromes de microdelección o microduplicación conocidos o recientemente descritos), tipo II, VNC potencialmente patogénicos o nuevos (no descritos en la DGV Database) y tipo III, descritos como polimórficos en la DGV Database. Los tipos II fueron valorados con PUBMED; OMIM, Ensembl, DECIPHER para búsqueda de contenido de genes y casos similares **(36)**.

3.10. Detección de las LOH y determinación de la significancia clínica

Las regiones de LOH fueron identificados cuando se detectaban genotipos con al menos 300 SNP consecutivas homocigotas. Debido al promedio de heterocigocidad de 0.3 de los SNP, existe una probabilidad muy baja de que estos aparezcan por casualidad. Todas las regiones de LOH fueron detectados usando GTYPEv4.1 (Affymetrix) para descartar algún artefacto.

La relación del fenotipo con el gen dentro del segmento de LOH fueron evaluados mediante la herramienta "Genomic Oligoarray and SNP array evaluation tool (www.ccs.miami.edu/ROH)", introduciendo las coordenadas genómicas de todas las LOH, una lista de los genes OMIM recesivos mapeando dentro de estas regiones fue proporcionada para su posterior análisis de su asociación con el fenotipo de nuestros pacientes.

4. CONSIDERACIONES ÉTICAS

La realización de este estudio sigue los postulados de la "Declaración de Helsinki (última actualización en la Asamblea General 64^o, en Fortaleza, Brasil, 2013), así como de las buenas prácticas clínicas de la Asociación Médica Mundial", que establecen los principios éticos para las investigaciones médicas en los seres humanos. Va de acuerdo con la "Ley General de Salud" de México y con su "Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud". Este es un estudio con riesgo menor que el mínimo. También se considera la elaboración del protocolo previa aprobación del comité de ética en investigación y de investigación de los hospitales donde se obtuvieron los pacientes.

4.1 CONFLICTO DE INTERÉS. Los investigadores participantes en este proyecto declaran que no existe ningún conflicto de interés

Tabla 4. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

CONCEPTO	ACTIVIDAD
1er semestre	<ul style="list-style-type: none">•Adquisición de reactivos, materiales de laboratorio.•Captación y selección de pacientes para su integración.
2º semestre	<ul style="list-style-type: none">•Captación y selección de pacientes para su integración.•Estandarización de la técnica de cariotipo molecular.
3er semestre	<ul style="list-style-type: none">•Captación y selección de pacientes para su integración.•Realización de cariotipo molecular
4º semestre	<ul style="list-style-type: none">•Captación y selección de pacientes para su integración•Realización de cariotipo molecular
5º semestre	<ul style="list-style-type: none">•Realización de cariotipo molecular y análisis de datos.
6º semestre	<ul style="list-style-type: none">•Divulgación de los primeros resultados en congresos nacionales o internacionales.
7º semestre	<ul style="list-style-type: none">•Reporte de los resultados en revistas nacionales o internacionales.
8º semestre	<ul style="list-style-type: none">•Titulación.

5. RESULTADOS

PACIENTES

Caso 1. Niña de 14 años, es la segunda gesta de padres sanos, no consanguíneos y jóvenes (28 y 33 años al momento de la concepción). Los antecedentes familiares fueron negativos para malformaciones congénitas o discapacidad intelectual. Sin antecedentes de exposición prenatal a teratógenos o enfermedad materna. La ecografía reveló placenta previa en el tercer trimestre. La propósito nació por parto a las 39 semanas de gestación con un peso de 3200 g (percentil 25), talla 49 cm (percentil 50-25) y Apgar 8¹, 9⁵. No requirió manejo neonatal especial. Su desarrollo motor fue normal, con control de la cabeza a la edad de 4 meses, se sentó a los 6 meses, se puso de pie a los 9 meses, caminó sin apoyo al año-8 meses; su primer monosilábico fue a los 11 meses, y dijo frases al año-3-meses. Al inicio de la escuela, tuvo problemas del aprendizaje leve. Presento reflujo gastroesofágico a los 3 meses, que remitió al año. Fue intervenida por quiste inguinal derecho a los 4 años. Al examen físico, su peso fue de 18.500 kg (Percentil 50-75), longitud 110 cm (Percentil 75) y perímetro cefálico (PC) de 56 cm (Percentil >98). Se observó macrocefalia, sinofris, hipertelorismo, fisuras palpebrales hacia abajo, orejas grandes y acopadas, puente nasal ancho, nariz bulbosa, 1er dedo de los pies anchos (Figura 4A). La resonancia magnética cerebral mostró cavum vergae y septum pellucidum persistentes (Figura 4B). El cariotipo fue 46, XX. La ecografía abdominal, los análisis de sangre, orina y el perfil de tiroides fueron normales.



Figura 4. A) Femenino de 14 años con macrocefalia, sinofris, hipertelorismo, fisuras palpebrales hacia abajo, orejas grandes y acopadas, puente nasal ancho, nariz bulbosa, 1er dedo de los pies anchos. B) RM cerebral con persistencia del cavum vergay, septum pellucidum.

Caso 2. Es una niña de 2 años y 8 meses, la tercera gesta de padres sanos, jóvenes (26 y 34 años en el momento de la concepción), y no consanguíneos. Los antecedentes familiares fueron negativos para malformaciones congénitas o discapacidad intelectual. Se registró el consumo de nitrofurantoína, 1 comprimido cada 8 horas durante 5 días, a las 22 semanas de gestación por infección del tracto urinario. La ecografía a las 26 semanas de gestación registró labio y paladar hendido. La propóscito nació por cesárea a las 38 semanas de gestación con un peso de 3.035 g (percentil 25) y una longitud de 50 cm (percentil 50-25), PC 32 cm (percentil 3) y Apgar 8¹, 9⁵. No requirió manejo neonatal especial. Sin embargo, su desarrollo motor ha sido anormal, sin control de la cabeza o el desarrollo del lenguaje.

En el examen físico, peso 9.200 kg (percentil <3), talla 87 cm (percentil 3-10) y PC 46 cm (percentil <3). Se observó microcefalia, fisuras palpebrales hacia arriba, puente nasal bajo, nariz bulbosa, labio y paladar hendido bilateralmente (Figura 5A). La resonancia magnética cerebral mostró atrofia cortical y bandas heterotópicas (Figura 5B). El cariotipo fue 46, XX. El estudio auditivo detectó hipoacusia neurosensorial. La valoración cardiológica, la ecografía abdominal, los potenciales visuales, el análisis de sangre, de orina y el perfil tiroideo fueron normales.

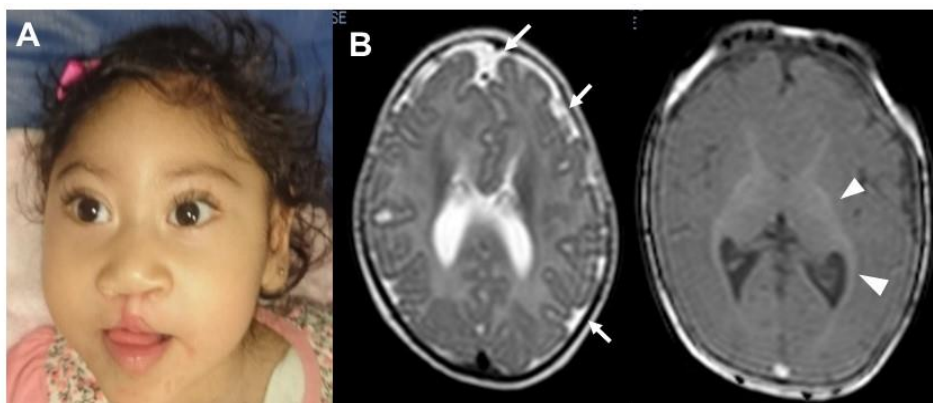


Figura 5. A) Femenino de 2 años y 8 meses con microcefalia, fisuras palpebrales hacia arriba, puente nasal bajo, nariz bulbosa, labio y paladar hendido bilateralmente. B) RM cerebral muestra atrofia cortical y bandas heterotópicas.

Caso 3. Un niño de 4 años, el cuarto hijo de padres sanos, no consanguíneos, de 33 y 49 años en el momento de la concepción. Los antecedentes familiares reportaron una tía materna fallecida con macrocefalia al nacer. No exposición a teratógenos o enfermedad materna. El propósito nació por cesárea a las 40 semanas de gestación con un peso de 3.040 g (percentil 25), talla 47 cm (percentil 50-25), PC 36 cm (percentil 50) y Apgar 9¹, 9⁵. No requirió manejo neonatal especial. Se detectó soplo cardíaco a los 10 días y se sospechó hidrocefalia a los 7 meses. Su desarrollo motor fue normal con control de la cabeza a la edad de 7 meses; su primer monosilábico fue a los 5 meses. En el examen físico, su peso fue de 7.500 kg (percentil 50-75), longitud 67 cm (percentil 75) y PC 52 cm (percentil >98). Se observó macrocefalia con regiones fronto-parietal-temporales prominentes, orejas rotadas de implantación baja, puente nasal bajo, estrabismo convergente, epicanto bilateral, tórax prominente, escoliosis de la columna toracolumbar, acortamiento del miembro inferior izquierdo. La resonancia magnética cerebral mostró ventriculomegalia (Figura 6A). La valoración cardiológica con electrocardiograma y ecocardiograma resulto con transposición de grandes arterias con atresia pulmonar, comunicación interauricular, persistencia del conducto arterial y ventrículo izquierdo hipoplásico. La ecografía abdominal reportó ausencia de riñón derecho y criptorquidia derecha: La radiografía mostró hemivertebra a nivel de L1-L3 (Figura 6b). El perfil tiroideo, la biometría hemática, orina y el resto de estudios fueron normales. El cariotipo fue 46, XY.

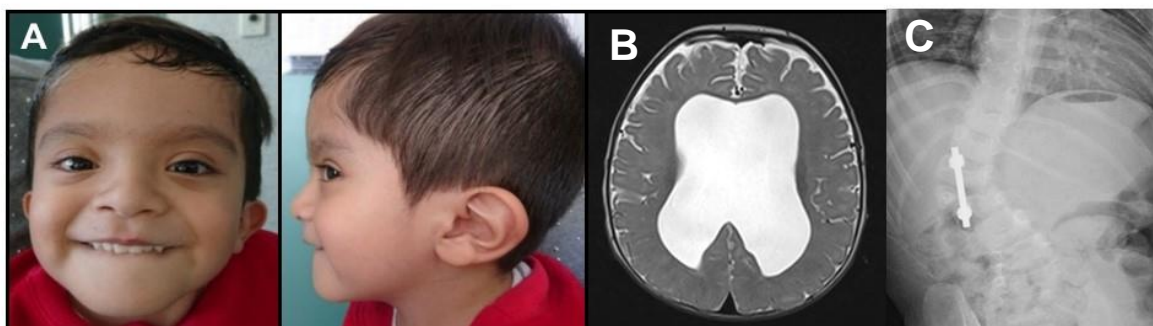


Figura 6. Masculino 4 años con A) macrocefalia, orejas grandes, rotadas de implantación baja, puente nasal bajo, estrabismo convergente, epicanto bilateral. B) RM cerebral muestra ventriculomegalia C) Rx de columna toracolumbar con hemivertebra en L1-L3.

Caso 4. Una niña de 7 años, la tercera hija de padres sanos, no consanguíneos, de 30 y 35 años de edad en el momento de la concepción. Los antecedentes familiares reportaron 3 primos por rama materna con discapacidad intelectual. No se registraron antecedentes de exposición prenatal a teratógenos o enfermedad materna. La ecografía en el embarazo fue normal. Ella nació por cesárea a las 38 semanas de gestación con un peso de 3.800 g (percentil 25), Apgar de 8¹, 9⁵, talla y PC no se registraron. A los 15 días de vida, la paciente requirió un manejo especial por insuficiencia respiratoria y taquicardia. Su desarrollo motor fue anormal; se sentó al año-2 meses, camino con apoyo al año-5 meses y caminó sin apoyo al año-8 meses. Su primer monosílabo fue a los 6 meses y dijo frases al año y 3 meses. presentó hepatoesplenomegalia al año y bronconeumonía al año-1 mes. Al examen físico, pesó 17 kg (percentil <3), midió 116 cm (percentil 10-25) y PC 53,5 cm (percentil 90). Se observó prominencia frontal, implantación baja de orejas, proptosis ocular, nariz corta con puente nasal bajo y punta nasal ancha, filtrum largo, pliegues en el párpado inferior (Figura 7A) y dientes desgastados moteados. También presentó hemangioma en cuello y hombro izquierdo, teletelia con hipoplasia, abombamiento abdominal por hepatomegalia, pliegue abundante en palmas, extremidades hipotróficas. La resonancia magnética cerebral mostró atrofia cortical bilateral frontal y temporal con áreas hiperintensas cerca de los ventrículos, cuerpo calloso adelgazado en su parte distal. El ecocardiograma detectó comunicación interauricular, persistencia del conducto arterioso y estenosis pulmonar. La ecografía de abdomen informó hepatitis inespecífica. La evaluación oftalmológica mostró coloboma bilateral de disco óptico, estafilomas posteriores (Figura 7B), miopía degenerativa, nanofthalmos y endoforia del ojo izquierdo. La evaluación nefrológica informó acidosis tubular renal. Los estudios de laboratorio mostraron niveles bajos de IgA, monocitosis, linfopenia, anemia, trombocitopenia, alta sedimentación de eritrocitos. Los Niveles de N-galactosamina 6 sulfato sulfatasa, aril sulfatasa B, biopsia y prueba funcional del hígado fueron normales. El cariotipo fue 46, XX.

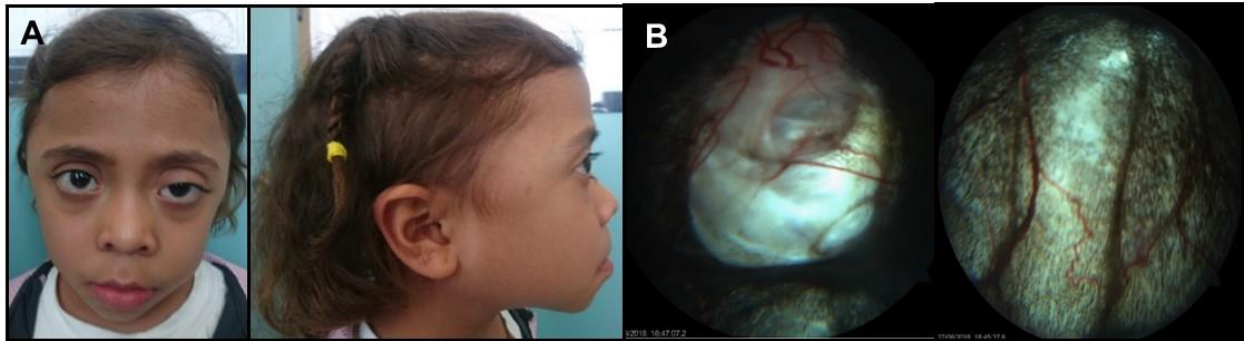


Figura 7. Femenino de 7 años. A) prominencia frontal, implantación baja de orejas, proptosis ocular, nariz corta con puente nasal bajo y punta nasal ancha, filtrum largo, pliegues en el párpado inferior. B) La imagen muestra coloboma bilateral de disco óptico, estafilomas posteriores.

Caso 5. Es un niño de 6 años, el tercer hijo de padres sanos, no consanguíneos, de 27 y 28 años de edad en el momento de la concepción. Los antecedentes familiares fueron negativos para malformaciones congénitas o discapacidad intelectual. La madre informó del uso de aspirina durante el embarazo. Una ecografía del tercer trimestre registró taquicardia. El propósito nació por cesárea a las 37 semanas de gestación con un peso de 2.450 g (percentil 25), longitud de 47 cm (percentil 50-25), PC no registrado, Apgar de 7¹, 8⁵. Requirió manejo neonatal especial por cardiopatía congénita y fue sometido a gastrectomía y piloroplastia para la estenosis del píloro, también, presentó criptorquidia derecha y hernia umbilical. Su desarrollo se presentó con retraso en la marcha, camino sin apoyo a los 3 años-6 meses, controló su esfínter a los 3 años-6 meses. Sus oraciones son cortas con sustituciones y omisiones, y utiliza gestos al comunicarse. En la exploración física su peso fue de 17 kg (percentil 10-25), talla 107 cm (percentil <3), PC 48 cm (percentil 3); se observó microcefalia, fisuras palpebrales ascendentes, puente nasal alto, micrognatia (Figura 8A), úvula bífida, paladar hendido submucoso con insuficiencia velofaríngea, pezones hipertróficos, a nivel sacro presenta un hoyuelo con hipertriosis, criptorquidia derecha. La resonancia magnética cerebral mostró datos de atrofia cortical del lóbulo temporal izquierdo (Figura 8B). La evaluación cardiológica detectó cardiopatía congénita compleja con estenosis aórtica y mitral, comunicación auricular y ventricular, conducto arterioso persistente y vena subclavia derecha aberrante. El perfil tiroideo detectó hipotiroidismo. El cariotipo fue 46, XY. La ecografía abdominal, los análisis de sangre y orina fueron normales.



Figura 8. Masculino de 6 años. A) facie con microcefalia, fisuras palpebrales ascendentes, puente nasal alto, nariz corta, filtrum largo, micrognatia. B) RM cerebral muestra atrofia cortical del lóbulo temporal izquierdo.

Table 5. Describe las características genéticas de las VNC de significado incierto y patogénica en nuestros 5 casos.

No Case	Localización	Talla (Kb)	Coordenadas genómicas (hg38)	Genes (OMIM)	DGV, ClinVar	ClinGen, PLI, Fenotipo DICEPHER	Nuevo o recurrente	Estado patogénico
Case 1	<u>3p21.31</u>	13.5	44561801-44575346	ZKSCAN7 (ex 3-6)	(-), NR	2 GDD, (0.1), 1	N	U
	<u>6p25.3</u>	44.8	257339-302184	DUSP22	+10, B	ND, (0.1), 1 DI e hipertelorismo (266719)	R	U
	9q32	62.2	112196361-112258608	PTBP3 (ex 1-8)	(-), NR	ND, (0.1), (-)	N	U
	Xq27.3	5.9	147933103-147939019	FMR1 (ex 10-12)	(-), NR	ND, (0.1) (-)	N	U
	<u>Xq26.1</u>	5.7	130078335-130084070	ELF4 (ex 2)	(-), NR	ND, (0.7), (-)	N	U
Case 2	<u>11p13</u>	31	31509401-31540684	del exon 1 IMMP1L, del exon 1-3 ELP4	(2), P	Paladar hendido, GDD (301500), Retraso motor grueso y del lenguaje (370488).	R	P
Case 3	<u>1p13.3</u>	120	108734221-108853796	SLC25A24, NBPFF4, FNDC7, STXBP3, AKNAD1	(3), ND	ND, (0.3), (-)	R	U
	<u>6p25.3</u>	38	257048-294826	DUSP22	(20), B	ND, (0.1), macrocefalia (286128)	R	U
	<u>7p13</u>	23	44814171-44837484	PPIA, H2AFV	(-), NR	ND, (0.9) (0.4), (-)	N	U
	<u>9q21.33</u>	11	87477784-87488590	NTRK2	(-), NR	ND, (1), (-)	N	U
	22q11.22.	254	23004886-23258939	IGLL5, RSPH14, GNAZ, RAB36, BCR.	(5), ND	ND, (-), (-)	R	U
Case 4	14q32.33	461	106251486-106712665	MIR4507, MIR4538, MIR4537, MIR4539, FAM30A, ADAM6	(-), NR	ND, (-), (-)	N	U
	<u>16p13.11</u>	199	14927408-15126890	NOMO1, MIR3179-1-4, MIR3670-1-4, MIR3180-1-3, MIR6511A1-A4, MIR6770-1-3, NPIPA1, PDXDC1. NTAN1	(5), ND	ND, (0.3), (-)	R	U
	16p13.3	373	6750079-7123433	RBFOX1 (exon 3)	(5), ND	ND, (1.0), (-)	R	U
Case 5	14q32.33	381	106329183-106709974	FAM30A, ADAM6	(-), NR	ND, (-), (-)	N	U
	<u>19q13.42</u>	121	55238704-55359433	KIR3DL3, KIR2DL3, KIR2DL1, KIR2DL4, KIR3DL1, KIR2DS4	(-), NR	ND, (-), (-)	N	U

DGV: database genomic variants, UCSC: University of California Santa Cruz Genome Browser, DECIPHER: DatabasE of genomIc varlation and Phenotype in Humans using Ensembl Resources, CLIN VAR: Clinical variations, CLINGEN: Clinical relevance of genes and variants, PLI: probabilidad que un gen es intolerante a una pérdida de función heterocigota, NR: no reportado, ND: No determinado, (No): número de veces reportado, B: Benigno, (-): no hay información, N: Nuevo, R: Recurrente, P: Patológico, U: significado incierto, GDD: retraso global del desarrollo.

Table 6. Describe las características genéticas en 3 casos con LOH.

No Caso	Localización Cromosomica	Talla (Mb)	Coordenadas genómicas (human hg38)	Genes (OMIM)	Genes recesivos conocidos/ (candidato)
Caso 1	2q24.1	3.31	155,610,490-158,929,240	KCNJ3, NR4A2, GPD2, GALNT5, ERMN, CYTIP, ACVR1C, ACVR1, UPP2, CCDC148- AS1, CCDC148, PKP4, DAPL1	(-)
	6p12.3	3.34	47,455,565-50,796,222	CD2AP, ADGRF4, OPN5, PTCHD4, MMUT, CENPQ, GLYATL3, RHAG, CRISP2, CRISP3, PGK2, CRISP1, DEFB114, TFAP2D, TFAP2B.	MMUT/ (-)
	7q31.2	3.04	117,337,326-120,384,912	CFTR, CTTNBP2, LSM8, ANKRD7, KCND2	CFTR/ (-)
	8p12	3.55	33,556,975-37,113,837	UNC5D, KCNU1	(-)
	16p11.2	3.51	32,471,633-35,986,173	TP53TG3,	(-)
	Xq11.1	5.06	62,713,033-67,779,923	ARHGEF9, AMER1, ASB12, MTMR8, ZC4H2, ZC3H12B, LAS1, MSN, MIR223, VSIG4, HEPH, EDA2R, AR, OPHN1, YIF6	ARHGEF9/ (-), ZC4H2/ (-), LAS1L/ (-), MSN/ (-), AR (-), OPHN/ (-).
	Xq21.1	4.06	78,810,691-82,879,142	TBX22, CHMP1B2P, FAM46D, BRWD3, HMGN5, SH3BGRL, POU3F4	BRWD3/ (-), POU3F4/ (-).
	Xp21.1	3.08	34,891,351-37,975,915	MAGEB16, PRRG1, XK, CYBB, DYNLT3.	CYBB/ (-)
Caso 2	Xq25q26.3	9.45	124585334-134039037	ACTRT1, SMARCA1, OCRL, APLN, XPNPEP2, SASH3, ZDHHC9, UTP14A, BCORL1, ELF4, AIFM1, RAB33A, SLC25A14, GPR119, RBMX2, ENOX2, ARHGAP36, IGSF1, FIRRE, STK26, FRMD7, RAP2C, MBNL3, HS6ST2, USP26, TFDP3, GPC4, GPC3, MIR19B2, MIR20B, MIR106A, PHF6, HPRT1, MIR503, MIR424, MOSPD1.	OCR/ (-), BCORL1/ (-), AIFM1 7 (-), IGSF1/ (-), HS6ST2/ (-), GPC4/ (-), GPC3/ (-), PHF6/ (+)* , HPRT1/(-).
Caso 3	11p11.2	5.67	45893171-51563636	PEX16, PHF21A, CREB3L1, DGKZ, MDK, CHRM4, AMBRA1, HARBI1, ATG13, ARHGAP1, ZNF408, F2, CKAP5, LRP4, ARFGAP2, PACSIN3, DDB2, ACP2, NR1H3, MADD, MYBPC3, SPI1, SLC39A13, PSMC3, RAPSN, CELF1, PTPMT1, KBTBD4, NDUFS3, FAM180B, C1QTNF4, MTCH2, AGBL2, FNBP4, NUP160, PTPRJ, FOLH1.	PEX16/ (-), CREB3L1/ (-), ZNF408/ (-), F2/ (-), LRP4/ (-), DDB2/ (-), ACP2/ (-), MADD/ (-), MYBPC3/ (-), SLC39A13/ (-), RAPSN/ (-), NDUFS3/ (-), NUP160/ (-),

(-)/(+): Genes recesivos compatibles con el fenotipo de los pacientes, **(*)**: **Gen candidato del síndrome Borjeson-Forssman-Lehmann compatible con fenotipo de nuestro caso 2.**

Descripción de los VNC detectadas en cada uno de los 5 casos.

Caso 1. Se encontraron 18 VNC (14 deleciones, 4 duplicaciones), 8 regiones de pérdidas de heterocigocidad (LOH). 10 de las VNC contienen genes OMIM, 5 VNC son consideradas de significado incierto (3 deleciones, 2 duplicaciones), 3 LOH probablemente no patogénicos

Caso 2. Se encontraron 15 VNC (11 deleciones, 3 duplicaciones), 1 perdida de heterocigocidad (LOH). 9 de las VNC contienen genes OMIM. 1 deleción es considerada patogénica y 1 LOH probable patogénico.

Caso 3. Se encontraron 12 VNC (7 deleciones, 5 duplicaciones), 1 perdida de heterocigocidad (LOH), 10 de las VNC contienen genes OMIM. 4 deleciones y 1 ganancia son consideradas de significado incierta y 1 LOH incierto.

Caso 4. Se encontraron 16 VNC (10 deleciones, 6 duplicaciones), 12 de las VNC contienen genes OMIM. 1 deleción y 2 duplicaciones son consideradas de significado incierto.

Caso 5. Se detectaron en total 11 VNC (8 deleciones, 3 duplicaciones), 9 de las VNC contienen genes OMIN. 1 deleción y 1 duplicación son consideradas de significado incierto.

Descripción global de las variaciones en número de copias

En nuestros 5 pacientes, se identificaron un total de 71 VNCs (50 deleciones; 21 ganancias). Las VNCs fueron encontrados en todos los pacientes (100 %) (Figura 9), con una media de 14.2 (rango de 11 a 18).

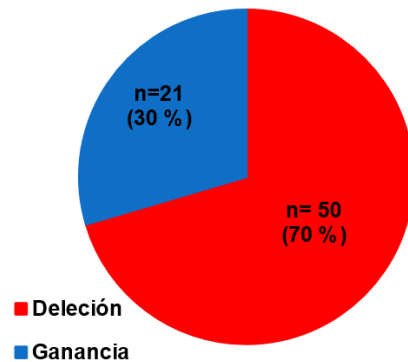


Figura 9

55 VNC (77 %) fueron polimórficas, 15 (21 %) fueron de significado incierto (9 son nuevas y 6 recurrentes) y una VNC es patológica (Figura 10).

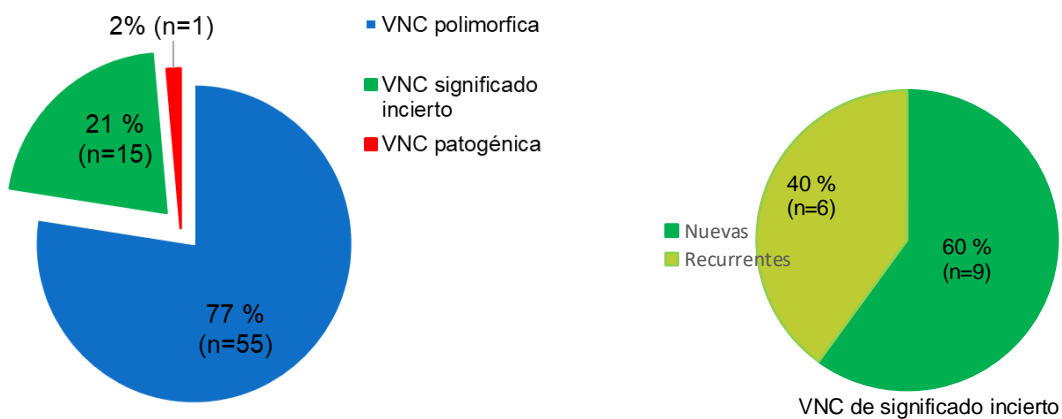


Figura 10

El tamaño promedio global de las VNC fue de 141 Kb (rango de 1 Kb a 167 Mb). Para los polimorfismos fue de 143 Kb (rango de 1 Kb -1.67 Mb), para las VNC de significado incierto fue de 140 Kb (rango 5.7 Kb – 461 Kb) (Figura 11).

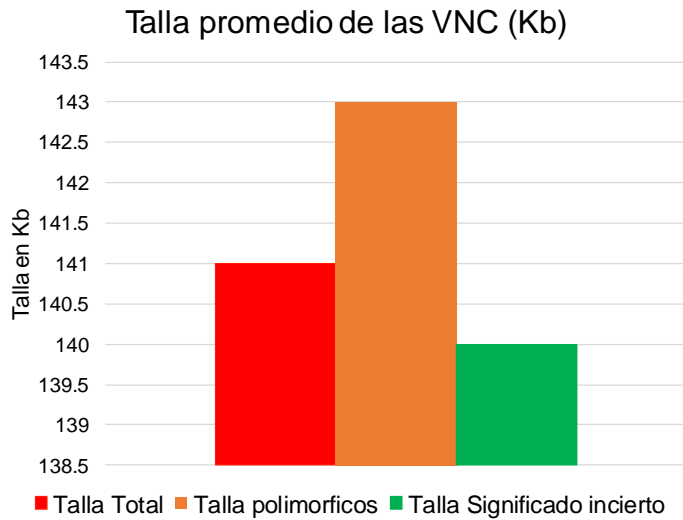


Figura 11

La distribución global de las VNCs de acuerdo al tamaño fue de 3 > 500 Kb y 68 < 500 kb. Para los polimórficos 3 fueron > 500 Kb, 17 de 100-500 Kb, 35 <100 Kb, mientras que, para los de significado incierto 6 fueron de 100-500 Kb y 9 < 100 Kb (Figura 12). 95 % de las VNC son <500 Kb y 63 % <100 Kb.

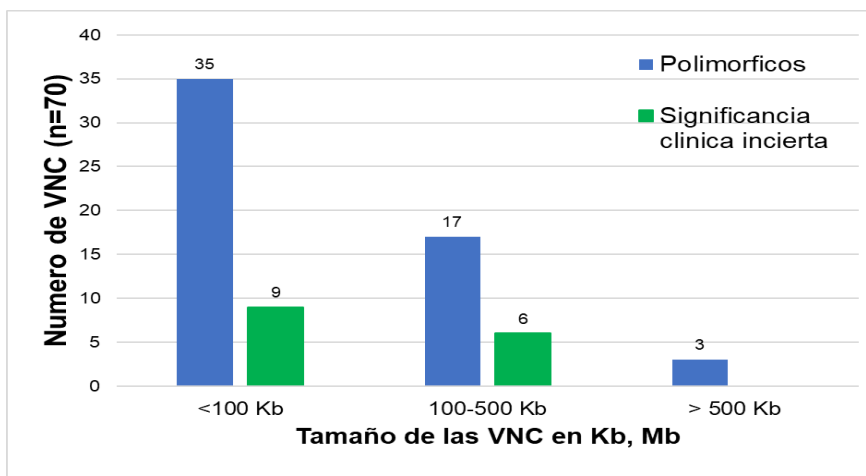


Figura12. Muestra la distribución de las VNC polimórficos (azul) y de significado incierto (verde) de acuerdo a su tamaño.

La VNC patogénica es una deleción recurrente de 31 Kb (caso 2) ubicada en 11p13, y está basado en su análisis en DGV, UCSC, CLIN VAR, DICEPHER, y en 25 casos reportados en la literatura (**Addis 2015, Balay 2016**). Se observaron otras 2 VNC recurrentes (casos 1 y 3) en DECIPHER, con hipertelorismo y macrocefalia, respectivamente (Tabla 5). Las VNC de significado incierto se distinguieron de los VNC patogénicas o polimórficos por no haber sido reportados previamente en la literatura de revisión por pares o por no haber sido reportados previamente en la base de datos DGV.

Deteccción de LOH

Se detectaron 10 LOH en 3 casos, el caso 1 mostró 8 segmentos sobre 8 cromosomas, comprendiendo 29 Mb de ADN total (1.0 %) con más de 80 genes, mientras, que caso 2 y 3 mostraron 1 LOH de 9.45 y 5.67 Mb, respectivamente. El tamaño promedio de las LOH fue de 3.62 Mb (rango de 3.08 Mb – 9.45 Mb) (Figura 13).

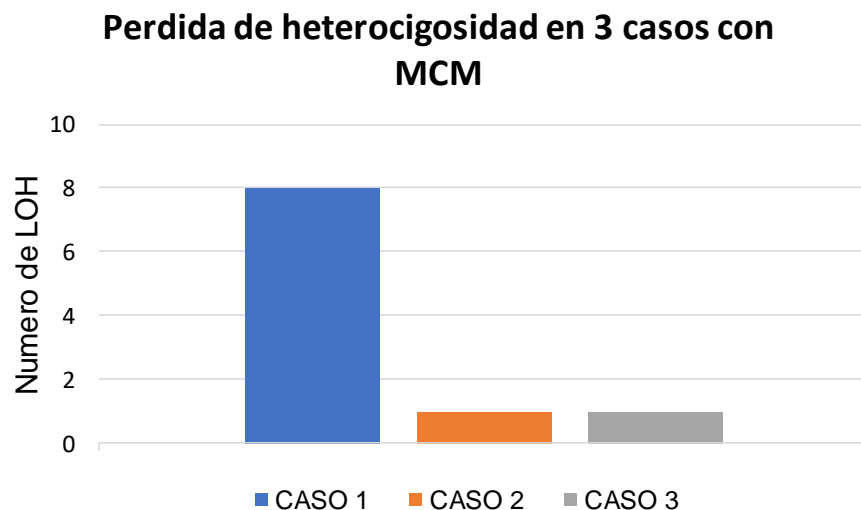


Figura 13

7. DISCUSIÓN

En este estudio 5 pacientes que presentaban características clínicas heterogéneas de un fenotipo de síndrome de malformaciones múltiples inespecífico con un cariotipo convencional normal, fueron analizados mediante cariotipo molecular con la matriz Human Cytoscan HD array, para investigar si estos pacientes podrían portar un VNC patológica. Los resultados mostraron un paciente (20% de los casos) con una VNC patógena, 15 VNC (21%) fueron de significancia clínica incierta (9 nuevas y 6 recurrentes) con un tamaño promedio de 140 Kb, mientras que 77 % fueron polimórficos con un tamaño promedio de 143 Kb. De las 15 VNC de significado incierto, 6 fueron de 100 a 500 Kb y 9 <100 Kb, no informados como patógenas ni como benigna. El tamaño medio de las VNC de significación incierta fue menor al promedio de las microdeleciones y microduplicaciones (8,74, 5,33 Mb, respectivamente) relacionadas con los síndromes de MC reconocibles **(14,23,24)**, sin embargo, esto no descarta que no pudieran estar relacionadas con el fenotipo de nuestros pacientes.

Estudios previos de cariotipo molecular con diferentes niveles de resolución, incluyeron aproximadamente 6000 casos con combinaciones de DI idiopático, DD, talla baja, deterioro del lenguaje, dismorfias y MC **(36-47)**. En cuatro estudios que involucra 262 casos detectaron 2386 VNC (media de 7,1 por caso), **(37,40,41,44)**, una frecuencia baja en comparación con nuestros resultados (media de 14,2 por caso). D´amours et al. 2014, **(37)** analizaron 21 casos con SNP array 6.0 y SNP array 2.7 y reportaron 36 (25,9%) y 1 (0,7%) VNC polimórfica, respectivamente, un porcentaje bajo en comparación con el 77% de nuestro estudio, también en este estudio, observaron 89 (64%) y 139 (92,7%) VNC de significado incierta, respectivamente, una frecuencia alta en comparación con nuestros resultados, mientras que en 5 estudios con un total de 5198 casos, detectaron 377 (7,2%) VNC de significado incierto **(38,41,43,46,47)** un número muy bajo en comparación con nuestro estudio (21%). Estos cambios parecen ser debido a la resolución del cariotipo molecular aplicado en estos estudios y al fenotipo variable de los casos. Por otro lado, estudios que incluyeron 5902 casos reportaron 356 (6%) VNC potencialmente patógenas o patógenas, un número muy bajo en comparación con

nuestro estudio (20%), el rango de tamaño de estas deleciones y duplicaciones fue de 40 Kb a 47,7 Mb **(37,39,41-47)**. Rango en el cual se encuentran nuestros casos de significado incierto.

La declaración del consenso de 2010 sobre pruebas de diagnóstico con cariotipo molecular recomendó una resolución amplia del genoma del array ≥ 400 kb, como equilibrio de sensibilidad clínica y analítica **(50)**. Sin embargo, en un estudio de 450 casos, de 11 VNC patógenas, 3 eran <500 Kb, ninguno <100 Kb, y de 12 potencialmente patógenos (7 <500 Kb, 3 <100 Kb) **(46)**. Mientras tanto, Hollenbeck et al. 2017 **(47)**, analizaron 4417 casos, detectando 435 VNC <500 Kb, 288 fueron de significado incierto y 147 fueron considerados patológicos o potencialmente patológicos. La VNC patogénica de nuestro caso 2, es una deleción recurrente de 31 Kb, considerada patógena en DGV / UCSC, CLIN VAR y se asemeja genómica y fenotípicamente a otros 2 casos reportados en DECIPHER con paladar hendido, retraso global del desarrollo (301500), retraso motor grueso y del lenguaje (370488) y con 25 casos traslapando una región con deleción del gen *ELP4* en 11p13 **(51,52)**. Los casos 1 y 3, se mencionan polimórficos en DGV, sin embargo, cada uno, mostraron una región similar en los casos DECIPHER con hipertelorismo y macrocefalia (Tabla 5), por lo que es probable que tengan un componente patógeno. La alta frecuencia de casos con MC sin diagnóstico destaca la importancia de estudiar todos los tipos de VNC para determinar si existe relación con el fenotipo de estos pacientes.

En agregado, el caso 1 mostró ocho segmentos de LOH >3 Mb (promedio=3.6 Mb, longitud total de 29,0 Mb) con un porcentaje de homocigosidad del 1,0% del genoma, mientras que nuestro caso 2 y 3 mostraron una única región de LOH de 9,4 y 5,6 Mb, respectivamente. Estudios previos de 3493 casos encontraron segmentos homocigotos cortos y largos, con un rango de extensión del 0,9 al 30,1% del genoma, en el 1,8 al 9,5% de los pacientes. 11 casos con regiones de homocigosidad que cubrían $>21.3\%$ de sus autosomas indicaron parentesco de primer grado **(53-55)**. Mientras que otro estudio de 209 individuos no emparentados detectó 1393 segmentos homocigotos >1 Mb de longitud (el más largo 17,9 Mb), lo que representa un promedio de 6,6 segmentos homocigotos por sujeto **(56)**. Los segmentos homocigotos múltiples y largos son significativamente más comunes en

regiones de baja recombinación y representan segmentos de autocigosidad o identidad por descendencia (EII), debido al apareamiento de individuos o padres estrechamente relacionados, mientras que, un solo segmento largo se debe más a una disomia uniparental **(57)**. Los segmentos cortos se deben a un desequilibrio de ligamiento o debido a antepasados en el pasado, sujeto a endogamia distante o reasociada por casualidad **(53,55,56)**. Por otro lado, el estudio de 906 casos con RD, DI y MC, en 24 (2,6%) casos detectaron 78 LOH con tamaños de 14 a 183 Mb **(36,37,44,46)**, mostrando un porcentaje muy bajo de casos homocigotos, comparado con nuestro estudio que fue del 60%, asumiendo una relación del contenido genético de estas regiones con el fenotipo de nuestros casos con MCM.

La presencia de ROH corto y largo tiene implicaciones para el mapeo de genes en poblaciones genéticamente aisladas, mapeo de autozigosidad y para trastornos complejos como las MCM de causa desconocida. Un gen con mutación recesiva dentro de estas regiones LOH podría ser clínicamente significativo y la probabilidad de un efecto deletéreo aumenta con la longitud del número de regiones presentes, así fueron detectadas 4 mutaciones homocigóticas dentro de las regiones ROH **(37,54)**. Curiosamente, nuestro caso 2 con el segmento LOH más largo de 9,4 Mb exhiben un fenotipo de discapacidad intelectual, labio y paladar hendido, microcefalia, bandas heterópicas y patrones corticales girales simplificados son similar a algunas mujeres con una duplicación intragénica de novo en el gen PFH6 asociado con el síndrome BFL **(58,59)**. La LOH desempeñan un papel mucho más importante en la morbilidad de lo que se sospechaba anteriormente, brindando la oportunidad para el estudio de mutaciones **(53)**.

En conclusión, este es el primer estudio en casos Mexicanos con MCM de origen indeterminado analizadas mediante oligo SNP array HD que describe el tamaño y frecuencia de VNC polimórficas, de significado incierto y patogénica, Además, este estudio corrobora que aún es posible detectar VNC nuevas, pequeñas, submicroscópicas y patógenas. Además, la detección de LOH en 3 casos podría estar más relacionada con la autocigosidad de ancestros comunes lejanos. También no se descarta e hipotetizamos que los genes desconocidos ubicados dentro de las VNC submicroscópicas de significado incierto o en combinación con las de LOH pueden tener alguna relación con el fenotipo de nuestros pacientes.

8. REFERENCIAS

1. Stevenson RE. Human malformations and related anomalies. New York, Oxford University press, 2006;1:3-13.
2. Moore KI. Embriología clínica. 4ª Ed. Interamericana. 1989.
3. Aviña Fierro JA, Tastekin A, Malformaciones congénitas: clasificación y bases morfogénicas. Rev Mex Pediatr; 2008; 75(2):71-74.
4. Malformaciones congénitas. <http://www.aepap.org/faqpad/faqpad-malfor.htm>.
5. Lippig KA, Werler MM, Caron CI, Cook CA, Holmes LB. Predictive value of minor abnormalities: association with major malformations. J Pediatr 1987;110: 530-7.
- 6 International Classification of Diseases, Tenth Revision, Clinical Modification (ICD-10-CM). <https://www.cdc.gov/nchs/icd/icd10cm.htm>.
7. EUROCAT. The European Surveillance of Congenital Anomalies classification. www.eurocat-network.eu.
8. Firth HV, Hurst JA. Approach to the consultation with a child with dysmorphism, congenital malformations, or developmental delay. Oxford University Press, 1997:55-61.
9. Jiménez E. Vitaminas y malformaciones congénitas. <http://www.diagnostico.com/Pediatrics/PrevenciónVitaminas.stm>.
10. Huffstadt AJC. Malformaciones congénitas. Serie Jonxis: Medicina para postgraduados, Vol. 4. Ed. Manual Moderno. 1981. N°4. México D.F.
11. Ortiz Almeralla MR, Flores Fragoso G, Cardiel M, et al. Frecuencia de malformaciones congénitas en el área de neonatología del Hospital General de México. Rev Mex Ped 2003;70(4)128-131
12. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs370/es/>
13. Lupski JR. Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. Trends Genet 1998; 14: 417.
14. Watson CT, Marques-Bonet T, Sharp AJ, Mefford HC. The genetics of microdeletion and microduplication syndromes: an update. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2014;15:215-244.

15. Jehee FS, Takamori JT, Medeiros PF, et al. Using a combination of MLPA kits to detect chromosomal imbalances in patients with multiple congenital anomalies and mental retardation is a valuable choice for developing countries. *Eur J Med Genet.* 2011 Jul-Aug;54(4):e425-32.
16. Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, et al. 2004. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat. Genet.* 36:949–51.
17. Itsara A, Cooper GM, Baker C, Girirajan S, Li J, et al. 2009. Population analysis of large copy number variants and hotspots of human genetic disease. *Am. J. Hum. Genet.* 84:148–61.
18. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, et al. 2006. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 444:444–54.
19. Butler MG, Meaney FJ, Palmer CG. 1986. Clinical and cytogenetic survey of 39 individuals with Prader Labhart-Willi syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 23:793–809.
20. Chen KS, Manian P, Koeuth T, Potocki L, Zhao Q, et al. 1997. Homologous recombination of a flanking repeat gene cluster is a mechanism for a common contiguous gene deletion syndrome. *Nat. Genet.* 17:154–63.
21. Pérez Jurado LA, Peoples R, Kaplan P, Hamel BC, Francke U, et al. 1996. Molecular definition of the chromosome 7 deletion in Williams syndrome and parent-of-origin effects on growth. *Am. J. Hum. Genet.* 59:781–92.
22. Edelmann L, Pandita RK, Spiteri E, Funke B, Goldberg R, et al. 1999. A common molecular basis for rearrangement disorders on chromosome 22q11. *Hum. Mol. Genet.* 8:1157–67.
23. Weise A, Mrasek K, Klein E, Mulatinho M, Llerena JC Jr, Hardekopf D, Pekova S, Bhatt S, Kosyakova N, Liehr T. Microdeletion and microduplication syndromes. *J Histochem Cytochem.* 2012 May;60(5):346-58.
24. Nevado J, Mergener R, Palomares-Bralo M, Souza KR, Vallespín E, Mena R, Martínez-Glez V, Mori MÁ, Santos F, García-Miñaur S, García-Santiago F, Mansilla E, Fernández L, de Torres ML, Riegel M, Lapunzina P. New microdeletion and microduplication syndromes: A comprehensive review. *Genet Mol Biol.* 2014 Mar;37(1 Suppl):210-9.
25. www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/?term=deletion+syndrome+with+multiple+congenital+malformations. 2017.

26. O'Keefe C, McDevitt MA, Maciejewski JP. Copy neutral loss of heterozygosity: a novel chromosomal lesion in myeloid malignancies. *Blood*. 2010 Apr 8;115(14):2731-9.
27. Tjio JH, Levan A. The chromosome number of man. *Hereditas* 1956;42:1-6.
28. Salamanca Gómez F. Aspectos citogenéticos de la herencia. En Guizar Vázquez JJ. *Genética Clínica, diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias. Manual moderno* 2010;3: 77-78.
29. De Ravel TJ, Devriendt K, Fryns JP, Vermeesch JR. What's new in karyotyping? The move towards array comparative genomic hybridization (CGH). *Eur J Pediatr* 2007;166:637-43.
30. Muñoz EN, Carlos Seáñez DM. Métodos diagnósticos y citogenéticos moleculares. En Guizar Vázquez JJ. *Genética Clínica, diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias. Manual moderno* 2010;3: 261-262.
31. A. Rauch, J. Hoyer, S. Guth, C. Zweier, C. Kraus, C. Becker, M. Zenker, U. Huffmeier, C. Thiel, F. Ruschendorf, P. Nurnberg, A. Reis, U. Trautmann, Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation, *Am. J. Med. Genet. Part A* 140 A (2006) 2063e2074.
32. R. Hochstenbach, E. van Binsbergen, J. Engelen, A. Nieuwint, A. Polstra, P. Poddighe, C. Ruivenkamp, B. Sikkema-Raddatz, D. Smeets, M. Poot, Array analysis and karyotyping: workflow consequences based on a retrospective study of 36,325 patients with idiopathic developmental delay in the Netherlands. *Eur. J. Med. Genet.* (2009 Apr 9).
33. Hermsen MA, Meijer GA, Baak JP, Joenje H, Walboomers JJ. Comparative genomic hybridization: a new tool in cancer pathology. *Hum Pathol* 1996;27:342-9.
34. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Döhner H, Cremer T, Lichter P. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer*. 1997 Dec;20(4):399-407.
35. Bejjani BA, Saleki R, Ballif BC, Rorem EA, Sundin K, Theisen A, Kashork CD, Shaffer LG. Use of targeted array-based CGH for the clinical diagnosis of chromosomal imbalance: is less more? *Am J Med Genet A*. 2005;134:259-67.

36. Gijbbers AC, Lew JY, Bosch CA, Schuurs-Hoeijmakers JH, van Haeringen A, den Hollander NS, Kant SG, Bijlsma EK, Breuning MH, Bakker E, Ruivenkamp CA. A new diagnostic workflow for patients with mental retardation and/or multiple congenital abnormalities: test arrays first. *Eur J Hum Genet.* 2009 Nov;17(11):1394-402.
37. D'Amours G, Langlois M, Mathonnet G, Fetni R, Nizard S, Srour M, Tihy F, Phillips MS, Michaud JL, Lemyre E. SNP arrays: comparing diagnostic yields for four platforms in children with developmental delay. *BMC Med Genomics.* 2014 Dec 24;7:70.
38. Friedman JM, Baross A, Delaney AD, Ally A, Arbour L, Armstrong L, Asano J, Bailey DK, Barber S, Birch P, Brown-John M, Cao M, Chan S, Charest DL, Farnoud N, Fernandes N, Flibotte S, Go A, Gibson WT, Holt RA, Jones SJ, Kennedy GC, Krzywinski M, Langlois S, Li HI, McGillivray BC, Nayar T, Pugh TJ, Rajcan-Separovic E, Schein JE, Schnerch A, Siddiqui A, Van Allen MI, Wilson G, Yong SL, Zahir F, Eydoux P, Marra MA. Oligonucleotide microarray analysis of genomic imbalance in children with mental retardation. *Am J Hum Genet.* 2006;79:500-13.
39. Ming JE, Geiger E, James AC, Ciprero KL, Nimmakayalu M, Zhang Y, Huang A, Vaddi M, Rappaport E, Zackai EH, Shaikh TH. Rapid detection of submicroscopic chromosomal rearrangements in children with multiple congenital anomalies using high density oligonucleotide arrays. *Hum Mutat.* 2006 May;27(5):467-73.
40. Hoyer J, Dreweke A, Becker C, Göhring I, Thiel CT, Peippo MM, Rauch R, Hofbeck M, Trautmann U, Zweier C, Zenker M, Hüffmeier U, Kraus C, Ekici AB, Rüschenhoff F, Nürnberg P, Reis A, Rauch A. Molecular karyotyping in patients with mental retardation using 100K single-nucleotide polymorphism arrays. *J Med Genet.* 2007;44:629-36.
41. Aradhya S, Manning MA, Splendore A, Cherry AM. Whole-genome array-CGH identifies novel contiguous gene deletions and duplications associated with developmental delay, mental retardation, and dysmorphic features. *Am J Med Genet A.* 2007 Jul 1;143A(13):1431-41.
42. Fan YS, Jayakar P, Zhu H, Barbouth D, Sacharow S, Morales A, Carver V, Benke P, Mundy P, Elsas LJ. Detection of pathogenic gene copy number variations

in patients with mental retardation by genomewide oligonucleotide array comparative genomic hybridization. *Hum Mutat.* 2007;28:1124-32.

43. Baldwin EL, Lee JY, Blake DM, Bunke BP, Alexander CR, Kogan AL, Ledbetter DH, Martin CL. Enhanced detection of clinically relevant genomic imbalances using a targeted plus whole genome oligonucleotide microarray. *Genet Med.* 2008 Jun;10(6):415-29.

44. Bruno DL, Ganesamoorthy D, Schoumans J, Bankier A, Coman D, Delatycki M, Gardner RJ, Hunter M, James PA, Kannu P, McGillivray G, Pachter N, Peters H, Rieubland C, Savarirayan R, Scheffer IE, Sheffield L, Tan T, White SM, Yeung A, Bowman Z, Ngo C, Choy KW, Cacheux V, Wong L, Amor DJ, Slater HR. Detection of cryptic pathogenic copy number variations and constitutional loss of heterozygosity using high resolution SNP microarray analysis in 117 patients referred for cytogenetic analysis and impact on clinical practice. *J Med Genet.* 2009 Feb;46(2):123-31.

45. Szczałuba K, Nowakowska B, Sobecka K, Smyk M, Castaneda J, Kłapecki J, Kutkowska-Kaźmierczak A, Śmigiel R, Bocian E, Radkowski M, Demkow U. Application of Array Comparative Genomic Hybridization in Newborns with Multiple Congenital Anomalies. *Adv Exp Med Biol.* 2016;912:1-9.

46. Uehara DT, Hayashi S, Okamoto N, et al. SNP array screening of cryptic genomic imbalances in 450 Japanese subjects with intellectual disability and multiple congenital anomalies previously negative for large rearrangements. *J Hum Genet.* 2016;61(4):335-343.

47. Hollenbeck D, Williams CL, Drazba K, et al. Clinical Relevance of Small Copy-Number Variants in Chromosomal Microarray Clinical Testing. *Genet Med.* 2017;19(4):377-385.

48. Conrad DF, Pinto D, Redon R, Feuk L, Gokcumen O, Zhang Y, Aerts J, Andrews TD, Barnes C, Campbell P, Fitzgerald T, Hu M, Ihm CH, Kristiansson K, Macarthur DG, Macdonald JR, Onyiah I, Pang AW, Robson S, Stirrups K, Valsesia A, Walter K, Wei J; Wellcome Trust Case Control Consortium, Tyler-Smith C, Carter NP, Lee C, Scherer SW, Hurles ME. Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature.* 2010 Apr 1;464(7289):704-12.

49. Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, Quintero-Rivera F, South ST; A Working Group of the American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance

Committee. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med*. 2011 Jul;13(7):680-5.

50. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet*. 2010 May 14;86(5):749-64.

51. Addis L, Ahn JW, Dobson R, et al. Microdeletions of ELP4 Are Associated with Language Impairment, Autism Spectrum Disorder, and Mental Retardation. *Hum Mutat*. 2015;36(9):842-850.

52. Balay L, Totten E, Okada L, et al. A familial pericentric inversion of chromosome 11 associated with a microdeletion of 163 kb and microduplication of 288 kb at 11p13 and 11q22.3 without aniridia or eye anomalies. *Am J Med Genet A*. 2016;170A(1):202-209.

53. Broman KW, Weber JL. Long homozygous chromosomal segments in reference families from the centre d'Etude du polymorphisme humain. *Am J Hum Genet*. 1999;65(6):1493–1500

54. Sund Sund KL, Zimmerman SL, Thomas C, et al. Regions of homozygosity identified by SNP microarray analysis aid in the diagnosis of autosomal recessive disease and incidentally detect parental blood relationships. *Genet Med*. 2013;15(1):70-78.

55. Simon-Sanchez J, Scholz S, Fung HC, et al. Genome-wide SNP assay reveals structural genomic variation, extended homozygosity and cell-line induced alterations in normal individuals. *Hum Mol Genet*. 2007;16(1):1–14.

56. Gibson J, Morton NE, Collins A. Extended tracts of homozygosity in outbred human populations. *Hum Mol Genet*. 2006;15(5):789–795.

57. Wang JC, Ross L, Mahon LW, et al. Regions of homozygosity identified by oligonucleotide SNP arrays: evaluating the incidence and clinical utility. *Eur J Hum Genet*. 2015;23(5):663-671.

58. Gécz J, Turner G, Nelson J, Partington M. The Börjeson-Forssman-Lehman syndrome (BFLS, MIM #301900). *Eur J Hum Genet*. 2006;14(12):1233-1237.

59. Kasper BS, Dörfler A, Di Donato N, Kasper EM, Wieczorek D, Hoyer J, Zweier C. Central nervous system anomalies in two females with Borjeson-Forssman-Lehmann syndrome. *Epilepsy Behav.* 2017;69:104-109.

ANEXO 1

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Proyecto de investigación

“Detección de desbalances cromosómicos en pacientes con malformaciones congénitas múltiples mediante cariotipo molecular”

Estimado: madre, padre y/o tutor:

Por medio de esta carta, lo invitamos a participar en el estudio mencionado arriba, Usted debe saber que participar en esta investigación es totalmente voluntario, de manera que usted puede decidir no participar en el estudio y en este caso no perdería ninguna prestación a la que tiene derecho.

Debido a que la información que se recabe es absolutamente confidencial y con fines de investigación, usted debe saber que no daremos a conocer ninguna información acerca de su hija(o), sin su consentimiento.

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La presente investigación busca determinar el probable origen de la enfermedad que tiene su hijo (a). Esta información contribuirá a comprender la causa de las alteraciones físicas de su hijo desde el nacimiento. En algunos casos, esta información permitirá brindar una explicación más amplia del origen de las alteraciones en su hijo (a).

Su hijo(a) posiblemente tiene una enfermedad de origen genético, que será analizado a partir de la muestra sanguínea.

PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO

Para este estudio requerimos una muestra de sangre de 3-5 ml. mediante el siguiente procedimiento:

- Bajo condiciones higiénicas óptimas se coloca el brazo extendido y se selecciona la vena, preferentemente en el antebrazo.
- Para toma de muestra sanguínea se tomarán de 3-5 ml de sangre, aproximadamente.
- La muestra sanguínea será almacenada a -20°C hasta el momento de extraer el material genético.

RIESGOS Y MOLESTIAS

Los posibles riesgos de la toma de muestra sanguínea son: dolores leves en el sitio donde se toma la muestra, formación de moretones, hemorragia o poder originar una infección raramente.

BENEFICIOS

Este estudio el único beneficio es recibir una asesoría genética más completa, y contribuya con el conocimiento científico.

COSTOS

Las pruebas realizadas en la muestra sanguínea, así como cualquier consulta que usted tenga con el médico en relación al estudio de investigación, no tendrán ningún costo y los gastos generados por esta investigación serán absorbidos por el proyecto de investigación.

DUDAS Y ACLARACIONES

Usted tiene la garantía de recibir respuesta a sus preguntas y aclaración a cualquier duda acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación y el tratamiento del paciente. Si este fuera el caso, deberá comunicarse con los médicos responsables de la investigación: Dr. Jaime Toral López al tel, 58369910, ext 2474 del departamento de Genética del Centro Medico Ecatepec o al Dr. Sergio Alberto Cuevas Covarrubias del Departamento de Genética 2789200 ext. 1278 y 1279 y/o a la Dirección de Investigación del CME, ext. 2474.

Usted tiene la libertad de retirar este consentimiento en cualquier momento, y de dejar de participar en este estudio sin que esto afecte los cuidados y el tratamiento que la Institución otorga.

La identidad del sujeto de estudio será confidencial, y la información relacionada será manejada de acuerdo con las políticas de privacidad vigentes. Los resultados obtenidos en el estudio podrán ser utilizados con fines educativos en congresos o publicados en revistas de investigación médica.

Le sugerimos que conserve una copia de este documento para consultarla si es necesario.

ATENTAMENTE

Nombre del tutor _____

Firma _____

Médico responsable/ investigador _____

Firma _____

Testigo 1 _____

Firma _____

Testigo 2 _____

Firma _____

Ecatepec de Morelos a _____ de _____ de _____

ANEXO 2

CARTA DE ASENTIMIENTO INFORMADO

Proyecto de investigación

“Detección de desbalances cromosómicos en pacientes con malformaciones congénitas múltiples mediante cariotipo molecular

Yo _____ otorgo mi asentimiento para que me sean practicados los estudios citogenéticos y/o molecular considerados en el proyecto de investigación. Se me ha explicado de las enfermedades relacionadas con alteraciones genéticas, que por medio del estudio de nuestros cromosomas y/o el ADN se pueden conocer las alteraciones que dieron origen al padecimiento, además, estos estudios pueden reconocer personas en mi familia con riesgo de heredar la enfermedad a sus hijos. Se me ha explicado con detenimiento que nuestra participación consiste en que nos sean extraídos con jeringa 3-5 ml de sangre venosa, procedimiento que no ocasionara molestias mayores; solo pudiera presentarse la formación de un pequeño sangrado o moretón en el área puncionada. Además, se me ha asegurado que en este estudio y relacionada con mi patrimonio genético no será usada para otros fines que no sea los establecidos en el proyecto de investigación mencionado y si por alguna razón decidiera retirarme del estudio, no cambiaría la calidad de mi atención. Las pruebas realizadas y cualquier consulta que tengas con el médico en relación al estudio de investigación no tendrán ningún costo. Tendré la garantía de recibir respuesta a las preguntas y aclaración a cualquier duda acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación y el tratamiento. Si este fuera el caso, deberé comunicarme con los médicos responsables de la investigación: Dr. Jaime Toral López al tel, 58369910, ext 2474 del departamento de Genética del Centro Medico Ecatepec o al Dr. Sergio Alberto Cuevas Covarrubias del Departamento de Genética 2789200 ext. 1278 y 1279 y/o a la Dirección de Investigación del CME, ext. 2474.

Usted tiene la libertad de retirar este consentimiento en cualquier momento, y de dejar de participar en este estudio sin que esto afecte los cuidados y el tratamiento que la Institución otorga.

La identidad del sujeto de estudio será confidencial, y la información relacionada será manejada de acuerdo con las políticas de privacidad vigentes. Los resultados obtenidos en el estudio podrán ser utilizados con fines educativos en congresos o publicados en revistas de investigación médica.

Le sugerimos que conserve una copia de este documento para consultarla si es necesario.

ATENTAMENTE

Nombre del paciente _____

Firma _____

Médico responsable/ investigador _____

Firma _____

Testigo 1 _____

Firma _____

Testigo 2 _____

Firma _____

Ecatepec de Morelos a _____ de _____ de _____

Artículo publicado

Toral López J, González Huerta LM, Messina-Baas O, Cuevas-Covarrubias SA.
Submicroscopic 11p13 deletion including the elongator acetyltransferase complex subunit 4 gene in a girl with language failure, intellectual disability and congenital malformations: A case report. *World Journal of Clinical Cases.* 2020;8(21):5296-5306. DOI: 10.12998/wjcc.v8.i21.5296

Submicroscopic 11p13 deletion including the elongator acetyltransferase complex subunit 4 gene in a girl with language failure, intellectual disability and congenital malformations: A case report

Jaime Toral-Lopez, Luz María González Huerta, Olga Messina-Baas, Sergio A Cuevas-Covarrubias

ORCID number: Jaime Toral-Lopez 0000-0003-0324-7351; Luz María González Huerta 0000-0002-8065-0382; Olga Messina-Baas 0000-0002-4957-2849; Sergio A Cuevas-Covarrubias 0000-0002-5962-4913.

Author contributions: Toral-Lopez J was the patient's geneticist doctor, reviewed the literature, designed the study and contributed to manuscript drafting; Gonzalez-Huerta LM, analyzed and interpreted the molecular karyotyping and contributed to manuscript drafting; Messina Baas O performed the ophthalmologist analyses and contributed to manuscript drafting and Cuevas Covarrubias SA was responsible for the revision of the manuscript for final edition; all authors read and approved the final manuscript.

Supported by PAEP, 2018 and PAPIIT IN219419, DGAPA, Universidad Nacional Autónoma de México, No. IN219419.

Informed consent statement: Informed written consent was obtained from the patient for publication of this report and any accompanying images.

Conflict-of-interest statement: The

Jaime Toral-Lopez, Departamento de Genética Medica, Centro Medico Ecatepec, ISSEMYM, Ecatepec 55000, México

Jaime Toral-Lopez, Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud/Hospital Infantil de México, Universidad Nacional Autónoma de México, México 06720, México

Luz María González Huerta, Departamento de Biología Molecular, Hospital General de México, Cuauhtémoc 06720, México

Olga Messina-Baas, Departamento de Oftalmología, Hospital General de México, Cuauhtémoc 06720, México

Sergio A Cuevas-Covarrubias, Genetica, Hospital General de México, Cuauhtémoc 06726, Mexico

Sergio A Cuevas-Covarrubias, Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud, Universidad Nacional Autónoma de México, México 06720, Mexico

Corresponding author: Sergio A Cuevas-Covarrubias, PhD, Doctor, Professor, Genetica, Hospital General de México, Dr Balmis 148, Cuauhtémoc 06720, México.
sercuevas@yahoo.com

Abstract

BACKGROUND

We described the main features of an infant diagnosed with facial dysmorphic, language failure, intellectual disability and congenital malformations to strengthen our understanding of the disease. Currently, treatment is only rehabilitation and surgery for cleft lip and palate.

CASE SUMMARY

The proband was a 2-years-8-months-old girl. Familial history was negative for congenital malformations or intellectual disability. The patient had microcephaly, upward-slanting palpebral fissures, depressed nasal bridge, bulbous nose and

authors declare that they have no conflict of interest.

CARE Checklist (2016) statement:

The authors have read the CARE Checklist (2016), and the manuscript was prepared and revised according to the CARE Checklist (2016).

Open-Access: This article is an open-access article that was selected by an in-house editor and fully peer-reviewed by external reviewers. It is distributed in accordance with the Creative Commons Attribution NonCommercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Manuscript source: Unsolicited manuscript

Specialty type: Medicine, research and experimental

Country/Territory of origin: Mexico

Peer-review report's scientific quality classification

Grade A (Excellent): 0
Grade B (Very good): B
Grade C (Good): C
Grade D (Fair): 0
Grade E (Poor): 0

Received: July 13, 2020

Peer-review started: July 13, 2020

First decision: August 8, 2020

Revised: September 8, 2020

Accepted: September 18, 2020

Article in press: September 18, 2020

Published online: November 6, 2020

P-Reviewer: Vieira A, Wattanasirichaigoon D

S-Editor: Zhang L

L-Editor: A

P-Editor: Wang LL



bilateral cleft lip and palate. Brain magnetic resonance imaging showed cortical atrophy and band heterotopia. Her motor and intellectual development is delayed. A submicroscopic deletion in 11p13 involving the elongator acetyltransferase complex subunit 4 gene (*ELP4*) and a loss of heterozygosity in Xq25-q26.3 were detected.

CONCLUSION

There is no treatment for the *ELP4* deletion caused by a submicroscopic 11p13 deletion. We describe a second case of deletion of the *ELP4* gene without aniridia, which confirms the association between *ELP4* gene with several defects and absence of this ocular defect. Additional clinical data in the deletion of the *ELP4* gene as cleft palate, facial dysmorphism, and changes at level brain could be associated to this gene or be part of the effect of the recessives genes involved in the loss of heterozygosity region of Xq25-26.3.

Key Words: Submicroscopic 11p13 deletion; Elongator acetyltransferase complex subunit 4 gene; Language failure; Intellectual disability; Congenital malformations; Case report

©The Author(s) 2020. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Core Tip: We report a case diagnosed with submicroscopic 11p13 deletion. The main clinical characteristics and elongator acetyltransferase complex subunit 4 gene deletion, and treatments were assessed and a review of the related literature was performed. Very important, this is the second case of deletion of the elongator acetyltransferase complex subunit 4 gene without aniridia.

Citation: Toral-Lopez J, González Huerta LM, Messina-Baas O, Cuevas-Covarrubias SA. Submicroscopic 11p13 deletion including the elongator acetyltransferase complex subunit 4 gene in a girl with language failure, intellectual disability and congenital malformations: A case report. *World J Clin Cases* 2020; 8(21): 5296-5303

URL: <https://www.wjgnet.com/2307-8960/full/v8/i21/5296.htm>

DOI: <https://dx.doi.org/10.12998/wjcc.v8.i21.5296>

INTRODUCTION

The elongator acetyltransferase complex subunit 4 gene (*ELP4*; MIM #606985) encodes the protein 4 of the elongator complex of ribonucleic acid polymerase II. *ELP4* protein is composed of 424 amino acids and plays a role in transcriptional elongation, transfer ribonucleic acid modification, polarized exocytosis, and multiple types of cell migration. The failure of any member of the family of elongators, including *ELP4*, can be associated with different neurological disorders^[1,2]. Twenty-five submicroscopic deletions, including the *ELP4* gene and the adjacent sequences (excluding the *PAX6* gene, the neighboring gene related to aniridia), have been associated with intellectual disability, language development failure, autism spectrum disorder, and epilepsy with aniridia^[3-9] or without aniridia^[10]. The *ELP4* gene is 273.9 kb in size and encompasses 12 exons. Interestingly, inside the ultraconserved large intronic region between exons 9 to 12 of the *ELP4* gene, there is a long-range cis-regulatory enhancer element located 25 to 150 kb downstream of the *PAX6* gene, which controls its expression^[11,12]. In the present study, we described a girl with dysmorphia, language failure, intellectual disability, and congenital malformations without aniridia, and with a submicroscopic deletion in 11p13 affecting the *ELP4* gene.

CASE PRESENTATION

Chief complaints

Registering a cleft lip and palate at 26 wk of gestation and delayed motor development at 2 years of age.

History of present illness

The patient, a 2-year-and-8-month-old Mexican girl, was brought by her parents for evaluation because of delays in her motor and language development and congenital malformations. Currently, her motor development is abnormal without head control, she still does not sit down. She also does not speak any words and often becomes ill from the respiratory tract without any serious complications.

History of past illness

The proband was the third child of two healthy, unrelated, and young parents (27 and 26 years old at the time of delivery). Their familial history was negative for congenital malformations or intellectual disability. The mother had prenatal care, registering a cleft lip and palate at 26 wk of gestation. The proband was born by cesarean section at 38 wk of gestation with a weight of 3035 g (25th percentile), a length of 50 cm (25th-50th percentile), an OFC of 33 cm (10th percentile), and Apgar scores of 8¹ and 9⁵. She did not require neonatal management.

Personal and family history

Their familial history was negative for congenital malformations or intellectual disability.

Physical examination

Upon physical examination, her weight was 9.2 kg (< 3rd percentile), her length was 87 cm (3rd-10th percentile), and her OFC was 46 cm (< 3rd percentile). She had microcephaly, upward-slanting palpebral fissures, a depressed nasal bridge, a bulbous nose, and a bilateral cleft lip and palate (Figure 1A).

Laboratory examinations

Blood, urine, and thyroid profile analyses were normal. The karyotype was 46, XX.

Imaging examinations

The abdominal ultrasound was normal. The brain magnetic resonance imaging showed cortical atrophy, pachygyria, microgyria and band heterotopia (Figure 1B).

MULTIDISCIPLINARY EXPERT CONSULTATION

The auditory study detected neurosensory hearing loss. The ophthalmic and cardiological assessments were normal.

Deoxyribonucleic acid analysis Cytoscan High Definition Array

Genomic deoxyribonucleic acid from the proband and her parents was isolated from peripheral blood samples using the Gentra Pure Gene Blood Kit and Qiagen extraction kits. The oligonucleotide-single nucleotide polymorphism (SNP) array analysis with the GeneChip Human Cytoscan high definition was carried out for the patient and her parents following the provided protocol (Affymetrix, Santa Clara, Calif., United States) and using the Affymetrix GeneChip Scanner 3000 7G. The data were analyzed using GTYPE (GeneChip Genotyping Analysis Software, version 1.0.12) to detect copy number aberrations. The resolution of this procedure was estimated at 1.15 kb with 2.67 million probes. Copy number variation (CNV) breakpoints were determined by inspecting the log² intensity ratios of SNPs within and flanking the detected regions of gain or loss.

Clinical interpretation

The interpretation of the clinical significance of all the observed CNVs was compared with the database of genomic variants (<https://projects.tcag.ca/variation/>), the University of California Santa Cruz genome browser (<http://genome.ucsc.edu/>), Ensembl Resources, Online Mendelian Inheritance of human (OMIM), ClinGen, and ClinVar. The gene content of the CNVs of interest was determined with the University of California Santa Cruz University of California Santa Cruz browser based on the reference of the human genome national center of biotechnology information build 38 (hg38). For putative candidate regions containing at least one gene, the assessment included searches for similar cases in DECIPHER (<https://decipher.sanger.ac.uk/>) and a review in PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). The CNV pathogenicity was assessed using the described guidelines^[13,14]. The interpretation

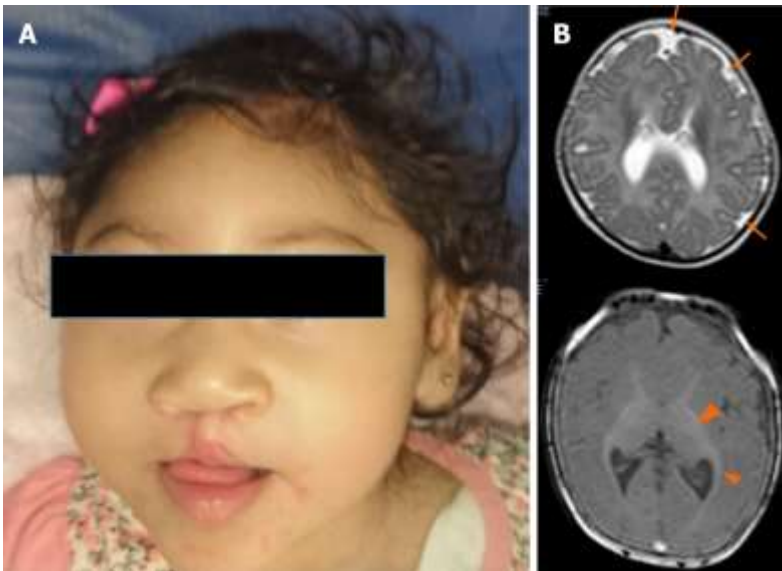


Figure 1 Patient at 1-year-old. A: Microcephaly, upward-slanting palpebral fissures, depressed nasal bridge, bulbous nose, bilateral cleft lip, and palate are showed; B: The brain magnetic resonance scan (at five months) shows cortical atrophy, simplified gyral cortical patterns (orange arrow) and band heterotopia (arrow ahead).

depended on whether a given CNV overlapped with a known genomic disorder or was present in a patient with a similar phenotype or who was reported on the database of genomic variants database.

FINAL DIAGNOSIS

Submicroscopic 11p13 deletion involving the *ELP4* gene with loss of heterozygosity in Xq25-26.3.

TREATMENT

There is no specific treatment for the deletion of the *ELP4* gene, the patient was managed with rehabilitation and surgery for cleft lip and palate.

OUTCOME AND FOLLOW-UP

No improvement or progress was observed as a result of the rehabilitation.

DISCUSSION

In many patients, the clinical presentation is not fully consistent with the syndrome under consideration and laboratory confirmation rates are low. In this study, we describe the use of molecular karyotype by SNP high definition arrays to investigate the presence of pathogenic CNV in a patient with several findings consistent with a syndrome of unknown etiology. A submicroscopic deletion of 31 kb was found to be present. This CNV was located in a region with recurrent submicroscopic deletions involving the *ELP4* gene and subjacent regions (Figure 2). The *ELP4* gene has been associated with intellectual disability, language development failure, autism spectrum disorder, epilepsy, and aniridia^[3-9]. Our patient presented intellectual disability and language development failure but not autism spectrum disorder, epilepsy, or aniridia. These clinical data resemble those reported in a previous case with *ELP4* gene deletion without aniridia. In this previous case, the family had a submicroscopic deletion of 163 kb in the *ELP4* gene due to a pericentric inversion of chromosome 11p13. The patient presented intellectual disability, speech abnormalities, and autistic behaviors^[10]. In

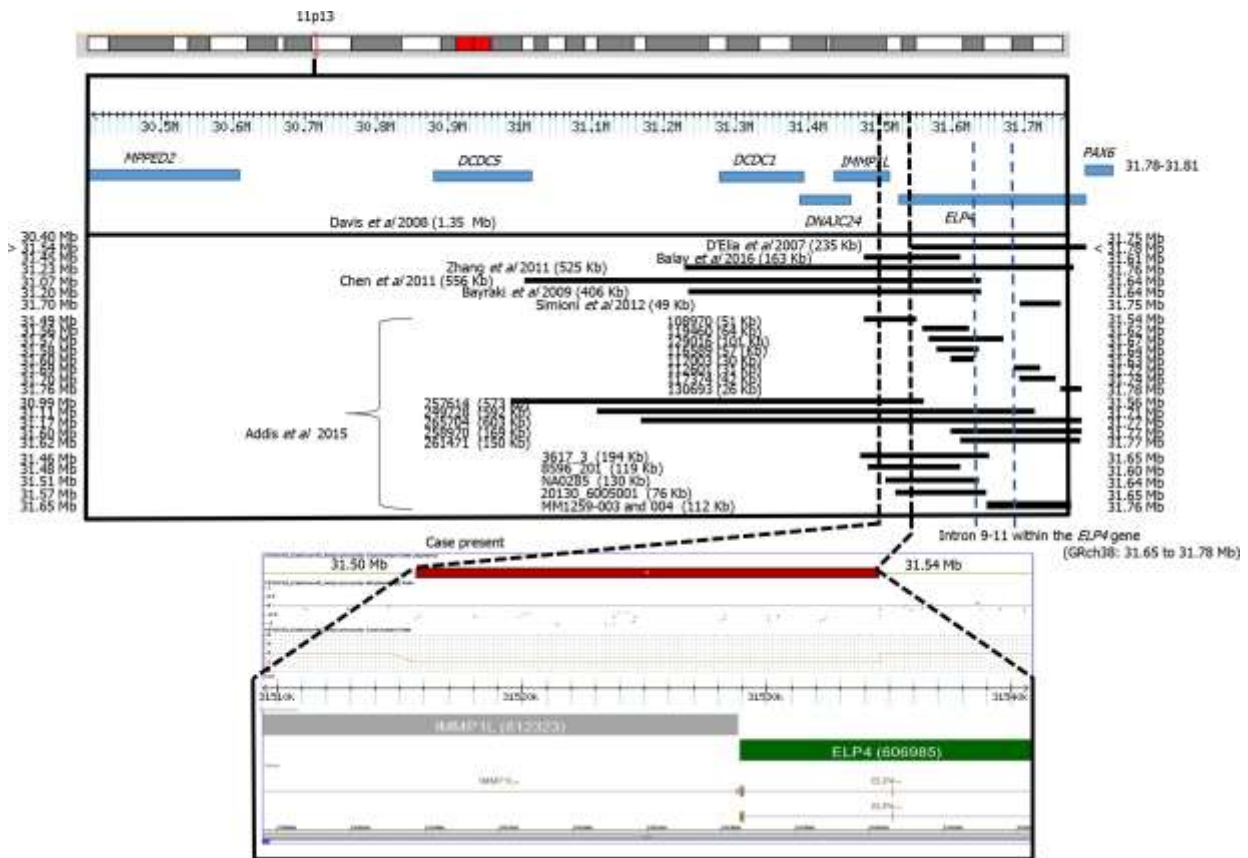


Figure 2 CytoScan high definition array and schematic representation of the result. The figure shows chromosome 11p13 and the relative positions of the *MPPED2*, *DCDC5*, *DCDC2*, *DNAJC24*, *IMMP1L*, *ELP4*, and *PAX6* genes within the deleted interval. A partial molecular karyotype of the submicroscopic on chromosome 11 detected with the CytoScan high definition array is also illustrated. A single copy of the 40 Kb region was identified on \log_2 ratio analysis. Some affected patients with deletions in the 11p13 region are also shown.

another report, two families with bilateral aniridia, cataracts, and glaucoma had a deletion of 235 kb in the *ELP4* gene^[3]. Davis *et al*^[4] also reported the case of a patient with aniridia, autism, and intellectual disability due to a 1354 kb deletion involving the *ELP4* gene, whereas Bayrakli *et al*^[5], studied a family with isolated aniridia that showed a deletion of 406 kb involving the *ELP4* gene. A study in various members of a family with aniridia showed a 566 kb deletion involving the *ELP4* gene^[6], and Zhang *et al*^[7] described a family with bilateral aniridia and congenital cataracts but without intellectual disability or other abnormalities due to a 525 kb deletion involving the *ELP4* gene. Simioni *et al*^[8] reported on a child with developmental delay, bilateral strabismus, aniridia, and nystagmus. The proband showed a deletion of 49 kb in the *ELP4* gene. Finally, Addis *et al*^[9] made a comparison between 7235 cases and 11252 controls. The cases had language impairment, developmental delay, autism, and epilepsy. Thirteen cases presented submicroscopic deletions in 11p13. These researchers^[9] reviewed DECIPHER and found 5 other cases with deletion, all overlapping with the *ELP4* gene and suggesting a strong association between these deletions and neurodevelopmental disorders. All of these previous cases had deletions with a minimum distance of 10 kb and a maximum of 240 kb from the most proximal breakpoint to the 3' end of the *PAX6* gene, with an average of 103 kb (Figure 2).

Aniridia 2 is caused by mutations affecting a long-range cis-regulatory enhancer element of *PAX6* expression inside of an ultra-conserved large intronic region between exons 9 to 12 of the *ELP4* gene, located 25 to 150 kb downstream of the *PAX6* gene^[11]. These variants inside the *ELP4* gene do not alter its normal expression and function^[12]. The deletion in our patient did not include this region. Probably for this reason, the patient did not present aniridia, similar to the case of Balay *et al*^[10]. Interestingly, the phenotypes of microcephaly, facial dysmorphism, cleft lip/ palate, neuromigration defect, and intellectual disability of our patient has been observed in the Baraitser-Winter cerebrofrontofacial syndrome 1 and 2 [OMIM 243310; BRWS1, 614583; BRWS2]^[15], but the *ACTB* and *ACTG1* genes of Baraitser-Winter cerebrofrontofacial syndrome 1 and Baraitser-Winter cerebrofrontofacial syndrome 2 were not involved in

the deletion or duplication regions or loss of heterozygosity (LOH) of our patient. In a study of 117 cases with mental delay and/or congenital malformations, 434 CNVs (195 Losses and 239 gains), including 18 pathogenic and 9 potentially pathogenic, were found to be present. Interestingly, two patients with thrombocytopenia-absent-radius syndrome were not suspected by the clinicians, possibly because of the presence of atypical features. Two patients showed a pathogenic CNV with a syndrome that was neither manifesting nor suspected, demonstrating the difficulty in making accurate clinical diagnoses in some patients with classic microdeletion and microduplication syndromes and exemplifying an unexpected discovery of non-penetrant or presymptomatic conditions. In the aforementioned study, segmental regions of loss of heterozygosity larger than 5 Mb were found in 5 patients. An analysis of microsatellite markers within the segments of LOH was carried out in some cases, confirming homozygosity of biparental origin for these regions^[16].

In our patient, the SNP microarray analysis also detected a segment of LOH of 9.4 Mb, which included 39 OMIM genes, four of them have been associated with intellectual disability, *OCRL*, *AIFM1*, *PHF6* and *HPRT1* genes (HP: 0001249 in OMIM) (Figure 3). The Borjeson-Forssman-Lehman syndrome syndrome has been associated with cleft lip/palate, microcephaly, band heteropia and simplified gyral cortical patterns as the case of some female due to a de novo intragenic duplication of *PFH6*^[17,18], characteristics found in our patient.

Any pathogenic recessive mutation within these regions could theoretically be clinically significant, and the likelihood of this occurring would increase with the number of regions present. However, as normal genome variations, it is unlikely that most of these regions are clinically significant. A previous study with 8 families identified long segments (from 2.2% to 4.4% of the autosomal genome) and short homozygosity using short tandem repeat markers, indicating that the parents were relatively related^[19]. Another study with 209 unrelated individuals from a HapMap population detected 1393 segments over 1 Mb in length (the longest length was a region of 17.9 Mb). In the aforementioned study, the subjects had an average of 6.6 homozygous segments with larger long tracts in regions of linkage disequilibrium and low recombination. This suggests that multiple ancestral megabase haplotypes persist in non-inbred human populations in broad genomic regions with below-average recombination rates^[20]. Finally, an analysis of 276 neurologically normal elderly subjects among North American Caucasians using the SNP of the entire genome revealed contiguous tracts of > 5 Mb in 9.5% (26/272) of these individuals, indicating that the long homozygous segments represent segments of autozygosity due to the mating of closely related individuals, while short segments were due to linkage disequilibrium or past ancestors who were subject to distant inbreeding^[21].

Microsatellite analysis in our patient's parents could confirm the homozygosity of the biparental origin for these regions. It is important to mention that in women the X inactivation mechanism compensates for these types of molecular changes, minimizing or nullifying the phenotypic effects. To interpret LOH, it is necessary to add a catalog of new pathogenic or potentially pathogenic loci in high-quality database. This could provide the opportunity to perform genotype-phenotype correlations in a suitable number of individuals with congenital malformations and/or intellectual disability.

CONCLUSION

In conclusion, we describe a second case of deletion of the *ELP4* gene, which confirms its association with the absence of aniridia and the presence of neurological manifestations. We also showed additional clinical data on cleft palate/Lip or facial dysmorphism and changes at the brain level, probably due to the affection of the genes involved in the LOH region. More case reports or large studies involving patients with the *ELP4* gene are necessary.

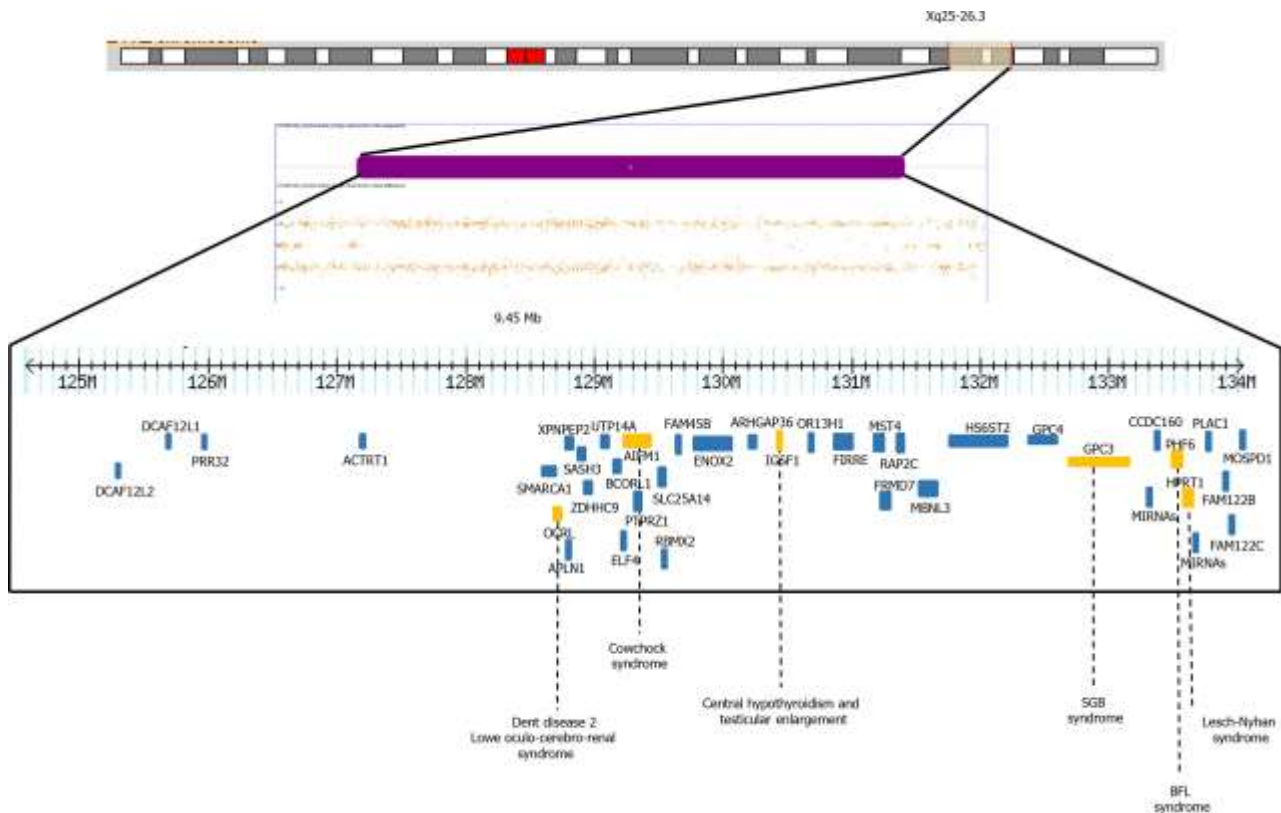


Figure 3 Depiction of allele peaks on chromosome Xq25-q26 shows homozygous (top and bottom bands) and heterozygous (middle band) allele peak bands. Note the loss of the middle band showing loss of heterozygosity of Xq25-26.3. The genes related to X-linked diseases (*OCRL*, *AIFM1*, *IGSF1*, *GPC3*, *PHF6*, *HPRT1*) (orange) such as Dent disease 2, Lowe Oculo-Cerebro-Renal syndrome, cowchock syndrome, central hypothyroidism and testicular enlargement, Simpson-Golabi-Behmel syndrome, Borjeson-Forsman-Lehman syndrome and Lesch-Nyhan are shown.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the family for participating in this study.

REFERENCES

- 1 **Nguyen L**, Humbert S, Saudou F, Chariot A. Elongator - an emerging role in neurological disorders. *Trends Mol Med* 2010; **16**: 1-6 [PMID: 20036197 DOI: 10.1016/j.molmed.2009.11.002]
- 2 **Simpson CL**, Lemmens R, Miskiewicz K, Broom WJ, Hansen VK, van Vught PW, Landers JE, Sapp P, Van Den Bosch L, Knight J, Neale BM, Turner MR, Veldink JH, Ophoff RA, Tripathi VB, Beleza A, Shah MN, Proitsi P, Van Hoecke A, Carmeliet P, Horvitz HR, Leigh PN, Shaw CE, van den Berg LH, Sham PC, Powell JF, Verstrecken P, Brown RH Jr, Robberecht W, Al-Chalabi A. Variants of the elongator protein 3 (ELP3) gene are associated with motor neuron degeneration. *Hum Mol Genet* 2009; **18**: 472-481 [PMID: 18996918 DOI: 10.1093/hmg/ddn375]
- 3 **D'Elia AV**, Pellizzari L, Fabbro D, Pianta A, Divizia MT, Rinaldi R, Grammatico B, Grammatico P, Arduino C, Damante G. A deletion 3' to the PAX6 gene in familial aniridia cases. *Mol Vis* 2007; **13**: 1245-1250 [PMID: 17679951]
- 4 **Davis LK**, Meyer KJ, Rudd DS, Librant AL, Epping EA, Sheffield VC, Wassink TH. Pax6 3' deletion results in aniridia, autism and mental retardation. *Hum Genet* 2008; **123**: 371-378 [PMID: 18322702 DOI: 10.1007/s00439-008-0484-x]
- 5 **Bayrakli F**, Guney I, Bayri Y, Ercan-Sencicek AG, Ceyhan D, Cankaya T, Mason C, Bilguvar K, Bayrakli S, Mane SM, State MW, Gunel M. A novel heterozygous deletion within the 3' region of the PAX6 gene causing isolated aniridia in a large family group. *J Clin Neurosci* 2009; **16**: 1610-1614 [PMID: 19793656 DOI: 10.1016/j.jocn.2009.03.022]
- 6 **Cheng F**, Song W, Kang Y, Yu S, Yuan H. A 556 kb deletion in the downstream region of the PAX6 gene causes familial aniridia and other eye anomalies in a Chinese family. *Mol Vis* 2011; **17**: 448-455 [PMID: 21321669]
- 7 **Zhang X**, Zhang Q, Tong Y, Dai H, Zhao X, Bai F, Xu L, Li Y. Large novel deletions detected in Chinese families with aniridia: correlation between genotype and phenotype. *Mol Vis* 2011; **17**: 548-557 [PMID: 21364908]
- 8 **Simioni M**, Vieira TP, Sgardioli IC, Freitas EL, Rosenberg C, Maurer-Morelli CV, Lopes-Cendes I, Fett-Conte AC, Gil-da-Silva-Lopes VL. Insertional translocation of 15q25-q26 into 11p13 and duplication at

- 8p23.1 characterized by high resolution arrays in a boy with congenital malformations and aniridia. *Am J Med Genet A* 2012; **158A**: 2905-2910 [PMID: 22991255 DOI: 10.1002/ajmg.a.35603]
- 9 **Addis L**, Ahn JW, Dobson R, Dixit A, Ogilvie CM, Pinto D, Vaags AK, Coon H, Chaste P, Wilson S, Parr JR, Andrieux J, Lenne B, Tumer Z, Leuzzi V, Aubell K, Koillinen H, Curran S, Marshall CR, Scherer SW, Strug LJ, Collier DA, Pal DK. Microdeletions of ELP4 Are Associated with Language Impairment, Autism Spectrum Disorder, and Mental Retardation. *Hum Mutat* 2015; **36**: 842-850 [PMID: 26010655 DOI: 10.1002/humu.22816]
 - 10 **Balay L**, Totten E, Okada L, Zell S, Ticho B, Israel J, Kogan J. A familial pericentric inversion of chromosome 11 associated with a microdeletion of 163 kb and microduplication of 288 kb at 11p13 and 11q22.3 without aniridia or eye anomalies. *Am J Med Genet A* 2016; **170A**: 202-209 [PMID: 26419218 DOI: 10.1002/ajmg.a.37388]
 - 11 **McBride DJ**, Buckle A, van Heyningen V, Kleinjan DA. DNaseI hypersensitivity and ultraconservation reveal novel, interdependent long-range enhancers at the complex Pax6 cis-regulatory region. *PLoS One* 2011; **6**: e28616 [PMID: 22220192 DOI: 10.1371/journal.pone.0028616]
 - 12 **Bhatia S**, Bengani H, Fish M, Brown A, Divizia MT, de Marco R, Damante G, Grainger R, van Heyningen V, Kleinjan DA. Disruption of autoregulatory feedback by a mutation in a remote, ultraconserved PAX6 enhancer causes aniridia. *Am J Hum Genet* 2013; **93**: 1126-1134 [PMID: 24290376 DOI: 10.1016/j.ajhg.2013.10.028]
 - 13 **Kearney HM**, Thorland EC, Brown KK, Quintero-Rivera F, South ST; Working Group of the American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance Committee. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med* 2011; **13**: 680-685 [PMID: 21681106 DOI: 10.1097/GIM.0b013e3182217a3a]
 - 14 **South ST**, Lee C, Lamb AN, Higgins AW, Kearney HM; Working Group for the American College of Medical Genetics and Genomics Laboratory Quality Assurance Committee. ACMG Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: revision 2013. *Genet Med* 2013; **15**: 901-909 [PMID: 24071793 DOI: 10.1038/gim.2013.129]
 - 15 **Verloes A**, Di Donato N, Masliah-Planchon J, Jongmans M, Abdul-Raman OA, Albrecht B, Allanson J, Brunner H, Bertola D, Chassaing N, David A, Devriendt K, Eftekhari P, Drouin-Garraud V, Faravelli F, Faivre L, Giuliano F, Guion Almeida L, Juncos J, Kempers M, Eker HK, Lacombe D, Lin A, Mancini G, Melis D, Lourenço CM, Siu VM, Morin G, Nezarati M, Nowaczyk MJ, Ramer JC, Osimani S, Philip N, Pierpont ME, Procaccio V, Roseli ZS, Rossi M, Rusu C, Sznajer Y, Templin L, Uliana V, Klaus M, Van Bon B, Van Ravenswaaij C, Wainer B, Fry AE, Rump A, Hoischen A, Drunat S, Rivière JB, Dobyns WB, Pilz DT. Baraitser-Winter cerebrofrontofacial syndrome: delineation of the spectrum in 42 cases. *Eur J Hum Genet* 2015; **23**: 292-301 [PMID: 25052316 DOI: 10.1038/ejhg.2014.95]
 - 16 **Bruno DL**, Ganesamoorthy D, Schoumans J, Bankier A, Coman D, Delatycki M, Gardner RJ, Hunter M, James PA, Kannu P, McGillivray G, Pachter N, Peters H, Rieubland C, Savarirayan R, Scheffer IE, Sheffield L, Tan T, White SM, Yeung A, Bowman Z, Ngo C, Choy KW, Cacheux V, Wong L, Amor DJ, Slater HR. Detection of cryptic pathogenic copy number variations and constitutional loss of heterozygosity using high resolution SNP microarray analysis in 117 patients referred for cytogenetic analysis and impact on clinical practice. *J Med Genet* 2009; **46**: 123-131 [PMID: 19015223 DOI: 10.1136/jmg.2008.062604]
 - 17 **Géczy J**, Turner G, Nelson J, Partington M. The Börjeson-Forssman-Lehman syndrome (BFLS, MIM #301900). *Eur J Hum Genet* 2006; **14**: 1233-1237 [PMID: 16912705 DOI: 10.1038/sj.ejhg.5201639]
 - 18 **Kasper BS**, Dörfler A, Di Donato N, Kasper EM, Wiczorek D, Hoyer J, Zweier C. Central nervous system anomalies in two females with Borjeson-Forssman-Lehmann syndrome. *Epilepsy Behav* 2017; **69**: 104-109 [PMID: 28237832 DOI: 10.1016/j.yebeh.2017.01.022]
 - 19 **Broman KW**, Weber JL. Long homozygous chromosomal segments in reference families from the centre d'Etude du polymorphisme humain. *Am J Hum Genet* 1999; **65**: 1493-1500 [PMID: 10577902 DOI: 10.1086/302661]
 - 20 **Gibson J**, Morton NE, Collins A. Extended tracts of homozygosity in outbred human populations. *Hum Mol Genet* 2006; **15**: 789-795 [PMID: 16436455 DOI: 10.1093/hmg/ddi493]
 - 21 **Simon-Sanchez J**, Scholz S, Fung HC, Matarin M, Hernandez D, Gibbs JR, Britton A, de Vrieze FW, Peckham E, Gwinn-Hardy K, Crawley A, Keen JC, Nash J, Borgaonkar D, Hardy J, Singleton A. Genome-wide SNP assay reveals structural genomic variation, extended homozygosity and cell-line induced alterations in normal individuals. *Hum Mol Genet* 2007; **16**: 1-14 [PMID: 17116639 DOI: 10.1093/hmg/ddl436]



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
7041 Koll Center Parkway, Suite 160, Pleasanton, CA 94566, USA

Telephone: +1-925-3991568

E-mail: bpgoffice@wjgnet.com

Help Desk: <https://www.f6publishing.com/helpdesk>

<https://www.wjgnet.com>

