



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**DETECCIÓN DE DIFERENCIAS GENÉTICAS ENTRE PRODUCTOS NACIDOS
VIVOS Y ABORTOS CON TRISOMÍAS 13, 18, 21 Y MONOSOMÍA X.**

TESIS

Que para optar por el grado de:
DOCTORA EN CIENCIAS

Presenta:

M. en C. SILVIA ROSALÍA SÁNCHEZ SANDOVAL

**Tutora principal de tesis:
Dra. Sara Frias Vázquez**

Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM
Instituto Nacional de Pediatría

Comité Tutotral:

Med. Esp. Alessandra Carnevale Cantoni
Instituto Nacional de Medicina Genómica

Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano †
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., noviembre 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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**DETECCIÓN DE DIFERENCIAS GENÉTICAS ENTRE PRODUCTOS NACIDOS
VIVOS Y ABORTOS CON TRISOMÍAS 13, 18, 21 Y MONOSOMÍA X.**

TESIS

Que para optar por el grado de:
DOCTORA EN CIENCIAS

Presenta:

M. en C. SILVIA ROSALÍA SÁNCHEZ SANDOVAL

Tutora principal de tesis:

Dra. Sara Frias Vázquez

Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM
Instituto Nacional de Pediatría

Comité Tutotral:

Med. Esp. Alessandra Carnevale Cantoni

Instituto Nacional de Medicina Genómica

Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano †

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., noviembre de 2023.

COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
OFICIO: CGEP/CPCB/IIBM/0796/2023
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **07 de agosto de 2023** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la estudiante **SÁNCHEZ SANDOVAL SILVIA ROSALÍA** con número de cuenta **88241223** con la tesis titulada "**DETECCIÓN DE DIFERENCIAS GENÉTICAS ENTRE PRODUCTOS NACIDOS VIVOS Y ABORTOS CON TRISOMÍAS 13, 18, 21 Y MONOSOMÍA X.**", realizada bajo la dirección de la **DRA. SARA FRÍAS VÁZQUEZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidenta: DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO
Vocal: MED. ESP. ALESSANDRA CARNEVALE CANTONI
Vocal: DR. JOSÉ MIGUEL BETANCOURT RULE
Vocal: DRA. ANGÉLICA GRACIELA MARTÍNEZ HERNÁNDEZ
Secretaria: DRA. LEDA CAROLINA TORRES MALDONADO

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

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 10 de octubre de 2023

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA

c. c. p. Expediente del alumno

AGNS/JMB/EARR/jmb



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A MI UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO Y SU POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS.

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO GRACIAS A LOS SIGUIENTES

APOYOS ECONÓMICOS

Fondos de Cooperación Internacional para la Ciencia y Tecnología (FONCICYT)
proyecto 95419

FOSSSIS proyecto 142040

INP Proyecto 84/2010

La autora de esta tesis recibió BECA CONAHCYT ,Posgrado en Ciencias Biológicas
100254

A MI TUTORA Y COMITÉ TUTORAL

Dra. Sara Frias Vázquez

Med. Esp. Alessandra Carnevale Cantoni

Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano †

A las instituciones y los elementos de éstas que participaron en este proyecto:

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA, en especial al laboratorio de Citogenética
y todos sus integrantes

INPER, Departamento de Genética y Genómica Humana, México

Laboratorios DIAGEN, México

Hospital Ángeles de las Lomas, Unidad de Genética Aplicada, México

INMEGEN, Laboratorio de Enfermedades Mendelianas y Laboratorio de
Inmunogenómica y Enfermedades Metabólicas, México

GENETADI, España y México

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

DEDICO ESTE TRABAJO A MIS HIJOS ISAAC Y ARANTZA

Todo se puede lograr en la vida con dedicación y gusto por el trabajo.

Y A PACO

Gracias por TODO el tiempo y el apoyo que brindaste a cada paso de este empedrado camino y porque “en la calle codo a codo, seguimos siendo mucho más que dos...”

A mi querida Dra. Sara Frias Vázquez

Gracias por todas las enseñanzas, los desvelos, el trabajo arduo y a veces hasta altas horas; pero sobre todas las cosas, gracias por la amistad.

A mi madre, padre y hermanos.

Aunque todo este trabajo ya fue por gusto y placer, siempre estuvieron apoyando.

“No estudio por saber más, sino por ignorar menos.”

Sor Juana Inés de la Cruz

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. ANTECEDENTES.....	5
1.1 ANEUPLOIDÍA Y SU IMPORTANCIA EN SALUD.....	5
1.2 ETIOLOGIA DE LAS ANEUPLOIDIAS	7
1.2.1 Generalidades de mecanismos.....	7
1.2.2 No disyunción.....	7
1.2.3 Rezago Anafásico.....	9
1.3 EPIDEMIOLOGÍA DE LAS ANEUPLOIDÍAS.....	10
1.3.1 Nacidos vivos (NV).....	10
1.3.2 Sobrevida en aneuploidías.....	12
1.4 VARIANTES EN EL GENOMA.....	14
2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	16
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
4. JUSTIFICACION.....	17
5. HIPOTESIS.....	17
6. OBJETIVOS	17
6.1 OBJETIVO GENERAL	17
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
7. METODOLOGÍA	18
7.1 POBLACION DE ESTUDIO.....	18
7.2 TAMAÑO DE LA MUESTRA.	19
7.3 CRITERIOS.....	19
7.3.1. Criterios de inclusión	19
7.3.2 Criterios de exclusión.....	19
7.3.3 Criterio de Eliminación.....	20
7.4 ESTRATEGIA DE ESTUDIO	20
7.4.1 Mosaicismo.	21

7.4.1.1 Cosecha directa de Tejidos.....	22
7.4.1.2 Ensayos de hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia en células en interfase (iFISH)	23
7.4.2 Diferencias genómicas.....	24
7.4.2.1 Extracción de DNA.....	24
7.4.2.2 Microarreglos de hibridación genómica comparativa (aCGH).....	25
7.4.2.3 Microarreglos Genome-Wide Human SNP Array 6.0.....	27
7.5 ANALISIS ESTADISTICO.....	28
8. RESULTADOS	28
8.1 MOSAICISMO	28
8.1.1 Frecuencias basales de aneuploidía en individuos sanos.	30
8.1.2 Mosaicismo en Nacidos vivos.....	31
8.1.3 Búsqueda de mosaicismo en Abortos Espontáneos.....	39
8.1.4 Presencia de células disómicas (mosaicos) en Nacidos vivos vs Abortos espontáneos.	48
8.2 DETERMINACION DE REGIONES GENÓMICAS DISTINTIVAS EN NACIDOS VIVOS	50
8.2.1 Microarreglos de hibridación genómica comparativa (aCGH) Agilent.....	50
8.2.2 Análisis de CNV por Microarreglos Affimetrix SNPs 6.0.....	61
8.2.2.1 No se encontraron diferencias respecto a Tramos largos contiguos de homocigosidad (LCSH).	61
8.2.2.2 No se encontraron diferencias entre los grupos, respecto a las variantes en el número de copias (CNV).....	62
8.2.2.2.1 Validación del número de copias por PCR cuantitativo (qPCR).	66
8.2.2.2.2 Ancestría.....	68
8.2.2.2.3 Confirmación de que la CNV encontrada en el 100% de la población estudiada, está relacionada con nuestra etnia mestiza-mexicana.....	69
9. DISCUSION	70
9.1 DIFERENCIAS EN LA PRESENCIA DE MOSAICISMO EN NACIDOS VIVOS Y ABORTOS ESPONTÁNEOS.....	70
9.2 VARIANTES GENÓMICAS	73
9.2.1 Análisis de diferencias genómicas entre Nacidos vivos vs Abortos espontáneos mediante Hibridación genómica comparativa (aCGH).	73
9.2.2 Variantes de número de copia con alta frecuencia obtenidas mediante SNP6.0	74
10. CONCLUSIONES	78
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
12. ANEXOS.....	94

RESUMEN

Se conoce que más del 90% de los embarazos aneuploides se pierden como abortos tempranos, 5.8% como óbitos y sólo 0.6% de las concepciones aneuploides, llegan a nacer. La evidencia indica que a excepción de algunas aneuploidías como las polisomías de cromosomas sexuales (en las que se observa corrección de dosis génica por silenciamiento), las trisomías y monosomías se abortan en su mayoría, por lo que los nacidos vivos con trisomías 13, 18 y 21 así como la monosomía X, son excepciones a la regla de letalidad. La única propuesta para explicar estos nacimientos, es que los nacidos vivos con estas aneuploidías no se abortaron porque posiblemente tienen también una segunda línea celular normal o disómica, mosaicismo que les permitiría terminar la gestación.

El objetivo de este trabajo fue detectar diferencias genéticas entre abortos espontáneos (AE) y nacidos vivos (NV) con trisomías 13, 18, 21 o monosomía X, estudiadas en células de tejido embrionario, linfocitos de sangre periférica y células epiteliales de mucosa bucal.

Mediante hibridación *in situ* con fluorescencia en células en interfase con diferente origen embrionario, se encontró que la presencia de una línea celular normal no es la razón de la sobrevivencia hasta el nacimiento de los individuos aneuploides, ya que no hay una diferencia ni en el número de individuos con mosaico, ni en los porcentajes de la línea disómica. Más aún, los resultados mostrados en este trabajo, indican que la presencia de estas líneas celulares con cariotipo normal, son más frecuentes en los AE que en los NV.

Al explorar mediante hibridación genómica comparativa las diferencias a nivel de pérdidas y ganancias de regiones genómicas entre AE vs NV, se evidenciaron diversas

regiones que presentan genes o RNA regulatorios, diferentes en los NV comparados con los AE. Los NV con trisomía 13 y trisomía 18 presentaron 6 y 5 regiones respectivamente con microdeleciones y en ambos se apreció una con microduplicación; mientras que los NV con trisomía 21, mostraron 6 microdeleciones y 5 microduplicaciones y finalmente en las NV con monosomía X se observaron 4 microdeleciones y 3 microduplicaciones.

En cuanto a la búsqueda de variantes en el número de copias (CNV), con microarreglos Genome Wide SNP 6.0, de Affimetrix, no se notaron diferencias entre AE vs NV en ninguno de los grupos estudiados, sin embargo un hallazgo interesante e importante fue que en todos los grupos de individuos estudiados, se hallaron cuatro CNV presentes con una elevada frecuencia: CNV 2p11.2 (99.6%), 8p11.22 (54.5%), 14q32.33 (100%), and 15q11.2 (71.1%), esto nos llevó a investigar si en realidad estas son tan frecuentes en los grupos de este estudio y encontramos que las elevadas frecuencias son un artefacto por el uso del HapMap como referencia, en donde la representatividad de la población hispánica y específicamente mexicana, es mínima. Cuando se compararon estos resultados con una población étnicamente relacionada, las frecuencias extremas desaparecieron. Esta información demuestra la importancia de tomar una población de referencia preferentemente del mismo origen geográfico para evitar relacionarlos con eventos biológicos de manera errónea.

Este trabajo muestra que, contrario a lo descrito en la literatura, el mosaicismo no es un factor para la sobrevida de un feto con aneuploidía y que, hasta ahora, no hay un factor genómico que pueda determinar su letalidad. Otra de las aportaciones de este trabajo, es la descripción de variantes tipo CNV que caracterizan a población mestiza mexicana y esto es de suma importancia ya que evitará asociaciones de estas variantes con patologías.

ABSTRACT

More than 90% of aneuploid pregnancies are lost as early abortions, 5.8% as stillbirths and only 0.6% of aneuploid conceptions are born. The evidence indicates that, except for some aneuploidies such as sex chromosome polysomies (in which correction of gene dose due to silencing is observed), trisomies and monosomies are mostly aborted, so that live births with trisomies 13, 18 and 21, as well as monosomy X, are exceptions to the lethality rule, and the reason for this has hardly been explored in the literature. The only proposal to explain these births has been that the live births with aneuploidies were not aborted due to the presence of a second normal or disomic cell line, a mosaicism that would allow them to terminate the pregnancy.

The objective of this work was to detect genetic differences between spontaneous abortions (SA) and live births (LB) with trisomies 13, 18, 21 or monosomy X, studied in embryonic tissue cells, peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells.

Using fluorescence in situ hybridization in interphase cells with different embryonic origin, it was found that the presence of a normal cell line is not the reason for survival until birth in aneuploid individuals, since no difference was found in the number of individuals with mosaic, nor in the percentages of the disomic line; in fact, according to our results, the presence of these normal lines may even have a greater presence in SA than in LB.

When exploring through comparative genomic hybridization the differences at the level of losses and gains of genomic regions between SA vs LB, various regions were found that present regulatory genes or RNA, different in the LB when compared with SA, according to the aneuploidy studied. The LB with trisomy 13 presented 6 regions with microdeletion and one with microduplication. The LB with trisomy 18 presented 5

microdeletions and one with a microduplication. In the LB with trisomy 21, 6 microdeletions and 5 microduplications were found, and finally, in the LB with monosomy X, 4 microdeletions and 3 microduplications were observed.

Regarding the search for CNV type variants, no differences were observed between SA vs LB in any of the groups studied; however, an interesting and important finding was that four CNVs were found present in all the groups of individuals studied here, with an extremely high frequency: CNV 2p11.2 (99.6%), 8p11.22 (54.5%), 14q32.33 (100%), and 15q11.2 (71.1%). This led us to investigate whether these are actually that frequent in the groups of this study, and we found that the high frequencies are an artifact due to the use of HapMap as a reference, where the representativeness of the Hispanic and specifically Mexican population is minimal. When these results were compared to an ethnically related population, the extreme frequencies disappeared. This information demonstrates the importance of taking a reference population, preferably of the same geographic origin, to avoid incorrectly relating them to biological events.

This work shows that, contrary to what has been described in the literature, mosaicism is not a factor for the survival of a fetus with aneuploidy and that, up to now, there is no genomic factor that can determine its lethality. Another of the contributions of this work is the description of CNV-type variants that characterize the Mexican mestizo population, and this is extremely important since it will avoid associations of these variants with pathologies.

1. ANTECEDENTES

1.1 ANEUPLOIDÍA Y SU IMPORTANCIA EN SALUD.

La aneuploidía es la ganancia ó pérdida de uno o varios cromosomas en la célula. Es la alteración más frecuente en los seres humanos y ocurre en por lo menos el 5% de los embarazos clínicamente reconocidos (Hassold y Hunt 2001). La no disyunción cromosómica en la meiosis es la principal causa de la formación de cigotos aneuploides (con trisomías o monosomías). El desbalance de cromosomas completos es generalmente incompatible con la vida, por lo que es un evento poco frecuente en la mayoría de las especies estudiadas, por ejemplo en *Saccharomyces cerevisiae* y *Drosophila melanogaster* se ha observado una probabilidad de no disyunción aproximada de 1 en 10,000 eventos para un cromosoma determinado; en ratón, se sabe que 1 a 2% de los cigotos son aneuploides, sin embargo por razones poco claras, la especie humana es una notable excepción, se ha observado que la no disyunción meiótica es muy frecuente ya que hasta el 30% de los cigotos presentan aneuploidías (Hassold y Hunt 2001). En seres humanos, entre el 15-20% de los embarazos reconocidos se abortan (Vorsanova *et al.* 2005), se ha mostrado que el 60% de los abortos del primer trimestre presentan alteraciones cromosómicas y de éstas, más de dos terceras partes son aneuploidías, principalmente representadas por trisomías autosómicas y monosomía X (Fritz *et al.* 2001, Levedev *et al.* 2004, Moore *et al.* 2000). La mayoría de los embarazos aneuploides se pierden como antes de la semana 20 de gestación, 5.8% como óbitos y tan sólo el 0.6% llegan a nacer vivos (Moore *et al.* 2000), lo cual los coloca como una condición de excepción.

Las aneuploidías que pueden sobrevivir son las trisomías de cromosomas sexuales y de los autosomas 13, 18 y 21 así como la monosomía 45,X y a pesar de ser sólo un pequeño porcentaje del total de aneuploides, su nacimiento coloca a la

aneuploidía como la principal causa de anomalías congénitas y de retraso mental en NV, de tal manera que la frecuencia de aneuploidías, es mayor que todas las enfermedades monogénicas juntas, identificadas en los humanos (Hassold 2007) .

Cualquier cromosoma es susceptible de segregarse erróneamente, por lo que se pueden encontrar células aneuploides con cualquier cromosoma involucrado, aunque no todas estas células son capaces de sobrevivir a la falta/ganancia del cromosoma en cuestión (Delhanty 2005)

Hassold y Hunt (2001), evaluaron la incidencia de aneuploidías encontradas en las diferentes etapas del desarrollo humano (Tabla 1) y observaron que la incidencia de aneuploidías se reduce a lo largo del mismo, esto debido a que la pérdida de productos es mayor durante el primer trimestre de gestación. Aunque la aneuploidía es una alteración cromosómica poco compatible con la vida, en la formación de la placenta es un mecanismo muy importante. La unión del tejido embrionario al útero y la adquisición de sangre materna oxigenada dependen de células epiteliales muy especializadas, los citotrofoblastos (CTB). Estas células tienen un efecto invasivo similar al tumorigénico, que se logra debido a la aneuploidía de los CTB, la cual adquieren luego de múltiples divisiones celulares que producen errores en la segregación cromosómica. El 30% de estas células presentan aneuploidías de más de un cromosoma. El 95% de los CTB que son aneuploides lo son para los cromosomas 3, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 17, 18, X. Estos sucesos son al azar y forman parte de la diferenciación natural de los CTB, y no de eventos anormales (Jingly *et al.* 2005).

Tabla 1. Incidencia de aneuploidías durante la gametogénesis y el desarrollo humano. Modificado de Hassold y Hunt (2001)

Semanas de Gestación		0		6-8		20		40	
	Esperma	Ovocitos	Embrión Pre-implantación	Abortos Pre-clínicos	Abortos espontáneos	Óbitos	Nacidos Vivos		
Incidencia de Aneuploidía	1-2%	~20%	~20%	¿?	35%	4%	0.3%		
Aneuploidías más comunes	Varios	Varios	Varios	¿?	45, X; +16; +21; +22	+13; +18; +21	+13; +18; +21; XXX; XXY; XYY		

1.2 ETIOLOGIA DE LAS ANEUPLOIDIAS

1.2.1 Generalidades de mecanismos

Los mecanismos generadores de aneuploidías en los seres humanos pueden ocurrir durante la primera o segunda división meiótica, o bien en mitosis. La mayoría de las aneuploidías estudiadas se generan por errores ocurridos durante las divisiones meióticas maternas; se ha estimado en general que la tasa de desbalances en ovocitos de mujeres entre 30-35 años es de alrededor del 11% (Delhanty 2005). Los dos mecanismos más estudiados son la no disyunción y el rezago anafásico.

1.2.2 No disyunción

La no disyunción se define como la falla del mecanismo de segregación en donde un cromosoma homólogo o una cromátide hermana, no segrega simétricamente durante una división celular. Cuando las cromátidas hermanas se separan de manera temprana durante la primera división meiótica, a este proceso se le conoce como “predivisión” o separación prematura de centrómeros (Delhanty 2005). Durante la primera división meiótica (MI) en una persona cromosómicamente normal el par de homólogos, falla en dividirse adecuadamente para llegar a la segunda división meiótica (MII), una célula hija tendrá dos cromosomas y la otra ninguno (Gardner-McKinlay *et al.* 2012, Gersen y Keagle 2005). Existe un mecanismo

regulador del anclaje del cinetocoro con los microtúbulos el cual está íntimamente relacionado con el proceso de no disyunción. En el cinetocoro hay algunas proteínas que regulan este anclaje como la cinasa aurora B y la proteína fosfatasa 1 (PP1), la primera se localiza en la región centromérica entre cinetocoros de cromátidas hermanas, su mala posición, inhibición o mal funcionamiento desequilibra la correcta dinámica de la unión a los microtúbulos. La PP1 antagoniza las acciones de Aurora B, por lo que su inhibición incrementa la actividad de Aurora B (Bakhoum y Compton 2012).

Alteraciones sutiles dentro del mecanismo de anclaje cinetocoro-microtúbulo se detectan por el punto de control del ensamblaje del huso (SAC Spindle assembly checkpoint) el cual está compuesto por proteínas BUB1, MAD1, MAD2, MAD3 (BubR1 en mamíferos), BUB3 Y MPS1. Este complejo monitorea que el huso esté ensamblado de manera bipolar para permitir la continuación a anafase. Mutaciones en cualquiera de estos genes, se asocian con no-disyunción (Bakhoum y Compton, 2012, Williams *et al.* 2007).

En meiosis los mecanismos de regulación de la división son muy semejantes; en MI sólo se separan los cromosomas homólogos, porque existen un grupo de cohesinas que actúan en la unión de los centrómeros (Rec8-Psc3) y otras que mantienen la unión de las cromátidas (Rec8-Rec11). En MI la separasa degrada a las cohesinas que mantienen unidos a los brazos cromosómicos, pero no las de los centrómeros, debido a que estas últimas se encuentran protegidas por la proteína Shugosina (Sgo1), la cual no se degradará sino hasta la segunda división meiótica (MII). Durante anafase II, la separasa puede entonces degradar la Rec8 centromérica y con esto lograr la separación completa de las cromátidas. Mutaciones en el gen *rec8* dan lugar a una separación prematura de cromátidas durante anafase I la cual no

puede rescatar Rad21 a pesar de tener funciones semejantes (Watanabe 2005, Wang y Dai 2005, Webster y Schuh 2017).

1.2.3 Rezago Anafásico.

Cuando un cromosoma no se une de manera adecuada al huso mitótico, puede no llegar al polo que le corresponde durante anafase, el cromosoma no se incluye dentro de la célula durante la formación de la nueva membrana nuclear, formará un micronúcleo dentro de su propio citoplasma el cual más adelante se perderá; esto se denomina rezago anafásico la diferencia con la no disyunción a nivel de productos es que la primera genera dos células hijas anormales, una con trisomía y la otra con monosomía del cromosoma que no disyundió. El rezago anafásico genera una célula monosómica y una célula con número cromosómico normal (Webster y Schuh 2017).

En el rezago anafásico intervienen los cinetocoros que son estructuras proteínicas complejas que unen a los cromosomas con los microtúbulos del huso mitótico; los microtúbulos son estructuras dinámicas que constantemente se polimerizan y despolimerizan en una célula en división celular, lo que los hace vulnerables a tener errores, cada microtúbulo debe unirse a un cinetocoro pero cuando dos microtúbulos se unen a un mismo cinetocoro y se dirigen hacia diferentes polos, se conoce como anclaje merotélico y si no se corrige antes de la anafase se produce una mala segregación por rezago anafásico (Delhanty 2005).

De manera interesante, si el rezago anafásico ocurre en un cigoto trisómico, este mecanismo puede generar que al dividirse estas células, se originen células hijas no idénticas: una trisómica y otra disómica normal pérdida de un cromosoma por rezago anafásico, lo cual genera un mosaico celular disomía/trisomía; a este proceso se le conoce también como rescate trisómico y puede originar disomía uniparental,

que si se trata de isodisomía, los dos cromosomas de la línea disómica serían idénticos en secuencia (Gardner-McKinlay *et al.* 2012).

1.3 EPIDEMIOLOGÍA DE LAS ANEUPLOIDÍAS.

Es importante señalar que existe una gran variabilidad en cuanto a los reportes de las incidencias de cada entidad cromosómica, por lo que los rangos reportados pueden ser muy amplios, debido a los tamaños de las poblaciones que han estudiado los diferentes autores, a las metodologías aplicadas o incluso al momento del desarrollo humano que se incluya para evaluar sus prevalencias (nacidos vivos/muertos, abortos, óbitos).

1.3.1 Nacidos vivos (NV)

Entre recién nacidos alrededor del 0.3% son aneuploides, siendo la trisomía 21 y de los cromosomas sexuales las más frecuentes. (Hassold y Hunt 2001, Fritz *et al.* 2001, Vorsanova *et al.* 2005). Los recién nacidos con aneuploidías que logran sobrevivir son aquellos que involucran en su aneuploidía a los cromosomas sexuales (sean X ó Y) y las trisomías de los autosomas 21, 18 y 13, aunque se han reportado algunos otros autosomas involucrados en trisomías en nacidos vivos, pero generalmente se encuentran como mosaicos celulares.

TRISOMÍA 21 (Síndrome de Down). La prevalencia de la trisomía 21 es aproximadamente de 1:700 NV (Sherman *et al.* 2007, Gardner-McKinlay *et al.* 2012), la cual puede variar con respecto a la edad materna. En un meta-análisis reciente se ha visto que esta incidencia se ha disminuido, con un promedio de 8.8 por cada 10,000 NV (0.88:1000) en los últimos 50 años, probablemente gracias a la implementación del diagnóstico prenatal (Huete-García y Otaola-Barranquero 2021). Es ligeramente más frecuente en varones que en mujeres (1.2:1). El 95% de los casos tienen trisomía

21 regular en su cariotipo, mientras que el 5% restante pueden presentar translocaciones robertsonianas y mosaicismo somático. Por otro lado, se ha evidenciado que más del 90% de los casos de trisomía 21 se originan en meiosis materna y de estos el ≈75% ocurren en MI (Freeman *et al.*, 2007, Gardner-McKinlay *et al.* 2012). Estos pacientes cursan con malformaciones faciales, fisuras palpebrales oblicuas, puente nasal ancho, epicanto, además de malformaciones cardíacas, intestinales, agenesia renal, entre otros (Cassidy y Allanson 2010).

TRISOMÍA 18 (Síndrome de Edwards). Representa la segunda trisomía más común en NV, después de la trisomía 21. Tienen una frecuencia que va de 1 en 5,000 - 8500 (Cassidy y Allanson 2010, Gardner-McKinlay *et al.* 2012) la mayoría con cariotipo 47, +18 resultado de no disyunción en meiosis materna (33%MI, 56% MII) (Tabla 2 ref.1) en algunas ocasiones se pueden encontrar como producto de translocaciones. Un estudio multirregistros de >20 países, incluido México, menciona una reducción de la prevalencia a 1.07 por cada 10000 NV (Goel *et al.* 2019). La mayoría de los casos mueren en la primera semana de vida y sólo entre el 5 y 10% llegan al año de vida y mucho en parte debido a las anomalías congénitas cardíacas, orofaciales, abdominales y de sistema nervioso central (Cassidy y Allanson 2010, Gardner-McKinlay *et al.* 2012, Goel *et al.* 2019). Como en otras trisomías como la 13 ó 21, la frecuencia incrementa con la edad materna avanzada ó EMA (Holmgren y Lacoursiere 2008, Gardner-McKinlay *et al.* 2012).

TRISOMIA 13 (Síndrome de Patau). Tiene una frecuencia mucho más baja que las anteriores. En EU en un estudio realizado por el Utah Birth Defects Network establecen una prevalencia de 1 en 12 000 a 20 000 (Cassidy y Allanson 2010), sin embargo, en el estudio multirregistro realizado en 2019 donde se incluye población mexicana, la prevalencia baja a 0.55 por 10 000 NV (Goel *et al.* 2019) Se considera

letal, con un riesgo de muerte en útero del 80%. De los nacidos vivos, sobreviven de 5 a 7 días y menos del 5% llegan al año de vida. Más del 90% de los casos con trisomía 13 son de origen materno, con la misma frecuencia de origen en MI y MII, aunque hay trabajos que sugieren una mayor frecuencia en MI (Bugge *et al.* 2007, Hall *et al.* 2007, Cassidy y Allanson 2010). No hay reportes de recurrencia en esta trisomía. Este síndrome está asociado con severas malformaciones estructurales afectando el sistema nervioso central, la estructura cardíaca y sistema gastrointestinal (Holmgren y Lacoursiere 2008).

MONOSOMÍA X (45,X, Síndrome de Turner). Es la anomalía de cromosomas sexuales más común en concepciones femeninas; con una prevalencia de 1 en 2500 nacidas vivas, pero estas cifras representan solo del 1 al 2% de las concepciones afectadas con esta condición, si se consideran los abortos es la más frecuente de las aneuploidías. El 50% de estos tienen cariotipo 45,X regular, la otra mitad muestran mosaicismo. El síndrome de Turner no está asociado con la EMA como la mayoría de las trisomías (Holmgren y Lacoursiere 2008, Barrientos *et al.* 2019, Steiner y Saenger 2022), ya que el 75% de los casos se originan por errores en meiosis paterna. Características asociadas a este síndrome son baja estatura, linfedema, insuficiencia gonadal, anomalías cardíacas, entre otras (Cassidy y Allanson 2010).

1.3.2 Sobrevida en aneuploidías

En relación a factores de supervivencia, se ha propuesto que el mosaico celular con una línea normal es lo que permite vivir a los embriones 45,X, ya que en las pacientes nacidas vivas con Síndrome de Turner hasta 50% presentan una línea celular normal (Urbach y Benvenisty 2009), pero prácticamente no se sabe que ocurre en los abortos y de hecho tampoco hay estudios sobre la participación del mosaicismo

en la supervivencia para las trisomías autosómicas 13, 18 y 21 que llegan a nacer vivos. Existen varios reportes sobre mosaicismo de aneuploidías en series de abortos tempranos espontáneos que reflejan la importancia de la aneuploidía en la letalidad embrionaria, pero no hay estudios en los que intencionadamente se busque mosaicismo en abortos espontáneos del primer trimestre en trisomías 13, 18, 21 y monosomía X, que es cuando la mayoría de las veces se selecciona negativamente la aneuploidía.

Por otra parte, el origen parental de los cromosomas que participan en la aneuploidía, podría también ser relevante en la letalidad o supervivencia. Se sabe que mientras que en la condición 45,X la no disyunción ocurre 75% de las veces en el gameto masculino, para las trisomías la situación es inversa con una contribución de error materno en meiosis I del 90% o más para 13 y 21, y 50% en meiosis II materno para la trisomía 18 con una menor contribución de errores mitóticos (Hassold y Hunt 2001, Hassold 2007).

A excepción de las polisomías de cromosomas sexuales, la aneuploidía es extremadamente poco compatible con la vida, así los nacidos vivos con trisomía 13 (Síndrome de Patau) trisomía 18 (Síndrome de Edwards), trisomía 21 (síndrome de Down) y monosomía 45,X (Síndrome de Turner), son la excepción a la regla de letalidad embrionaria temprana y parecería razonable pensar que su supervivencia se deba no sólo a una, sino a varias posibles causas hasta ahora desconocidas y la razón de esto prácticamente no ha sido explorada en la literatura. En la literatura hay varios estudios sobre la aneuploidía como causa de aborto espontáneo (Moore *et al.* 2000, Fritz *et al.* 2001, Vorsanova *et al.* 2005). En años recientes se ha propuesto que el mosaicismo críptico con una línea celular normal (46,XX) y que el incremento en la síntesis activa de genes de ribonucleoproteínas ó RNA en genomas desbalanceados,

ayuda a tolerar la pérdida de homeostasis en estas células alteradas (Hook y Warburton 2014, Lyapunova *et al.* 2017)

1.4 VARIANTES EN EL GENOMA

El genoma humano tiene un tamaño de 3,1 gigabases, distribuido en 23 pares de cromosomas. En cada par cromosómico se tiene un cromosoma de origen materno y uno de origen paterno, así que cada individuo hereda una copia de cada padre y tiene dos copias (CN=2) de cada locus en sus células (excepto los loci X e Y en los varones); estructuralmente presenta distintas características: variantes de un solo nucleótido, inserción-delección de uno o pocos nucleótidos, secuencias repetidas de un número variable de nucleótidos y variantes estructurales como delecciones o duplicaciones.

En 2004, dos grupos independientes, lafrate *et al.* (2004) y Sebat *et al.* (2004), describieron por primera vez la presencia en todo el genoma de variaciones a gran escala del número de copias en el genoma humano. Estas variantes implican ganancias o pérdidas de varias a cientos de kilobases de DNA genómico entre individuos fenotípicamente normales (Feuk *et al.* 2006, Hujoel *et al.* 2022).

Una variante del número de copias (CNV) se definió inicialmente como un segmento de DNA de más de un kb con una cantidad de copias variable en comparación con un genoma de referencia (Scherer *et al.* 2007). Sin embargo, este término se ha extendido a todas las variaciones cuantitativas en el genoma, incluidas las repeticiones en tándem, las delecciones y las duplicaciones (Conrad *et al.* 2010).

Las CNV representan una proporción significativa de la variabilidad genética total en todas las poblaciones humanas (Freeman *et al.* 2006, Ionita-Laza *et al.* 2008, Zarrei *et al.* 2015) y la mayoría de ellas son una fuente de variación genómica

pero no tienen influencia aparente en el fenotipo. Sin embargo, algunas de ellas han sido previamente reportados con relevancia clínica y definitivamente vinculados con fenotipos patogénicos dependiendo de su tamaño, contenido de genes, superposición con genes de haploinsuficiencia (si es pérdida) o triplosensibilidad (cuando es ganancia), entre otros (Hehir-Kwa *et al.* 2013, Rooney *et al.* 2020). En algunas ocasiones, la interacción con factores genéticos o ambientales adicionales puede influir en si las CNV tienen un efecto fenotípico detectable (Wellcome Trust Case Control Consortium 2010, Mazina *et al.* 2015).

Adicionalmente en algunos microarreglos para estudiar CNV, es posible conocer regiones con homocigosidad ó tramos largos contiguos de homocigosidad (LCSH), gracias a sondas que evalúan polimorfismos de un solo nucleótido (SNP); estas regiones pueden ser el resultado de homologías ancestrales, disomía uniparental o consanguinidad y pueden ayudar a detectar genes candidatos con variantes patogénicas que generen desórdenes autosómicos recesivos (Pajusalu *et al.* 2015).

Debido a que en general y hasta donde se conoce, las aneuploidías son un problema de dosis génica, proponemos que el alcanzar el nacimiento, pudiera estar relacionado con CNVs, ya que son variantes que pueden alterar la dosis génica en diversas regiones del genoma. El presente proyecto implica realizar la búsqueda de mosaicismo y de CNVs en todo el genoma de pacientes con trisomía 13, 18, 21 y Monosomía X, con especial atención en los cromosomas implicados, aunque no de manera exclusiva, ya que se sabe que la sobreexpresión de los genes implicados en estas alteraciones, pueden generar acumulación de proteínas/mRNAs o miRNAs reguladores de genes blanco localizados en otros cromosomas/regiones del genoma de manera que se genera un desbalance en la homeostasis celular (Li y Zhu 2022).

De manera general, más del 90% de los embarazos con aneuploidías se pierden a edades tempranas de la gestación, y que el restante 10% pueden tener factores genéticos como la presencia de una línea normal (mosaicismo) que ayude a balancear la pérdida genómica de un cromosoma faltante o extra (Li y Zhu 2022), influencia de genes ribosomales activos (Lyapunova *et al.* 2017) o variantes en número de copia (CNV) que pudieran favorecer el desarrollo embrionario de individuos aneuploides hasta llegar al nacimiento y por el momento no hay estudios que exploren estos aspectos del desarrollo ontogénico en estos síndromes; su estudio puede no sólo generar conocimiento sobre la biología de las aneuploidías, sino también puede generar información importante respecto al pronóstico y manejo de estos pacientes con aplicación en la medicina preventiva y el consejo genético.

Por lo anterior proponemos la siguiente pregunta de investigación.

2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existen diferencias genómicas entre nacidos vivos y abortos espontáneos con aneuploidía en cuanto a: 1) presencia de células normales (mosaicismo), 2) microdeleciones/microduplicaciones y 3) variantes genómicas de número de copia?

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las aneuploidías en la especie humana son tan frecuentes como el 80% en embriones preimplantación y la mayoría se pierden durante la gestación, de manera que sólo el 0.6% sobreviven hasta el nacimiento. El estudio de las posibles causas de que un embrión aneuploide llegue a término o se aborte, podría generar conocimiento sobre el desarrollo ontogénico de los individuos con aneuploidía. Conocer estas diferencias podría ser útil en la toma de decisión de un aborto electivo vs dejar progresar un aborto espontáneo.

4. JUSTIFICACION

Hasta este momento, los estudios sobre la supervivencia de los productos con aneuploidía son extremadamente escasos y no existen datos que relacionen cambios en número de copias, ya sea deleciones/duplicaciones o CNV, con la supervivencia de sujetos aneuploides, por lo que se trata de un área muy poco explorada. Con este trabajo se aportará conocimiento sobre las diferencias genéticas de los individuos aneuploides que logran sobrevivir el desarrollo ontogénico en nuestra especie, ya que son la excepción a la regla de letalidad *in utero* de la aneuploidía.

5. HIPOTESIS

Los individuos aneuploides que llegan a nacer vivos tienen diferencias genómicas que los distinguen de los abortos espontáneos y se relacionan con una mayor presencia de células normales (mosaicismo) y pérdida o ganancia de regiones específicas del genoma.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Detectar variantes genéticas entre abortos y nacidos vivos con trisomías 13, 18, 21 o monosomía X, estudiadas en células de tejido embrionario de abortos y en linfocitos de sangre periférica de individuos nacidos vivos.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Determinar si existen diferencias en la presencia y porcentaje de células disómicas normales (mosaicismo) entre los individuos nacidos vivos vs abortos, con cariotipos aneuploides.

2) Identificar regiones genómicas con duplicaciones o deleciones distintivas de los individuos aneuploides nacidos vivos.

3) Investigar si existen diferencias genómicas del tipo CNV y segmentos largos contiguos de homocigosidad (LCSH) entre los individuos sanos y los individuos con aneuploidías.

7. METODOLOGÍA

Clasificación de la investigación: Estudio de tipo comparativo por su finalidad, transversal en su secuencia temporal, observacional por no asignar factores y prospectivo en su fuente de datos.

7.1 POBLACION DE ESTUDIO.

- Tejidos de abortos espontáneos (AE), diagnosticados con las aneuploidias estudiadas provenientes de los laboratorios de Genética del INPer, el Laboratorio DIAGEN, Hospital ABC y la Unidad de Genética Aplicada, Hospital Ángeles Lomas, por un periodo de 24 meses.
- Nacidos vivos (NV) con las aneuploidías mencionadas, del INP y de las instituciones antes mencionadas durante el mismo período.
- Se incluyeron donadores sanos como controles para establecer un punto de corte a partir del cual se consideren los mosaicos.

Todos ellos con origen Mestizo Mexicano, considerado así cuando padres y abuelos sean de origen mexicano, demás con aprobación de los comités de investigación y ética de las respectivas instituciones participantes.

7.2 TAMAÑO DE LA MUESTRA.

Al no haber más antecedentes relacionados con nuestra búsqueda y no contar con datos previos, el tamaño de muestra de este protocolo no fue posible calcularlo y será definido a conveniencia. Por la frecuencia histórica en los laboratorios participantes, se calcula que es posible obtener una población de un mínimo de 10 abortos y 10 pacientes de cada una de las aneuploidías (40 nacidos vivos aneuploides) para un total 80 muestras con aneuploidía y 12 muestras de sujetos fenotípicamente sanos y con cariotipo normal como controles.

7.3 CRITERIOS

7.3.1. Criterios de inclusión

- Donadores fenotípicamente sanos, sin alteraciones por cariotipo con bandas GTG.
- Nacidos vivos con cuadro clínico de síndromes de: Edwards, Patau, Down o Turner, y que por cariotipo en sangre periférica se compruebe la condición trisómica 13, 18, 21 o monosómica para X.
- Abortos espontáneos de 20 semanas de gestación o menores, con trisomía 13, 18, 21 o monosomía X, detectado por cariotipo convencional con bandas GTG.
- Que donadores y padres de pacientes acepten participar en el estudio mediante la firma de una carta de consentimiento informado.

7.3.2 Criterios de exclusión

- Se excluirán los casos en los que no se logre obtener la muestra de tejido o DNA adecuada para el estudio.
- Se excluirán temporalmente aquellos nacidos vivos con cuadro clínico de síndromes de: Edwards, Patau, Down o Turner, que hayan sido transfundidos en los últimos tres meses.

- Aquellos pacientes /padres que decidan salir del estudio en cualquier momento de este.

7.3.3 Criterio de Eliminación

-Se eliminarán aquellos casos que, al realizar los estudios de acuerdo a la metodología aplicada, les sean detectadas otras alteraciones cromosómicas diferentes a las involucradas en este estudio.

7.4 ESTRATEGIA DE ESTUDIO

Este proyecto se enfocó a investigar tres aspectos genéticos que pueden influir en la letalidad o supervivencia de los fetos: a) Mosaicismo, detectado mediante hibridación in situ con fluorescencia en células en interfase (iFISH); b) detección de desbalances genómicos (duplicaciones/deleciones), que se realizarán en dos pasos, el primero con aCGHs, de “pools” de DNAs de tejidos de diferentes individuos con la misma aneuploidía, utilizando DNA de abortos vs nacidos vivos y c) búsqueda de manera individual, de variantes genómicas de tipo CNV, con microarreglos de alta resolución: SNPs 6.0. Affimetrix.

Para tal efecto se trabajó con tres grupos de estudio: donadores sanos, para establecer el punto de corte de nuestra metodología; nacidos vivos y tejido de aborto espontáneo con trisomías de los cromosomas 13, 18 y 21 así como monosomía 45,X, identificadas previamente por cariotipo convencional con Bandeó GTG (Figura 1)

Se solicitaron de 4 a 6ml de sangre periférica y raspado de mucosa bucal a los pacientes nacidos vivos (NV) con aneuploidía. Éstas muestras se procesaron para cosecha directa para iFISH y extracción de DNA. Tejidos de abortos espontáneos (AE) que posean las alteraciones cromosómicas, antes mencionadas para iFISH.

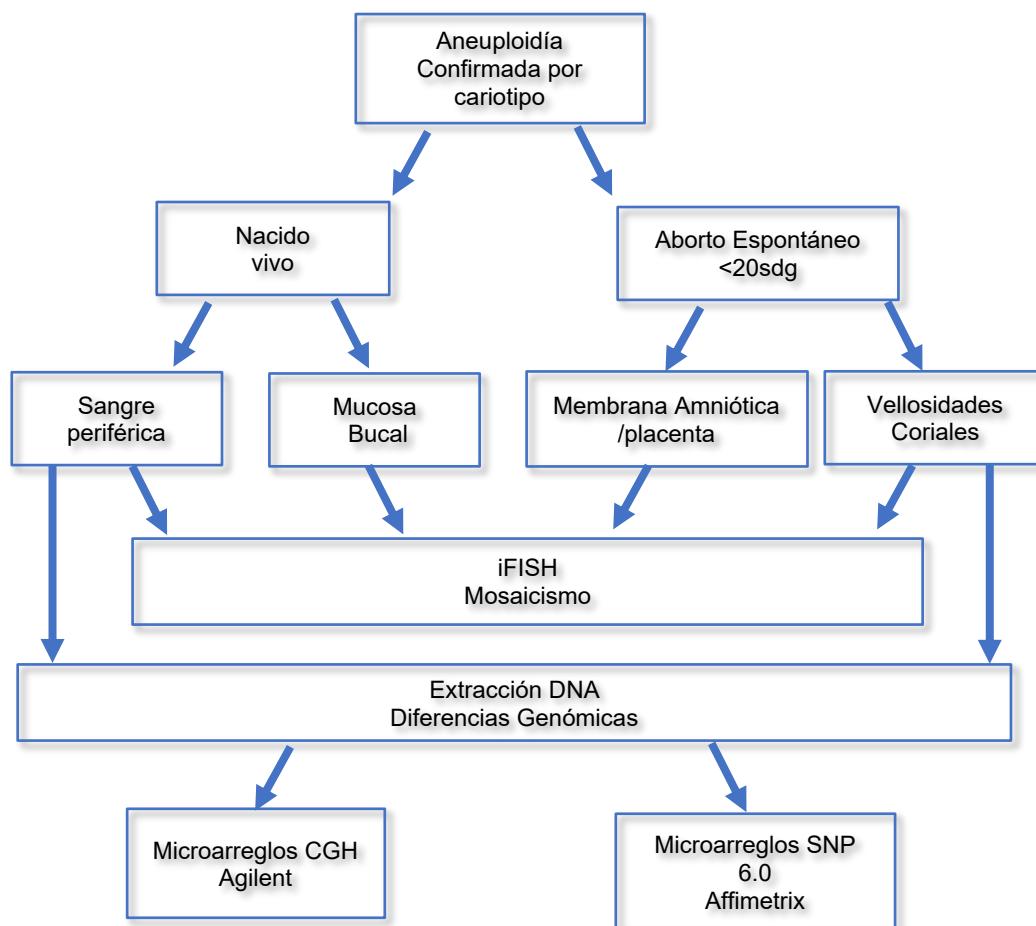


Figura 1. Estrategia de estudio

7.4.1 Mosaicismo.

Para alcanzar el primer objetivo específico, presencia y porcentaje de mosaicismo, se realizó una búsqueda intencionada de una línea celular normal con la técnica de iFISH en células de dos diferentes tejidos de origen embrionario diferente: Linfocitos de sangre periférica (SP) de origen endodérmico y células epiteliales de descamación de la mucosa bucal (MB) de origen ectodérmico en los individuos nacidos vivos. Para los tejidos de Aborto espontáneo, en los casos que nos fue posible se analizaron dos tejidos: vellosidades coriales (VC), membrana amniótica (MA) o placenta (PL) (Figura 1).

Para esto se realizó un análisis con iFISH en ensayos de doble/triple color con las sondas específicas para la detección de los cromosomas involucrados en las

trisomías en estudio (LSI13, CEP18 y LSI21), sonda para el centrómero del cromosoma X (CEP X). Se analizaron al menos 1000 células (en los casos con suficiente material) por cada ensayo.

7.4.1.1 Cosecha directa de Tejidos.

Para linfocitos y células de aborto: se colocó 1ml de SP o las células obtenidas del cultivo de aborto, en 7ml de solución hipotónica KCl 0.075M, y se incubaron por 20min a 37°C

Para células de MB: se realizó el raspado de la parte interna de las mejillas y se colocaron las células en solución isotónica. Se centrifugó a 1500rpm por 10min y se retiró el sobrenadante (SN). Se agregaron 3ml de una solución de Lisozima (2mg/ml) y se incubaron a 37°C, por 20min. Después de este tiempo se centrifugó la muestra, se eliminó el SN y se agregaron 3ml tripsina/EDTA (0.25%). Nuevamente se incubó 20min a 37°C.

Se centrifugó la muestra, se eliminó el SN y se agregaron 5ml de solución hipotónica de citrato de sodio (tri-sodio citrato 2-hidrato, Merck) al 0.8%, precalentada a 37° C, incubando 20min a 37°C.

Para todos los tipos celulares: Una vez incubados con la solución hipotónica especificada, se realizó una fijación agregando 1ml de solución fijadora de Carnoy (metanol:ácido acético, 3:1), resuspendiendo por inversión.

Se centrifugaron las muestras, eliminó el SN y se resuspendieron para agregar 8ml de solución de Carnoy se centrifugó y retiró el SN.

Se realizaron dos lavados más con Carnoy.

De todos los tejidos se realizaron laminillas por goteo y se prosigió a realizar el iFISH

7.4.1.2 Ensayos de hibridación *in situ* con fluorescencia en células en interfase (iFISH)

Esta técnica se basa principalmente en la desnaturalización de un fragmento de DNA conocido, marcado con fluorocromo, al que llamamos SONDA (comercial ABBOTT, Vysis), y del DNA blanco de las células a analizar (de los sujetos de estudio). Una vez abiertas las dobles cadenas se ponen en contacto entre sí para formar una cadena híbrida por interacciones Watson-Crick, de DNA sonda-DNA blanco (Del Castillo *et al.* 2019).

Las laminillas se maduraron durante 30 min en 2 X SSC a 37°C y posteriormente se deshidrataron en alcoholes graduales (Etanol 70, 85 y 100%).

Las laminillas con células epiteliales se trataron con pepsina (2mg/ml H₂O) diluída en 40ml de HCl 0.01N a 37°C por alrededor de 1 a 2 minutos (en linfos sólo 30seg), según se observe al microscopio de contraste de fases la integridad del núcleo celular y la cantidad de citoplasma. (0.1g Pepsina en 10ml-hacer alícuotas de 200ul). Las laminillas se fijaron con 100ul de solución de Formaldehído/MgCl (39ml PBS, 1ml formaldehído 37%, 0.18gr MgCl₂) por 10min, se lavaron en PBS nuevo por 10min y se deshidrataron en alcoholes graduales.

Una vez pretratada la laminilla, la sonda de DNA se colocó en un cubreobjetos, se selló para evitar evaporación y se calentó a 73°C por 2 minutos, si la sonda era LSI y 1min 30seg si la sonda era centromérica, para que ambos, el DNA "blanco" y la sonda se codesnaturalizaran. Posteriormente se incubaron las muestras en una cámara húmeda-oscura a 37°C durante la noche. Se realizaron lavados post-hibridación, según el protocolo del proveedor, se tiñeron con DAPI/ vectashield y se observaron al microscopio de fluorescencia.

Como control técnico para las trisomías, se aplicó otra sonda del mismo tipo que se use para la búsqueda de la alteración: ej, para trisomía 13 (LSI13) se usó como

control la sonda LSI21 (Tabla 2); para el estudio de las muestras 45,X se usó sonda para la detección de centrómeros CEPX y CEPY, y como control técnico CEP18. Se analizaron en un microscopio de fluorescencia 1000 células en interfase por muestra. En los casos de abortos femeninos que sean positivos con FISH para mosaicismo, se descartó contaminación materna o microquimerismo materno mediante el estudio de microarreglos con la salvedad de que sólo detecta mosaicismo de 20% o superior (Hoang *et al.* 2011)

Tabla 2. Ensayos usados para la detección y evaluación del mosaicismo en cada una de las aneuploidías estudiadas.

Aneuploidía	Sonda blanco	Sonda control	Ensayo Color
45, X	CEP X (verde)+CEP Y (rojo)	CEP 18 (aqua)	Triple
Trisomía 13	LSI 13 (verde)	LSI 21 (rojo)	Doble
Trisomía 18	CEP 18 (aqua)	CEP X (verde)+CEP Y (rojo)	Triple
Trisomía 21	LSI 21 (rojo)	LSI 13 (verde)	Doble

7.4.2 Diferencias genómicas.

Para cubrir los objetivos de detectar los desbalances genómicos ya sean duplicaciones/delecciones y la búsqueda de variantes del genoma del tipo CNV, se realizó el análisis en DNA genómico de tejidos de AE y NV. Para esto se realizó la extracción de DNA genómico de SP de NV y de tejidos provenientes de los AE con las aneuploidías seleccionadas.

7.4.2.1 Extracción de DNA.

Este proceso se realizó con el kit de extracción de DNA, PUREGENE® de QIAGEN, con el protocolo del proveedor con algunas modificaciones.

Primero se lisaron los eritrocitos con dos lavados con solución de lisis de células rojas de 10 min cada uno, centrifugación a 4500rpm y eliminación de SN. Al botón de células blancas se le agregó solución de lisis celular, resuspendiendo el botón celular. En este paso se dejó hasta que la solución estuviera homogénea.

Para células de tejidos de AE, sólo se colocó el botón células en solución de lisis celular y a partir de aquí fue el mismo procedimiento para cualquier tipo celular. Se agregaron 15ul de RNAsa y se incubó 30min a 37°C, después se agregaron 10ul de proteinasa K y se incubó a 55°C por 2horas. Una vez frío, se agregó solución precipitadora de proteínas y esta mezcla se agitó en agitador (vortex) por 20 seg y se colocó en refrigeración por 5min. Se centrifugó por 10min a 4500rpm en frío y se retiró con mucho cuidado el SN, que es donde en este punto de la técnica, se encuentra el DNA. En otro tubo a este SN, se le agregaron 5ml de isopropanol para precipitar el DNA invirtiendo el tubo unas 20 veces hasta ver el DNA precipitado. Se centrifugó por 5min a 4500rpm, se retiró el SN y se agregó 5ml de etanol al 70% para lavar el botón de DNA. Se repitió la centrifugación y retiro del SN y se deja secar al aire por al menos una hora. La muestra se rehidrató con de 50-100ul de solución de hidratación y se mantuvo a 4°C hasta su uso.

7.4.2.2 Microarreglos de hibridación genómica comparativa (aCGH)

En un primer paso se realizaron aCGH (Agilent) los cuales se basan en la competencia de dos diferentes muestras de DNA, marcada cada una con un diferente fluorocromo, de tal manera que se encuentran diferencias genómicas de un genoma, con respecto al otro en competencia.

Se mezclaron DNAs de AE con una misma condición cromosómica y el DNA de competencia fue la mezcla DNAs de NV con la misma aneuploidía. Este primer procedimiento nos ayudó a detectar diferencias genéticas entre NV y AE con una misma condición cromosómica. Esta metodología se realizó bajo el protocolo del proveedor de Agilent para microarreglos en formato SurePrint 2x400k (https://www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/public/ARRAY-CGH_WORKSHOP_PROTOCOL.pdf).

Primero una digestión con un master mix que contiene enzimas de restricción Alu1 y Rsa1 para fragmentar 10ul DNA de NV y AE en diferentes viales. Después se realizó el marcaje de los DNA de NV con aneuploidía en verde (Cy5) y el de AE con la misma alteración en rojo (Cy3) usando una mezcla de dNTPs, cyanina (3 o 5) y DNA polimerasa Klenow. Se lavaron los excesos de marcaje y se prosiguió a hibridar en los microarreglos por toda la noche a 65°C, colocando ambos DNAs con diferente marcaje, más DNA Cot-1 que evita hibridación no específica, en la cámara de hibridación, asegurando muy bien la laminilla. Después el microarreglo se desensambla y se colocan en la estación de lavado para darle dos lavados en los tiempos provistos por el proveedor (5 minutos a temperatura ambiente y 1min a 37°C, respectivamente) con diferentes soluciones de lavado, que aseguran eliminar el exceso de los DNAs no hibridados. Posterior a esto la laminilla se escanea y el programa Feature Extraction (Agilent^R) es el encargado de extraer la información de las lecturas de los microarreglos que realiza el escáner, para su posterior análisis mediante el software CytoGenomics (Agilent^R), que ayuda a la detección de los cambios en el número de copias de las sondas incluidas en el arreglo.

7.4.2.3 Microarreglos Genome-Wide Human SNP Array 6.0

Para un segundo análisis en búsqueda de las diferencias genéticas se usaron microarreglos del tipo SNP 6.0 de Affimetrix, los cuales se basan en la hibridación del genoma en estudio con más de 1.8 millones de pequeñas sondas colocadas en el microarreglo, que ayudan a detectar pérdidas o ganancias de las mismas, así como evaluar polimorfismos de un sólo nucleótido (SNP) para evaluar regiones con pérdida de heterocigocidad ó LSCH Las principales las diferencias detectadas con aCGH, y el resto de las que se encuentren de manera individual, se analizaron con los microarreglos de Affimetrix. El protocolo que se siguió para estos microarreglos es el propuesto por el fabricante (https://www.affymetrix.com/support/downloads/manuals/genomewidesnp6_manual.pdf), aquí una breve descripción:

El DNA genómico (500 ng) se procesó mediante el kit para los microarreglos Genome-Wide Human SNP Array 6.0 (Affimetrix). Se digirió con NspI o Styl y los fragmentos se ligaron a adaptadores que reconocen las 4 pb cohesivas. Todos los fragmentos resultantes de la digestión son sustratos para la ligación del adaptador. Se utilizó un cebador genérico que reconoce la secuencia adaptadora para amplificar los fragmentos de DNA ligados al adaptador, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las condiciones de PCR se optimizaron para amplificar preferencialmente fragmentos de 200 a 1,100 pb. Los productos de la amplificación por PCR se purificaron utilizando pequeñas cuentas de poliestireno.

El DNA amplificado se fragmentó, se marcó y se llevó a cabo su hibridación con el microarreglo SNP Array 6.0. Una vez terminada la hibridación (18 horas) se procedió a lavar los chips, para eliminar el sobrante de DNA, se continuó con la tinción de los chips para su posterior escaneo dentro de la plataforma y obtención de los datos. La

obtención de datos de control de calidad y para analizar el microarreglo, se realizó mediante el programa Genotyping Console™. El análisis de los mismos se llevó a cabo con Software especializado que provee de manera gratuita el distribuidor de Affymetrix llamado ChAS™ (Chromosome Analysis Suite), Una vez definidas las variantes encontradas se analizaron utilizando las bases de datos disponibles en la red como UCSC genome browser (<http://genome.ucsc.edu/>), Database of Genomic Variants (DGV, <http://projects.tcag.ca/variation/>), DECIPHER (<https://decipher.sanger.ac.uk>), Ref Seq, NCBI (GenBank, OMIM) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) Gene Ontology (<http://geneontology.org/>), miRBASE (<http://mirbase.org/>) y el programa miRANDA para predecir los RNAm que sean blancos probables de miRNAs (<http://www.microrna.org>).

7.5 ANALISIS ESTADISTICO

El análisis se apoyó con el software SPSS versión 29.0.1.0 en este programa se desarrolló la base de datos donde se capturaron los resultados obtenidos. Los resultados se presentaron mediante estadística descriptiva con medidas de tendencia central y de dispersión, así como pruebas de normalidad para las variables cuantitativas (proporción de células normales en mosaicos) y las variables cualitativas (presencia o no de mosaico). Para el análisis bivariado se realizó prueba de t de muestras independientes si la proporción de células normales del mosaico tienen distribución normal o en caso contrario, prueba de Kruskal-Wallis

8. RESULTADOS

8.1 MOSAICISMO

Al final del estudio obtuvimos un total de 12 muestras de sujetos sanos, 71 muestras de NV y 46 muestras de AE con las diferentes aneuploidías.

Para NV:

7 casos con trisomía 13

6 con trisomía 18

37 con trisomía 21

21 con monosomía X

Y para AE:

10 casos con trisomía 13

13 con trisomía 18

12 con trisomía 21

12 con monosomía X

Tanto en las muestras de sangre de nacidos vivos, como en los tejidos de abortos, se buscó de la presencia de una línea celular normal en células en interfase; SP y MB de los nacidos vivos y en VC, MA o PL de los abortos; para esto se usó iFISH en ensayos de doble o triple color con las sondas específicas para la detección de los cromosomas involucrados en las trisomías en estudio (LSI13, CEP18 y LSI21), sonda para el centrómero del cromosoma X (CEP X). (Tabla 2, Figura 2)

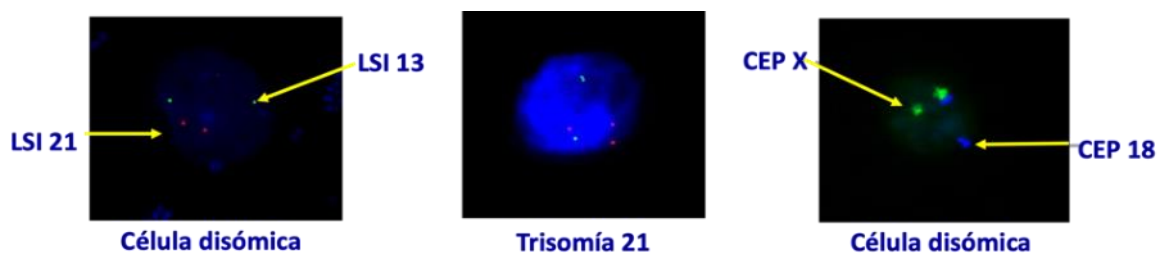


Figura 2. Células en interfase hibridadas con sondas centroméricas CEP18, locus específicos LSI13, LSI21 y CEPX, CEPY (Aneuvysion, Vysis).

8.1.1 Frecuencias basales de aneuploidía en individuos sanos.

Se analizaron 12 individuos sanos con los dos diferentes ensayos de iFISH para calcular el porcentaje basal de aneuploidías en individuos sanos, este dato es muy importante para establecer un valor de corte y poder identificar los mosaicos celulares (Tabla 3). De éstas se calculó el promedio, al cual se le sumaron 3 veces la desviación estándar de los datos (0.26 ± 0.12 células aneuploides para el ensayo con las sondas X,Y,18; y 0.16 ± 0.18 para el ensayo con sondas 13, 21) y este último dato se tomó como valor de corte, a partir del cual se consideraron los mosaicos celulares. Se determinó como valor de corte para el análisis de FISH: **>1% de células disómicas**. Este valor se calculó con laminillas con una eficiencia de hibridación mayor al 98% (Yurov *et al.* 2007, Vorsanova *et al.* 2010), por lo que los criterios de análisis de FISH fueron estrictos y adecuados para detectar los verdaderos mosaicos.

Tabla 3. Ensayos de FISH en linfocitos en interfase de individuos sanos Cálculo de frecuencias basales.

ENSAYO	X, Y, 18		% Aneuploide	13, 21		% Aneuploide	
	ID	TOTAL			TOTAL		
1	CTRV1	XX,18	3	0.3	13x3, 21x2	1	0.12
		Disómicas	997		Disómicas	828	
2	CTRV4	XX,18	5	0.5	13x3, 21x2	1	0.1
		Disómicas	796		Disómicas	999	
3	CTRV5	XX,18	2	0.2	13x3, 21x2	1	0.1
		Disómicas	998		Disómicas	999	
4	CTRV6	XX,18x3	1	0.17	Aneuploides	0	0
		Disómicas	566		Disómicas	700	
5	CTRV7	XX, 18	2	0.2	13, 21x2	2	0.2
		Disómicas	998		Disómicas	998	
6	CTRV85	XX,YY18x2	1	0.2	Aneuploide	0	0
		Disómicas	500		Disómicas	500	
7	CTRV35	XY, 18x3	1	0.4	13x3, 21x2	1	0.1
		XYY,18x2	1				
		Disómicas	498		Disómicas	999	

8	CTRNV34	Aneuploide	0	0	13X2, 21X3	3	0.6
		Disómicas	1000		Disómicas	497	
9	CTRNV8	XX, 18	2	0.3	13x3, 21x2	1	0.1
		X, 18x2	1				
		Disómicas	997		Disómicas	999	
10	CTRNV9	XX,18x3	2	0.2	Aneuploide	0	0
		Disómicas	998		Disómicas	1000	
11	CTRNV10	XX, 18	2	0.3	13x3, 21x2	2	0.4
		X, 18x2	1		13, 21x2	2	
		Disómicas	997		Disómicas	996	
12	CTRNV15	XX, 18	2	0.3	13x2, 21x3	2	0.23
		X, 18x2	1				
		Disómicas	997		Disómicas	873	
PROM±DS				0.26±0.12			0.16±0.18

8.1.2 Mosaicismo en Nacidos vivos.

De manera general, al terminar el análisis de las muestras de NV con iFISH se encontró mayor cantidad de células disómicas en los tejidos epiteliales en comparación de las encontradas en SP ($p=0.031$). Al ver si hay diferencias entre las aneuploidías estudiadas, la presencia de células disómicas fue mayor para la trisomía 18, sin importar el tejido estudiado ($p<0.004$), seguido por los casos de trisomía 21.

Trisomía 13

Se captaron 7 muestras de NV con trisomía 13, de éstas sólo se logró obtener dos muestras de células epiteliales de descamación de mucosa bucal. En las muestras de sangre periférica no se encontró mosaicismo sin embargo en una de la muestra de células epiteliales del caso NV56T13 se presentó un 3.1% de mosaico con células normales (Tabla 4).

Tabla 4. FISH en pacientes con síndrome de Patau en uno o dos tejidos

n	ID	HALLAZGO	SANGRE PERIFERICA		EPITELIALES	
			TOTAL	RESULTADO	TOTAL	RESULTADO
1	NV4t13	Aneuploides	1000	NO MOSAICO	328	NO MOSAICO
		Disómicas	0		2	
2	NV56T13	Aneuploides	996	NO MOSAICO	996	3.1% MOSAICO
		Disómicas	3		32	
		13x3,21x3	10		1	
3	NV255T13	Aneuploide	1098	NO MOSAICO	1010	NO MOSAICO
		Disómica	5		6	
		13x3,21x3	2			
		13x4,21x4	1			
		13x6,21x4	1			
4	NV14t13	Aneuploides	1524	NO MOSAICO	ND	
		Disómicas	1			
5	NV20t13	Aneuploides	1003	NO MOSAICO	ND	
		13x5,21x5	1			
6	NV71T13	Aneuploides	497	NO MOSAICO	ND	
		Disómicas	3			
7	NV254t13	Aneuploide	992	NO MOSAICO	ND	
		Disómica	8			

13x3= x3 significa tres señales del 13; x5, 5 señales

Trisomía 18.

De esta alteración se obtuvieron seis muestras de NV, en todos hubo mosaico con células disómicas normales; en dos pacientes se observó mosaicismo tanto en linfocitos como en células epiteliales: NV24T18, leucocitos 24.3% y 39.2% en células epiteliales; NV96T18, leucocitos 23% y 2.9% en epiteliales. Tres casos en los que sólo se estudiaron linfocitos, en uno de ellos (NV53T18) hay 2% de células disómicas, otro con 4.7% (NV62T18) y en otro 1.3% (NV70T18); en el caso restante sólo se estudiaron células epiteliales y en ellas hay un 14.9% de células disómicas (Tabla 5).

Tabla 5. FISH en pacientes con síndrome de Edwards en uno o dos tejidos

n	ID	HALLAZGO	SANGRE PERIFÉRICA		EPITELIALES	
			TOTAL	RESULTADO	TOTAL	RESULTADO
1	NV24T18	Aneuploides	839	24.3% MOSAICO	248	39.2% MOSAICO
		Disómicas	269		160	
2	NV96T18	Aneuploides	80	23% MOSAICO	48	2.9% MOSAICO
		Disómicas	24		20	
3	NV53T18	Aneuploides	1236	2% MOSAICO	ND	
		Disómicas	25			
4	NV62T18	Aneuploides	953	4.7% MOSAICO	ND	
		Disómicas	47			
5	NV70T18	Aneuploides	985	1.3% MOSAICO	ND	
		Disómicas	13			
		18x1, Xx2	1			
		18x3,Xx3	1			
6	NV247T18	Aneuploide	ND		57	1.49% MOSAICO
		Disómica			10	

18x3= x3 significa tres señales del 18; x2, 2 señales

Trisomía 21.

La frecuencia de nacidos vivos con síndrome de Down es mucho mayor que la de las trisomías 13 y 18, por lo mismo se tienen muestras (SP y MB) de 37 pacientes con este síndrome: 7 tuvieron mosaicismo en ambos tejidos analizados, en 17 sólo se evidenciaron células disómicas para el cromosoma 21 en células epiteliales y no en linfocitos, 4 pacientes más sólo presentaron mosaico en linfocitos y en 9 sujetos no hubo hallazgo de mosaicismo. El porcentaje de células normales fue variable en cada uno de los pacientes, en un rango del 1.2% hasta el 98% de células disómicas (Tabla 6).

Tabla 6. FISH en pacientes con síndrome de Down en dos tejidos

n	ID	HALLAZGO	SANGRE PERIFÉRICA		EPITELIALES	
			TOTAL	RESULTADO	TOTAL	RESULTADO
1	NV131t21	Aneuploides	998	NO MOSAICO	236	NO MOSAICO
		Disómicas	3		0	
		13x1, 21x3	1		8	
2	NV181t21	Aneuploides	1503	NO MOSAICO	115	45.5% MOSAICO
		Disómicas	0		96	
		13x2, 21x4	2			
3	NV27T21	Aneuploides	1003	NO MOSAICO	1000	NO MOSAICO
		Disómicas	5		0	
		13x3, 21x3	1			
4	NV32t21	Aneuploides	1521	NO MOSAICO	76	NO MOSAICO
		Disómicas	4		1	
5	NV35T21	Aneuploides	1499	NO MOSAICO	37	5.4 MOSAICO
		Disómicas	1		2	
		13x1, 21x3	1		0	
6	NV38T21	Aneuploides	993	NO MOSAICO	369	NO MOSAICO
		Disómicas	6		4	
7	NV46t21	Aneuploides	499	NO MOSAICO	877	2.3% MOSAICO
		Disómicas	0		26	
8	NV48T21	Aneuploides	1480	1.2% MOSAICO	92	22.7% MOSAICO
		Disómicas	18		27	
9	NV138t21	Aneuploides	987	1.3% MOSAICO	535	NO MOSAICO
		Disómicas	13		4	
		13x4, 21x6	0		1	
10	NV139t21	Aneuploides	995	NO MOSAICO	1000	NO MOSAICO
		Disómicas	5		10	
11	NV140t21	Aneuploides	993	NO MOSAICO	494	2.3% MOSAICO
		Disómicas	7		12	
12	NV142T21	Aneuploides	998	NO MOSAICO	755	1.3% MOSAICO
		Disómicas	10		10	
		13x1, 21x3	1		0	
13	NV143T21	Aneuploides	995	NO MOSAICO	1025	1.3% MOSAICO
		Disómicas	4		14	
		13x1, 21x3	0		1	
		13x3, 21x5	0		1	
		13x4, 21x6	1		0	
		13x3, 21x3	1		0	
14	NV144t21	Aneuploides	995	NO MOSAICO	248	NO MOSAICO
		Disómicas	5		0	
		13x4, 21x6	0		2	
		13x1, 21x3	1		0	
15	NV145T21	Aneuploides	1026	NO MOSAICO	1087	NO MOSAICO
		Disómicas	7		12	
		13x3, 21x3	2		2	
		13x1, 21x3	0		2	
		13x4, 21x6	0		1	
16	NV147t21	Aneuploides	1454	2.6% MOSAICO	972	3.8% MOSAICO

		Disómicas	40		38	
		13x3, 21x3	0		1	
		13x4, 21x6	0		1	
		13x2, 21x4	0		1	
		13x2, 21x1	5		0	
17	NV151T21	Aneuploide	505	49% MOSAICO	824	16.2% MOSAICO
		Disómica	490		162	
		13x2, 21x1	4		6	
		13x4, 21x6	1		6	
		13x3, 21x5	0		1	
		13x2, 21x6	0		1	
18	NV152T21	Aneuploide	959	4% MOSAICO	1077	NO MOSAICO
		Disómica	40		7	
		13x3, 21x3	0		1	
		13x2, 21x1	1		0	
19	NV155T21	Aneuploide	991	NO MOSAICO	987	NO MOSAICO
		Disómica	6		9	
		13x2, 21x1			3	
		13x2, 21x5			1	
		13x4, 21x6	3		0	
20	NV161T21	Aneuploides	1040	NO MOSAICO	494	NO MOSAICO
		Disómicas	11		3	
		13x3, 21x3	3		1	
		13x1, 21x3	1		1	
		13x1, 21x1	1		1	
21	NV163T21	Aneuploide	1012	3.4% MOSAICO	1123	1.5% MOSAICO
		Disómica	36		17	
		13x1, 21x3	1		2	
		13x3, 21x3	2		0	
		13x2, 21x4	2		0	
22	NV164t21	Aneuploide	992	NO MOSAICO	987	1.7% MOSAICO
		Disómica	8		17	
		13x4, 21x6	0		4	
		13x2, 21x1	0		2	
23	NV168T21	Aneuploides	998	2.16% MOSAICO	974	NO MOSAICO
		disómicas	22		9	
		13x4, 21x6	0		11	
		13x2, 21x1	0		6	
24	NV175T21	Aneuploide	976	NO MOSAICO	980	1.8% MOSAICO
		Disómica	8		18	
		13x2, 21x1	6		1	
		13x4, 21x6	13		1	
		13x1, 21x3	1			
25	NV179T21	Aneuploide	993	NO MOSAICO	269	1.7% MOSAICO
		Disómica	7		5	
		13x6, 21x6	0		8	
		13x2, 21x1	0		3	
		13x2, 21x4	0		1	
26	NV180t21	Aneuploides	985	1.5% MOSAICO	975	NO MOSAICO

		Disómicas	15		8	
		13x4, 21x6	0		16	
		13x2, 21x1	0		1	
27	NV181T21	Aneuploide	991	NO MOSAICO	975	2.1% MOSAICO
		Disómica	8		21	
		13x4, 21x6	1		2	
		13x2, 21x1	0		2	
28	NV219t21	Aneuploide	993	NO MOSAICO	981	1.8% MOSAICO
		Disómica	7		18	
		13x1, 21x2	0		1	
29	NV222T21	Aneuploide	348	64.5% MOSAICO	965	2.5% MOSAICO
		Disómica	645		25	
		13x4, 21x6	0		9	
		13x2, 21x1	5		1	
		13x4, 21x4	2	0		
30	NV227t21	Aneuploide	14	98.1% MOSAICO	179	81.7% MOSAICO
		Disómica	981		817	
		13x2, 21x1	5		3	
		13x3, 21x2	0		1	
31	NV228T21	Aneuploide	1991	NO MOSAICO	970	2% MOSAICO
		Disómica	8		20	
		13x4, 21x6	0		6	
		13x2, 21x1	4		4	
32	NV231t21	Aneuploide	992	NO MOSAICO	962	3.6% MOSAICO
		Disómica	7		36	
		13x4, 21x6	0		1	
		13x2, 21x1	1		1	
33	NV235T21	Aneuploide	995	NO MOSAICO	962	2.8% MOSAICO
		Disómica	5		28	
		13x4, 21x6	0		8	
		13x2, 21x1	0		2	
34	NV237t21	Aneuploide	993	NO MOSAICO	983	1.5% MOSAICO
		Disómica	6		15	
		13x2, 21x1	1		1	
		13x1, 21x3	0		1	
35	NV238t21	Aneuploide	939	5.7% MOSAICO	971	2.7% MOSAICO
		Disómica	57		27	
		13x4, 21x6	3		2	
		13x2, 21x1	1			
36	NV239T21	Aneuploide	1253	NO MOSAICO	949	4.7% MOSAICO
		Disómica	11		47	
		13x2, 21x1	1		0	
		13x4, 21x6	0		4	
37	NV241T21	Aneuploide	987	NO MOSAICO	475	4.6% MOSAICO
		Disómica	5		23	
		13x2, 21x1	0		2	
		13x4, 21x6	2		0	
		13x2, 21x4	8		0	

21x3= x3 significa tres señales del 21; x6, 6 señales

Monosomía X

Se capturaron muestras de 21 pacientes con monosomía X (SP y MB). Se encontró mosaico celular en nueve nacidas vivas (42.8%). Siete de ellas mostraron mosaico en ambos tejidos analizados: Cuatro casos, por cariotipo con bandas G evidenciaron mosaico con un isocromosoma del cromosoma X: la paciente NV36X0 tuvo un 39% y 51.6% de células normales en linfocitos y células epiteliales respectivamente; NV249X0 Y NV263X0 presentaron arriba del 65% de población celular disómica para el cromosoma X, en ambos tejidos. El caso NV272X0 mostró un mosaico con una señal en el 35.2%, dos señales en el 33.5%, y tres señales en el 31.15%, siendo la línea trisómica correspondiente al cromosoma X normal más dos señales de un cromosoma isodicéntrico X con sus dos centrómeros presentes; la línea con una señal correspondiente a células 45,X y las células con dos señales, la línea con solo el isocromosoma.

Dos casos más mostraron mosaicos bajos que van de 1.3 a 2.2% (NV250X0 y NV251X0) y los últimos dos mostraron 1.1 y 1.2% de células disómicas, sólo en células epiteliales y no en linfocitos (NV261X0 Y NV269X0) (Tabla 7).

Un caso interesante fue el NV47X0, en el cual al hacer el análisis en las células epiteliales se encontró 80.8% aneuploides X, 4.12% disómicas XX y 13.5% disómicas XY; mientras que en linfocitos se encontraron 497 células disómicas XY, tres con un solo dominio del X, y una célula con tres dominios XYY, este caso se eliminó para este trabajo y mereció estudiarse a profundidad (Sevilla-Montoya *et al.* 2021).

Tabla 7. FISH en pacientes con síndrome de Turner en dos tejidos

n	ID	HALLAZGO	SANGRE		EPITELIALES	
			TOTAL	RESULTADO	TOTAL	RESULTADO
1	NV10X0	Aneuploide	1001	NO MOSAICO	690	NO MOSAICO
		Disómica	0		1	
2	NV19X0	Aneuploides	1429	NO MOSAICO	326	NO MOSAICO
		Disómicas	14		2	
3	NV28X0	Aneuploides	1509	NO MOSAICO	316	NO MOSAICO
		Disómicas	0		0	
		18x1, Xx1	0		2	
4	NV29X0	Aneuploides	1220	NO MOSAICO	234	NO MOSAICO
		Disómicas	0		2	
5	NV31X0	Aneuploides	1000	NO MOSAICO	260	NO MOSAICO
		Disómicas	0		0	
6	NV34X0	Aneuploides	999	NO MOSAICO	652	NO MOSAICO
		Disómicas	1		1	
7	NV36X0	Aneuploides	809	39% MOSAICO	464	51.6% MOSAICO
		Disómicas	525		562	
		Trisómica	9		4	
		Tetraploide			1	
8	NV40X0	Aneuploides	1511	NO MOSAICO	501	NO MOSAICO
		18x1, Xx1	0		2	
		18x2	0		2	
		18x2, Xx1	3			
9	NV47X0	Aneuploides X	3	Aneuploides X	294	80.80%
		Disómicas XY	497	Disómicas XX	15	4.12% MOSAICO
		Trisómica XYY	1	Disómicas XY	49	13.50%
				Trisómica XXY	6	1.60%
10	NV60X0	Aneuploides	1000	NO MOSAICO	497	NO MOSAICO
		Disómicas	0		1	
		18x1, Xx1			2	
11	NV158X0	Aneuploide	999	NO MOSAICO	496	NO MOSAICO
		Disómica	0		1	
		18x1, Xx1	1		3	
12	NV249X0	Aneuploide	127	86.8% MOSAICO	163	83.3% MOSAICO
		Disómica	868		833	
		Tetraploide	0		1	
		18x1, Xx2	4		0	
		18x1, Xx1	1		2	
		18(4).X(4)			1	
13	NV250X0	Aneuploide	983	1.3% MOSAICO	983	1.1% MOSAICO
		Disómica	13		11	
		18x1, Xx1	2		5	
		18x4, Xx2	2		1	
14	NV251X0	Aneuploide	987	1.2% MOSAICO	976	2.2% MOSAICO
		Disómica	12		22	
		18x1, Xx1	1		2	
15	NV261X0	Aneuploide	997	NO MOSAICO	985	1.1% MOSAICO
		Disómica	0		11	

		18x1, Xx1	3		4	
16	NV263X0	Aneuploide	326	67.4% MOSAICO	321	67.6% MOSAICO
		Disómica	672		676	
		18x4, Xx4	3		3	
17	NV269X0	Aneuploide	988	NO MOSAICO	984	1.2% MOSAICO
		Disómica	9		12	
		18x1, Xx1	3		0	
		18x2, Xx4	0		4	
18	NV271X0	Aneuploide	994	NO MOSAICO	492	NO MOSAICO
		Disómica	0		5	
		18x1, Xx1	4		3	
		18x4, Xx4	1		0	
		18x4, Xx2	1		0	
19	NV272X0	Aneuploide	356	MOSAICO	144	MOSAICO
		Disómica	339	33.5% disómicas	188	37.6% disómica
		18x2, Xx3	213	21% trisómicas	119	23.8% trisómica
		18x2, Xx2Gde y chica	102	10% disómica	49	9.8% disómica
		18x4, Xx6	1	con gde=pb tris		con gde=pb tris
20	NV273X0	Aneuploide	988	NO MOSAICO	493	NO MOSAICO
		Disómica	8		0	
		18x1, Xx2	3		0	
		18x1, Xx1	1		6	
		18x4, Xx2	0		1	
21	NV279X0	Aneuploide	997	NO MOSAICO	989	NO MOSAICO
		Disómica	1		5	
		18x1, Xx1	2		6	

Rojo. Casos con isocromosoma Xq

Verde. Caso eliminado por presentar alteración cromosómica diferente a la estudiada
18x4= x4 significa cuatro señales del cromosoma 18; **Xx2**, 2 señales del X.

8.1.3 Búsqueda de mosaicismo en Abortos Espontáneos

En los casos que se obtuvieron dos diferentes tejidos del aborto se realizó la búsqueda de mosaicismo en ambos para determinar si el mosaicismo está confinado a un tejido específico. Se capturaron 47 casos de AE con aneuploidías: 10 casos con trisomía 13 (13 tejidos), 13 con trisomía 18 (14 tejidos), 12 abortos con trisomía 21 (13 tejidos) y 16 tejidos de 14 abortos con cariotipo 45,X (Tabla 8). No se encontraron diferencias estadísticas en cuanto a la presencia de mosaicos entre tejidos, en los casos en los que se logró estudiar más de un tejido ($p > 0.05$).

Tabla 8. Presencia de mosaicos encontrados en las muestras procesadas con iFISH Nacidos Vivos y Abortos Espontáneos de cada una de las aneuploidías.

	NO MOSAICOS	MOSAICOS (%)
TRISOMIA 13		
Nacidos vivos (n=7)	6	1* (14.3)
Aborto Espontáneo (n=10)	3	7 (70)
TRISOMIA 18		
Nacidos vivos (n=6)	0	6 (100)
Aborto Espontáneo (n=13)	1	12 (92.3)
TRISOMIA 21		
Nacidos vivos (n=37)	10	27 (73)
Aborto Espontáneo (n ^º =12-1)	8	3 ^º (27.3)
MONOSOMIA X		
Nacidos vivos (n=21)	12	9 (42.8)
Aborto Espontáneo (n=12)	5	7 (58.3)
Total Nacidos Vivos (n=71)	28	43 (60.6)
Total Aborto Espontáneo (n=46)	17	29 (63)

*Detectado sólo en células epiteliales

^º se eliminó un caso que tuvo mosaico, pero no con células disómicas sino trisómicas en población tetrasómica

Trisomía 13

Se procesaron un total de 13 tejidos de 10 abortos espontáneos con trisomía 13; tres se estudiaron en dos diferentes tejidos (VC, MA y/o PL). Se encontró mosaico celular en 7 de los 10 abortos estudiados (70%), en los tres casos que tuvieron dos tejidos, el porcentaje de células disómicas fue variable entre tejidos: el caso AE18T13 mostró <90% de células disómicas en VC y sólo 16.8% en MA; el caso AE16T13 presentó únicamente el 1.66% de células disómicas para el cromosoma 13, sin embargo la placenta que también se estudió, no fue aneuploide ya que el 99% de sus células fueron disómicas; para el caso AE41T13 en VC se observó un mosaico de células disómicas bajo, 1.3%, mientras que en MA no hubo mosaicismo (0.4%). Los otros cuatro casos con mosaicismo tuvieron de 1.74 a 3.2% de células disómicas en la población aneuploide (Tabla 9).

Tabla 9. Abortos espontáneos con trisomía 13 analizados con FISH.

n	ID	HALLAZGO	TOTAL	RESULTADO
1	AE4T13	Aneuploides	1640	2.3% MOSAICO
		Disómicas	39	
2	AE10T13	Aneuploides	1685	NO MOSAICO
		Disómicas	10	
3	AE18T13 MA	Aneuploides	834	16.8% MOSAICO
		Disómicas	168	
3	AE18T13 VC	Aneuploides	99	90.5% MOSAICO
		Disómicas	939	
4	AE16t13 PL	Aneuploides	6	DISÓMICA NO MOSAICO
		Disómicas	1005	
		13x4 21x2	4	
4	AE16t13 VC	Aneuploides	997	ANEUPLOIDE 1.7% MOSAICO
		Disómicas	17	
		13x4 21x2	7	
5	AE41T13 VC	Aneuploides	980	1.3% MOSAICO
		Disómicas	13	
		13x4 21x2	5	
		13x6 21x6	18	
		13x4 21x4	1	
5	AE41T13 MA	Aneuploides	500	NO MOSAICO
		Disómicas	2	
6	AE42T13	Aneuploides	1148	3.2% MOSAICO
		Disómicas	38	
		13x4, 21x4	2	
		13x3, 21x3	1	
7	AE59T13	Aneuploides	918	2.6% MOSAICO
		Disómicas	26	
		13x5, 21x2	3	
		13x1, 21x2	2	
		13x6, 21x4	39	
		13x4, 21x4	9	
		13x4, 21x3	2	
		13x4, 21x2	4	
		13x6, 21x2	1	
		13x5, 21x3	1	
		13x3, 21x7	1	
		13x5, 21x4	1	
		9	AE17T13	
Disómicas	3			
13x3, 21x3	3			
13x4, 21x4	2			

		13x6, 21x4	15	
		13x5, 21x3	3	
		13x1, 21x2	1	
10	AE75t13	Aneuploides	779	1.7% MOSAICO
		Disómicas	14	
		13x4, 21x4	2	
		13x1, 21x2	1	
		13x3, 21x3	1	
		13x6, 21x4	8	

VC. Vellosidades Coriales, MA. Membrana Amniótica, PL. Placenta
 13x3= x3 significa tres señales del cromosoma 13; x5, 5 señales

Trisomía 18.

Se captaron 14 muestras de 13 abortos con trisomía 18. 12 de los 13 casos de AE con trisomía 18 estudiados tuvieron mosaicismo del 1.2% al 92.6% de células disómicas en el tejido con aneuploidía. En el único caso del cual se lograron analizar dos diferentes tejidos AE28T18, se encontró un 92.6% de células con disomía 18 en MA, mientras que en PL sólo hubo 10 células disómicas en 1017 células analizadas (0.98%) (Tabla 10).

Tabla 10. Abortos espontáneos con trisomía 18 analizados con FISH

n	ID	HALLAZGO	TOTAL	RESULTADO
1	AE28T18 MA	Aneuploides	70	92.6% MOSAICO
		Disómicas	957	
		18x2, Xx3	6	
	AE28T18 PL.	Aneuploides	1007	NO MOSAICO
		Disómicas	10	
2	AE20T18	Aneuploides	970	3.7% MOSAICO
		Disómicas	38	
3	AE23T18	Aneuploides	989	1.2% MOSAICO
		Disómicas	12	
		18x3, Xx3	2	
4	AE24T18	Aneuploides	1005	1.2% MOSAICO
		Disómicas	13	
		18x6, Yx2, Xx2	0	
5	AE19T18	Aneuploides	1115	3.8% MOSAICO
		Disómicas	46	

		18x3/, Yx1, Xx2	3	
6	AE31T18	Aneuploides	994	1.8% MOSAICO
		Disómicas	19	
		18x2, Xx2, Yx1	1	
7	AE33T18	Aneuploides	500	NO MOSAICO
		Disómicas	1	
8	AE57T18	Aneuploides	887	10.4% MOSAICO
		Disómicas	104	
		18x3, Xx3	2	
		18x3, Xx4	4	
		18x3, Xx1	1	
		18x2, Xx1	1	
		18x5, Xx4	1	
9	AE53T18	Aneuploides	477	4.9% MOSAICO
		Disómicas	25	
		18x6, Yx2, Xx2	3	
10	AE36T18	Aneuploides	950	9.2% MOSAICO
		Disómicas	93	
		18x4, Yx2, Xx2	2	
		18x3, Yx2, Xx1	2	
		18x1, Yx1, Xx1	7	
		18x3, Yx1, Xx2	1	
		Yx1, Xx1	1	
		18x3, Xx1	1	
		18x2, Yx1, Xx2	1	
		Yx1, Xx2	1	
		18x2, Yx2, Xx2	1	
11	AE80t18	Aneuploides	943	5.9% MOSAICO
		Disómicas	59	
		18x3, Yx1, Xx2	1	
		18x2, Yx2, Xx1	1	
		18x3, Yx2, Xx1	4	
12	AE81t18	Aneuploides	979	2.5% MOSAICO
		Disómicas	25	
		18x6, Xx4	3	
		18x3, Xx1	1	
		18x3, Xx4	1	
		18x1, Xx2	1	
		18x3, Xx3	2	
13	AE55t18	Aneuploides	471	2.2% MOSAICO
		Disómicas	22	
		18x4, Yx1, Xx1	3	
		Yx1, Xx1	1	

		18x3, Yx1, Xx2	1	
		18x1, Yx1, Xx1	1	
		18x5, Yx1, Xx1	1	

MA. Membrana Amniótica. PL. Placenta

18x4= x4 significa cuatro señales del cromosoma 18; Yx2= x2 dos señales del cromosoma Y

Trisomía 21.

Se trabajaron 12 casos de aborto espontáneo con trisomía 21, sólo de uno se obtuvieron dos diferentes tejidos VC y MA (AE25T21) y fue una de las 8 muestras que no mostraron mosaicismo con células disómicas. El caso AE8T21 (marcado en verde, Tabla 11) es un caso de aborto con tetrasomía del cromosoma 21, debido a una translocación robertsoniana der(14;21) y tres cromosomas 21 “libres” [47,XX,+21, t(14;21)(q10;q10)], este caso fue eliminado debido a que presentó tetrasomía (que no es parte de la aneuploidías en estudio) en el 95.4% de las células analizadas, la trisomía 21 está en el 4.2% de las células y sólo 0.1% de células normales, (Tabla 11).

Tabla 11. Abortos espontáneos con trisomía 21 analizados con FISH.

n	ID	HALLAZGO	TOTAL	RESULTADO
1	AE1T21	Aneuploides	1039	NO MOSAICO
		Disómicas	6	
		13x4, 21x6	25	
		13x4, 21x4	3	
		13x4, 21x5	3	
		13x3, 21x5	2	
2	AE2T21	Aneuploides	1061	2.6% MOSAICO
		Disómicas	29	
		13x4, 21x3	1	
		13x3, 21x3	1	
		13x2, 21x4	9	
3	AE5T21	Aneuploides	970	2.5% MOSAICO
		Disómicas	25	
		13x2, 21x4	4	
		13x3, 21x5	1	
4	AE25T21 MA	Aneuploides	1018	NO MOSAICO

		Disómicas	5	
		13x3, 21x3	4	
	AE25T21 VC	Aneuploides	1000	NO MOSAICO
		Disómicas	6	
5	AE40T21	Aneuploides	664	NO MOSAICO
		Disómicas	2	
6	AE21T21	Aneuploides	116	NO MOSAICO
		Disómicas	0	
7	AE8T21	Trisómica	39	MOSAICO DE TRISOMIA EN TETRASOMÍA
		Tetrasómicas	953	
		13x4, 21x8	5	
		13x3, 21x7	1	
		13x3, 21x5	1	
		Disómicas	1	
8	AE29T21	Aneuploides	959	NO MOSAICO
		Disómicas	3	
		13x2, 21x4	1	
		13x4, 21x6	7	
		13x3, 21x3	1	
9	AE58T21	Aneuploides	1015	3% MOSAICO
		Disómicas	32	
		13x3, 21x3	4	
		13x6, 21x6	5	
		13x2, 21x4	1	
		13x4, 21x2	1	
10	AE39T21	Aneuploides	969	NO MOSAICO
		Disómica	5	
		13x4, 21x4	4	
		13x2, 21x4	2	
		13x4, 21x6	19	
		13x3, 21x4	1	
		13x3, 21x3	2	
11	AE25T21 MA	Aneuploide	1015	NO MOSAICO
		Disómica	4	
		13x4, 21x4	2	
		13x4, 21x6	9	
		13x1, 21x3	2	
		13x3, 21x3	6	
12	AE59T21	Aneuploide	480	NO MOSAICO
		Disómica	5	
		13x3, 21x3	1	

		13x4, 21x6	13	
		13x2, 21x4	1	

VC. Vellosidades Coriales, MA. Membrana Amniótica

Verde. Caso eliminado por presentar alteración cromosómica diferente a la estudiada
 $13x4 = x4$ significa cuatro señales del cromosoma 13; $21x3 = 3$ señales del 21

Monosomía X

Se capturaron un total de 14 muestras de 12 abortos con cariotipo 45,X. De dos de ellos (AE12X0 Y AE14X0) se obtuvo VC y MA, del resto sólo un tejido. Se detectaron siete casos (58%) con mosaico celular en los que el porcentaje de células normales fueron $>1\%$: AE6X0 5%, AE7X0 5.6%, AE37X0 1.4% casi igual que los casos AE83X0 y AE77X0 1.1%, AE62X0 4.6% y el caso AE12X0 mostró células disómicas en ambos tejidos, en MA 10.8% y en VC 28%, presentando una ligera diferencia en cuanto a la proporción de células normales entre tejidos (Tabla 12).

Tabla 12. Abortos espontáneos con monosomía X analizados con FISH.

n	ID	HALLAZGO	TOTAL	RESULTADO
1	AE6X0	Aneuploides	1350	5% MOSAICO
		Disómicas	75	
		18x4, Xx2	75	
2	AE7X0	Aneuploides	1407	5.6% MOSAICO
		Disómicas	84	
		18x4, Xx2	9	
3	AE11X0	Aneuploides	1486	NO MOSAICO
		Disómicas	5	
		18x1, Xx1	2	
		18x4, Xx2	14	
4	AE12X0 MA	Aneuploides	1313	10.8% MOSAICO
		Disómicas	161	
		18x3, Xx1	5	
		18x3, Xx2	9	
		18x1, Xx1	1	
	AE12X0 VC	Aneuploides	928	28% MOSAICO
		Disómicas	363	
		18x3, Xx2	4	
5	AE14X0 VC	Aneuploides	998	NO MOSAICO

		18x3 Xx1	1	
		18x3 Xx2	1	
	AE14X0 MA	Aneuploides	1000	NO MOSAICO
		Disómicas	0	
6	AE37X0	Aneuploides	984	1.4% MOSAICO
		Disómicas	14	
		18x2, Xx1	2	
		18x4, Xx1	1	
		18x2, Yx1, Xx2	1	
		18x3, Xx1	1	
7	AE51X0	Aneuploides	499	NO MOSAICO
		Disómicas	1	
8	AE55X0	Aneuploides	500	NO MOSAICO
		Disómicas	0	
9	AE83X0	Aneuploides	952	1.1% MOSAICO
		Disómicas	11	
		18x4, Xx2	32	
		18x4, Xx1	1	
		18x3, Xx2	3	
		18x3, Xx1	1	
10	AE62X0	Aneuploides	487	4.6% MOSAICO
		Disómicas	25	
		18x4, Xx4	1	
		18x3, Xx1	1	
		18x4, Xx1	1	
		18x4, Xx2	1	
		18x3, Xx2	1	
11	AE67X0	Aneuploides	488	NO MOSAICO
		Disómicas	5	
		18x4, Xx2	3	
		18x3, Xx1	3	
		18x3, Xx2	1	
12	AE77X0	Aneuploides	1358	1.1% MOSAICO
		Disómicas	16	
		18x4, Xx2	1	
		18x1, Xx1	17	
		18x2, Xx3	1	
		18x2, Xx4	3	

VC. Vellosidades Coriales, MA. Membrana Amniótica

18x4= x4 significa cuatro señales del cromosoma 18; Xx2= 2 señales del X

8.1.4 Presencia de células disómicas (mosaicos) en Nacidos vivos vs Abortos espontáneos.

Para la búsqueda de mosaicismo de células disómicas o “normales” en tejidos aneuploides, se contó con un total de 71 nacidos vivos con aneuploidías, de los cuales, en 8 de ellos se tuvo sólo un tejido para estudiar por lo que analizamos 134 muestras. De la población estudiada, el 60.6% de las muestras captadas de NV, mostraron mosaico con células disómicas en uno o ambos tejidos estudiados. Para los tejidos de aborto se recibieron muestras de 46 casos, con 53 tejidos analizados, de los cuales el 63% presentaron mosaicismo. Un caso más de mosaico que se eliminó en esta evaluación, debido a que estaba fuera de nuestro objetivo, ya que fue un mosaico de células trisómicas del cromosoma 21 en una población tetrasómica debido a la presencia de una translocación der(14;21). En general no se encontraron diferencias significativas en la presencia de mosaico con células disómicas entre AE y NV (Figura 3).

En la población con trisomía 13, se observaron diferencias en el porcentaje de casos hallados con mosaico, siendo mayor el número de casos en los tejidos de AE (70% vs 14.3%), así como para el grupo con trisomía 21, donde se evidenciaron células disómicas en el 73% de los NV estudiados, mientras que sólo en el 27% de los tejidos de AE (Figura 3).

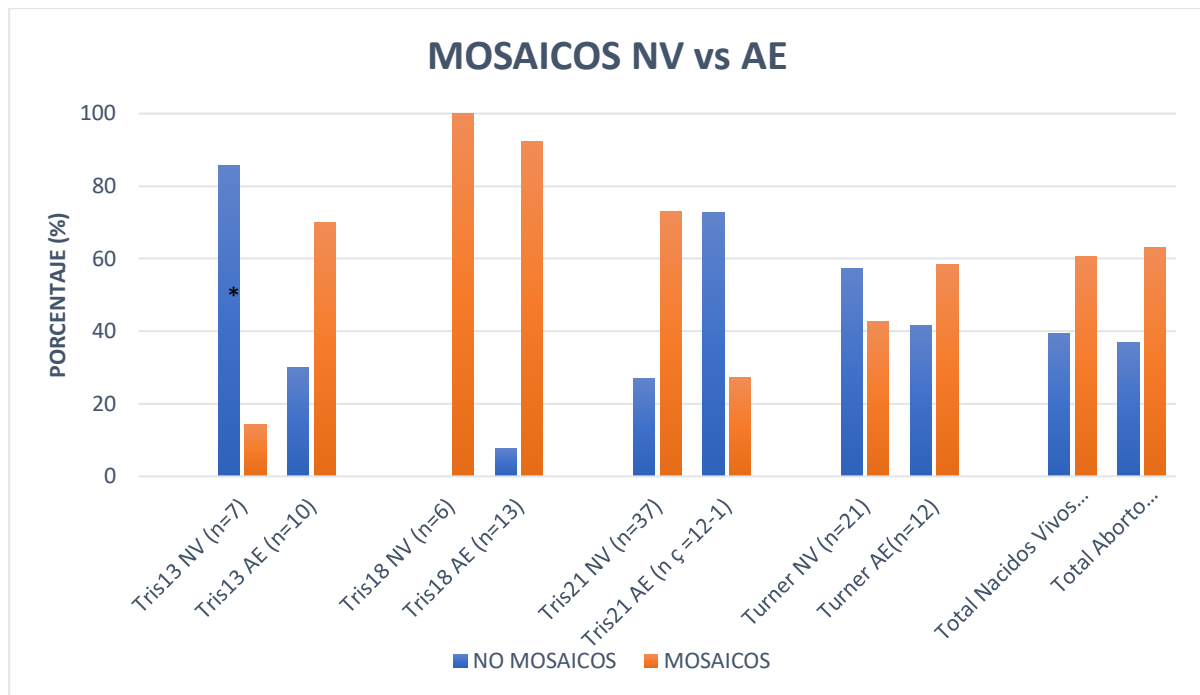


Figura 3. Presencia de mosaicos encontrados en las muestras procesadas con iFISH Nacidos Vivos y Abortos Espontáneos de cada una de las aneuploidías.

***Detectado sólo en células epiteliales**

‡ se omitió un caso que tuvo mosaico, pero de células trisómicas en población tetrasómica

Al comparar la presencia de mosaicos entre NV vs AE se encontraron diferencias significativas, pero la mayor presencia de casos con mosaicismo fue entre los AE (59% NV vs 63% AE $p=0.028$). Dentro de los NV encontramos la mayor parte de los mosaicos en el estudio de células epiteliales y no en sangre periférica ($p=0.005$), de aquí la importancia de estudiar más de un tejido. Para los AE, no se encontraron diferencias significativas al buscar células disómicas en los tejidos estudiados ($p=0.25$).

Se observó que es diferente la distribución de células disómicas entre las aneuploidías estudiadas, los casos con trisomía 18 mostraron significativamente más células disómicas que en el resto de las aneuploidías examinadas ($p<0.001$) tanto para muestras de NV como para tejidos de AE.

8.2 DETERMINACION DE REGIONES GENÓMICAS DISTINTIVAS EN NACIDOS VIVOS

8.2.1 Microarreglos de hibridación genómica comparativa (aCGH) Agilent

En un primer paso, se realizó el análisis en DNA genómico de tejidos de abortos vs nacidos vivos, lo cual se llevó a cabo con aCGH que se basan en la competencia de dos muestras de DNA marcado cada uno con diferente fluoróforo (Figura 4). Para esto se mezclaron DNAs genómicos de abortos con la misma condición cromosómica y su DNA de competencia fue la combinación de DNAs de nacidos vivos con la misma aneuploidía.

Se incluyeron 10 pacientes nacidos vivos (NV) y 10 abortos espontáneos (AE) con diferentes aneuploidías: trisomía 13, 18 o 21 y monosomía X (Tabla 13). En el momento que se llevó a cabo este estudio sólo se contó con una muestra con trisomía 18 de un NV y una de AE.

Tabla 13. Muestras de DNA incluidas en la mezcla para analizar diferencias entre AE y NV con la misma aneuploidía

Aneuploidía	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
NV T13	NV5T13	NV14T13	NV20T13
AE T13	AE3T13	AE4T13	AE18T13
NV T18	NV24T18		
AE T18	AE9T18		
NV T21	NV51T21	NV54T21	NV58T21
AE T21	AE21T21	AE25T21	AE29T21
NV X0	NV28X0	NV31X0	NV34X0
AE X0	AE6X0	AE7X0	AE11X0

Para cada aneuploidía los microarreglos mostraron diferencias entre abortos y nacidos vivos, que consistían en regiones de pérdidas o ganancias en varios cromosomas.

En la Figura 4 se observa cómo se obtiene la información del microarreglo, cada punto esquematiza una sonda y se puede observar aquellas sondas de la región que muestra pérdida en NV con respecto a AE, (en verde) a la izquierda del esquema. En la Tabla 14 se muestran las regiones con pérdidas o ganancias que se identificaron en varios cromosomas, se muestra también para cada región los genes, miRNAs y blancos de miRNAs presentes en ella.

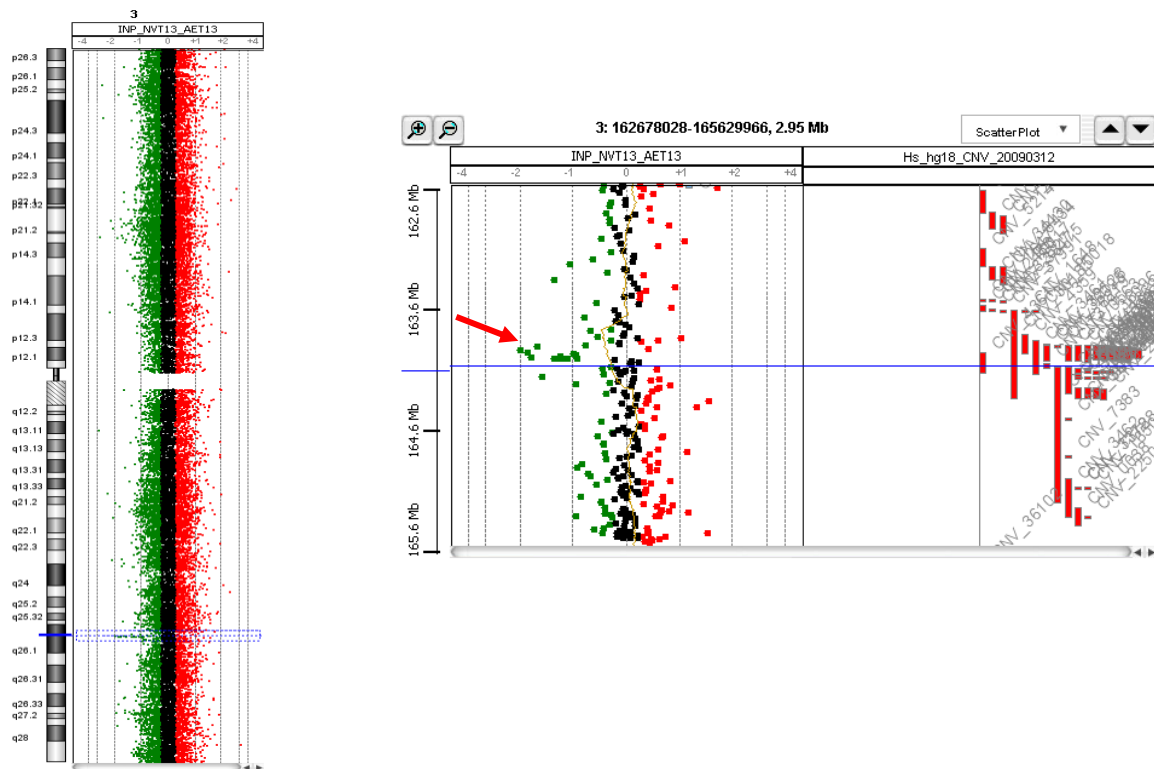


Figura 4. Se muestran las diferencias que se encontraron (flecha) al hibridar el DNA de los NVT13 vs el de los AET13 en la región 3q25.6, chr3:163497228-164101835.

Con el análisis de los microarreglos se detectaron diferencias a nivel genómico entre nacidos vivos y abortos espontáneos aneuploides. No se observaron diferencias en los cromosomas involucrados en las aneuploidías, las diferencias se presentaron en otros cromosomas.

TRISOMIA13

Tabla 14. Regiones detectadas con cambios entre NV y AE con trisomía 13.

Región	En NV	POSICIÓN EN EL GENOMA (hg18)	GENES	Blanco de: miRNA	OBSERVACIONES	REFERENCIA
3q25.6	Pérdida	163497228-164101835				
5p15	Pérdida	528214-567289	SLC9A3		Codifica la bomba de intercambio de Na ⁺ /H ⁺ más importante en el riñón y el intestino	Xue <i>et al.</i> 2022
17p13.3	Pérdida	1527746-1549248	PRPF8	PRPF8: miR-409-3p	Retinitis pigmentosa autosómica dominante. PRPF8 une los factores requeridos para el funcionamiento del espliceosoma U4/U6-U5 tri-snRNP	Wu <i>et al.</i> 2018 Cao <i>et al.</i> 2022
19q13.2	Pérdida	443514910-44373110	PAK4	PAK4: miR-9, miR-193, miR-24, miR-433-3p, miR-181 *, miR-485-5p	Cinasas activadas por p21 involucradas en la transducción de señales en dinámica del citoesqueleto, motilidad celular, transcripción de genes, muerte y supervivencia celular, así como progresión del ciclo celular. su expresión también se ha relacionado con el pronóstico en varios tipos de cáncer	Eswaran <i>et al.</i> 2009 Yuan <i>et al.</i> 2022 Tang <i>et al.</i> 2023
21q22.3	Pérdida	44556879-44561453	PFKL		Codifica la isoforma hepática de la fosfofructocinasa. Anemia hemolítica debida a deficiencia en fosfofructocinasa	Yang <i>et al.</i> 2016
22q11.23	Pérdida	19711630-19714928	SLC7A4		Pertenece a una familia de transportadores de aminoácidos catiónicos en mamíferos. En estudios se ha visto que SLC7A4 no es suficiente para el transporte de aminoácidos en células humanas. Es posible que necesite factor(es) (proteico) adicional(es) para ser funcional	Wolf <i>et al.</i> 2002
			P2RXL1		Pertenece a una familia de canales iónicos que une ATP extracelular. este receptor en particular se ha propuesto para tratar procesos auto inflamatorios, así como dolor por inflamación	Dubyak, 2007
Xq27.1	Ganancia	140077020-140175162	LDOC1	LDOC1: miR-153	Se ha encontrado sub expresado en algunas líneas celulares de cáncer. La ablación de LDOC1 tiene efectos en la proliferación, la apoptosis, la migración y la invasión, lo cual lo coloca como un blanco terapéutico en el carcinoma papilar de tiroides	Zhao <i>et al.</i> 2020

			SPANXC		Se expresa exclusivamente en testículo, regulador de la transcripción y traducción de varios genes específicos de testículo necesarios para la formación del espermatozoide maduro. Niveles elevados en melanoma uveal y carcinoma de vejiga. Se considera marcador diagnóstico de progresión del melanoma uveal a metástasis.	Zendman <i>et al.</i> 1999 Salvatorelli <i>et al.</i> 2019
--	--	--	--------	--	--	---

Se muestran los genes, miRNAs y blancos de miRNAs involucrados en las regiones con pérdidas o ganancias que se identificaron con aCGH

TRISOMIA 18

Tabla 15. Regiones detectadas con cambios entre NV y AE con trisomía 18.

Región	en NV	POSICIÓN EN EL GENOMA (hg18)	GENES	Blanco de: miRNA	OBSERVACIONES	REFERENCIAS
1q24.2	Ganancia	16749376 8- 16750795 7	<i>NME7</i>		Ensamble del huso mitótico y la citocinesis. Proteína de centrosoma NME7 que promueve la nucleación de microtúbulos de γ -tubulina y es fundamental en la formación del huso mitótico y en la segregación cromosómica	Lacombe <i>et al.</i> 2000 Liu <i>et al.</i> 2014
	Pérdida	8293678- 8312351	<i>SH3TC1</i>		Se une a ligandos ricos en prolina, papel regulador. Mutaciones en la variante SH3TC2 causan neuropatía desmielinizante, en células de Schwann su expresión coincide con los momentos de mielinización y se regula a la baja después de la denervación, se sugiere un papel funcional en el mantenimiento de la vaina de mielina	Vijay <i>et al.</i> 2016
7p15.2	Pérdida	27152297- 27166589	<i>HOXA6</i>		Determinación del eje antero-posterior embrionario. Su orden en los cromosomas refleja su expresión a lo largo del eje axial. Mutaciones en estos genes conducen a que una parte de un organismo se desarrolle con las características de una porción diferente. La sobreexpresión de HOXA6 atenúa los efectos mediados por miR-1294 en las funciones celulares del carcinoma renal de células claras	Garzon <i>et al.</i> 2008 Pan <i>et al.</i> 2019
			<i>HOXA7</i>	miR143, miR-221/222 miR-224, miR-196:4, miR-196:3, miR-199, miR-196:2, miR-196:1		
			<i>HOXA-AS3</i>		Regulador en procesos inflamatorios en enfermedades vasculares inflamatorias, como la aterosclerosis	Zhu <i>et al.</i> 2019
			miR196B		RNA Regulador. los miR-196 se expresan en los clusters de los genes HOX en mamíferos y que los RNAm de estos mismos genes HOX son los blancos de los miR-196. El RNAm de HOXB8 ha mostrado ser un blanco natural de miR196b,	Yekta <i>et al.</i> 2004

8p11.21	Pérdida	41640397-41643309	<i>ANK1</i>		Anclaje de los componentes del citoesqueleto al a la maquinaria intracelular. Uno de los genes asociados a esferocitosis hereditaria que es una enfermedad causada por anomalías en las proteínas de la membrana celular de las células rojas de la sangre, que da lugar a anemia hemolítica congénita	Matossian <i>et al.</i> 2021 Wang <i>et al.</i> 2018
12p12.3	Pérdida	19396721-19435228	<i>PLEKHA5</i>	PLEKHA5es blanco de: miR-376, miR-320, miR-410, miR-183, miR-137, miR-496	Expresión alta en ovario, y media en tejidos de adulto, fetales y regiones cerebrales. considerado como biomarcador para metástasis de melanoma cerebral ya que tiene un papel importante en el crecimiento de éste	Jilaveanu <i>et al.</i> 2015 Zhang <i>et al.</i> 2020
15q13.1	Pérdida	27185322-27203227	<i>APBA2</i>	Mensajeros de APBA2: miR-128, miR-27, miR-224	Exocitosis neuronal. APBA2 funciona como una proteína adaptadora que se une al dominio intracelular de la proteína precursora amiloide (APP) y la modula. Su sobreexpresión inhibe la producción de APP	Biederer y Südhof 2000 Mitchell <i>et al.</i> 2009
			<i>ENTREP2-FAM189A1</i>		Proteína de membrana probablemente relacionada con el metabolismo de los lípidos.	

Se muestran los genes, miRNAs y blancos de miRNAs involucrados en las regiones con pérdidas o ganancias que se identificaron con aCGH

TRISOMIA 21

Tabla 16. Regiones detectadas con cambios entre NV y AE con trisomía 21.

Región	en NV	POSICIÓN EN EL GENOMA (hg18)	GENES	Blanco de: miRNA	OBSERVACIONES	REFERENCIAS
1p31.1	Ganancia	72550248-72589741			En esta región solo se encontraron reportes de CNV relacionados con características como estatura baja, discapacidad intelectual, autismo.	
1q42.12	Pérdida	226183339-226214986	WNT9A		Glicoproteínas implicadas en determinación celular y establecimiento de los patrones durante el desarrollo embrionario temprano. Relevante para la formación del esqueleto apendicular (y descrito como un probable gen causal de osteoartritis de mano)	Saitoh <i>et al.</i> 2001 Hartmann y Tabin 2001 Boer <i>et al.</i> 2021
2p23.3	Pérdida	25382716-25390466	DNMT3A	DNMT3A: miR-29	DNA-metiltransferasa 3A, esta enzima parece actuar en la metilación <i>de novo</i> . en algunos casos de leucemia mieloide aguda subtipo M5, los pacientes presentan mutaciones en DNMT3A. Pacientes con LMA con mutación en la arginina 882 del gen DNMT3A882 son resistentes al tratamiento con daunorubicina	Yanagisawa <i>et al.</i> 2002 Yan <i>et al.</i> 2011 Chu <i>et al.</i> 2022
3p14.3	Ganancia	56583506-56594644	CCDC66		Se expresa en diversos tejidos en adultos, sistema nervioso y algunas glándulas. Es un gen regulador involucrado en la adecuada formación y unión de los microtúbulos, en el ensamblaje de cilios.	
3q26.1	Ganancia	164009321-164101835			En esta región solo se encontraron reportes de CNV no relacionados con enfermedades o susceptibilidad a enfermedades.	
6p21.32	Ganancia	32605300-32650731	HLA-DRB1		Se expresa en linfocitos B, donde presentan péptidos antigénicos extracelulares procesados a los linfocitos T cooperadores (CD4+). Histocompatibilidad, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, asma y sarcoidosis	Van Heemst <i>et al.</i> 2016 Brownlee <i>et al.</i> 2023
7q22.2	Ganancia	109231462-109240269			En esta región solo se encontraron reportes de CNV no relacionados con enfermedades o susceptibilidad a enfermedades.	
13q21.33	Pérdida	68144264-68170016			En esta región solo se encontraron reportes de CNV no relacionados con enfermedades o susceptibilidad a enfermedades.	

17q25.2	Pérdida	77868413-77880176	<i>CD7</i>	Codifica para un antígeno de superficie, es una glicoproteína que está en timocitos y en las células T maduras	Stillwell y Bierer 2001, Rogers <i>et al.</i> 2010
			<i>SECTM1</i>	Codifica para una proteína transmembranal con dominio N extracelular y un péptido señal. observado en Aparato de Golgi y también se ha probado que puede ser secretada.	Slentz-Kesler <i>et al.</i> 1998
18q12.3	Pérdida	44393903-44405240	<i>CTIF</i>	Componente del complejo de inicio de la traducción CBP80/CBP20, este complejo se une al extremo cap del RNAm	Kim <i>et al.</i> 2009
22q11.23	Pérdida	22706166-22715978	<i>GSTT1</i>	Detoxificación. Mutaciones nulas en humanos predisponen a síndrome mielodisplásico, también se ha asociado con la eficacia o toxicidad en la quimioterapia del cáncer.	Chen <i>et al.</i> 1996

Se muestran los genes, miRNAs y blancos de miRNAs involucrados en las regiones con pérdidas o ganancias que se identificaron con aCGH

MONOSOMÍA X

Tabla 17. Regiones detectadas con cambios entre NV y AE con monosomía X.

Región	en NV	POSICIÓN EN EL GENOMA (hg18)	GENES	miRNA	Blanco de: miRNA	OBSERVACIONES	REFERENCIAS
3q27.1	Pérdida	72550248-72589741				En esta región solo se encontraron reportes de CNV no relacionados con enfermedades o susceptibilidad a enfermedades.	
4q25	Pérdida	226183339-226214986	<i>NEUROG2</i>		NEUROG2:miR-381:2, miR-187, miR-346, miR-30-3p, miR-216, miR-33:2, miR-381:1, miR490, miR495, miR-17-5p/20/93.mr/106/519.d, miR-33:1	Factores de transcripción con papel muy importante en la neurogenesis, regula la migración de las células de la cresta neural,	Fode <i>et al.</i> 1998 Liu <i>et al.</i> 2021
7q22.1	Ganancia	25382716-25390466	<i>CUX1</i>	mir4285		Represor positivo de la transcripción, puede reprimir a varios genes reguladores del desarrollo. Actividad tumor supresor, regulando el ciclo celular y genes de proliferación y reparación del DNA. Mutaciones que inactivan CUX1 contribuyen a la leucomogénesis, participan en procesos como los síndromes mielodisplásicos y la leucemia mieloide aguda	Neufeld <i>et al.</i> 1992 Dermawan <i>et al.</i> 2022
8q13.3	Pérdida	56583506-56594644				En esta región encontramos CNV reportados como patogénicas. En CN=3 se reporta retraso global del desarrollo y en pérdida se reportan alteraciones auditivas	
13q14.11	Ganancia	164009321-164101835	<i>NARG1L</i>			Modificador post-traduccional. Acetilasa. Nueva N-acetil transferasa en el humano, mutantes nulas para NAA16 inducen muerte celular	Arnesen <i>et al.</i> 2006 Polevoda <i>et al.</i> 2009

14q32.33	Pérdida	32605300-32650731	abParts			Semejanza con regiones de las inmunoglobulinas.	
21q22.3	Ganancia	109231462-109240269	<i>ADARB1</i>			Adenosina deaminasa específica de RNA m. Las mutaciones de pérdida de función en ADAR1 se asocian principalmente con dos enfermedades: la discromatosis simétrica hereditaria (DSH; OMIM 127400) y el síndrome de Aicardi-Goutières (OMIM 615010)	Heraud-Farlow y Walkley 2020

Se muestran los genes, miRNAs y blancos de miRNAs involucrados en las regiones con pérdidas o ganancias que se identificaron con aCGH

Para las trisomías 13 y 18 en general se encontró un desbalance a la baja, es decir, que la mayoría de las regiones con cambio se presentan como una región con pérdida en los NV al compararlos con los AE, en contraste, para el pool de la trisomía 21 y monosomía X se observó que en la mitad de las regiones hay una ganancia y en la otra mitad una pérdida. Es difícil establecer una correlación directa con estos resultados y la sobrevida de los pacientes, sin embargo, se pueden analizar a manera detallada las diferentes regiones con cambios (Tablas 14 -17).

En todas las aneuploidías observamos desbalance en varios cromosomas, en dichas regiones encontramos genes y RNAs reguladores (miRNAs)

Los genes encontrados codifican para proteínas con diferentes funciones, entre las que se encuentran reguladores del desarrollo embrionario como *HOXA6*, *HOXA7* (Trisomía 18, Tabla 15) y *WNT9A* (trisomía 21, Tabla 16); represores de transcripción como *CUX1* (Monosomía X, Tabla 17); reguladores del procesamiento de los RNAm como *SPANXC*, *NEUROG2*, *PRPF8*, *CTIF* y *ADARB1* (trisomía 13, monosomía X; Tablas 14 y 17); proteínas estructurales como *NME7* y *ANK1* (trisomía 18, Tabla 15); transductores de señales como *PAK4* y *CD7*; enzimas y reguladores de enzimas como *PFKL*, *SH3TC1* y *GSTT1* (Trisomías 13, 18 y 21; Tablas 14, 15 y 16); transportadores o bombas de iones como *SLC7A4*, *SLC9A3* y *P2RXL1* (trisomía 13, Tabla 14); neurogénesis o funciones neuronales como *APBA2*, *CCDC66* y *NEUROG2* (Trisomías 18, 21 y monosomía X; Tablas 15, 16 y 17); metilación del DNA como *DNMT3A*; histocompatibilidad como *HLA-DRB1* (trisomía 21, tabla 16); así como genes cuyas proteínas aún no se conoce su función pero se han observado en células cancerosas como *PLEKHA5*, *LDOC1*, y *NARG1L* (trisomía 13, 18 monosomía X, Tablas 14, 15 y 17).

Se detectaron también miRNAs como miR196b que regula varios genes entre ellos el *HOXB8*, el miR-4285 que regulan la expresión *NDEL1*, *GLI2*, *POU2F1*, *NKX3-2*, *CYP26C1* y *NKX2-5*, entre otros (Tablas 14, 15, 16 y 17).

8.2.2 Análisis de CNV por Microarreglos Affimetrix SNPs 6.0.

Se estudió la presencia de CNV en una población de 147 mestizos mexicanos, 50 fenotípicamente sanos (MXM, 30 mujeres y 20 hombres) y se analizaron las muestras con aneuploidía, comparando Nacidos Vivos vs Abortos espontáneos (NV vs AE). Un total de 97 pacientes con aneuploidías (MXM_A) 11 con trisomía 13 (5 tejidos de AE y 6 de NV), 17 con trisomía 18 (11 AE y 6 NV), 41 con trisomía 21 (6 AE y 35 NV) y 28 con Monosomía X (9 AE y 19 NV). No se encontraron diferencias entre AE vs NV ni en las regiones de tramos largos contiguos de homocigosidad (LCSH) ni en las CNV.

De manera importante, se encontraron cuatro regiones de CNV con frecuencias muy altas en todos los grupos estudiados, por lo que se amplió el estudio de estas regiones para detectar si son características de la población mestiza mexicana.

8.2.2.1 No se encontraron diferencias respecto a Tramos largos contiguos de homocigosidad (LCSH).

Al analizar las regiones con homocigosidad o LCSH, no se encontraron regiones que mostraran isodisomía uniparental o genes con impronta en nuestros sujetos de estudio. Adicionalmente, se usaron las LCSH para reconocer la presencia de endogamia y consanguinidad en nuestra población. Dieciocho de los 50 controles sanos (MXM) estudiados mostraron al menos una región autosómica con LCSH. En el grupo de aneuploidías (MXM_A), 73/97 presentaron al menos una región autosómica con LCSH. Con la finalidad de aumentar nuestra *n* de muestras de

individuos mexicanos control, analizamos 99 archivos CEL de 99 muestras de sangre (tejido sano), de mujeres mexicanas que participaron en un estudio de cáncer de mama (MXM_WBC) presente en el GEOdataset (GSE87048 - 2021) de manera pública y abierta, donde 75/99 presentaban al menos una región autosómica con LCSH.

Se calculó el coeficiente de consanguinidad (F) con la siguiente fórmula en los grupos estudiados (Chaves *et al.* 2019). Estos resultados respaldan la ausencia de parentesco o consanguinidad entre nuestra población de estudio (Tabla 18).

$$F = \frac{\sum \text{Total de regiones } < 3\text{Mb con homocigocidad de autosomas}}{\sum \text{total del genoma humano de autosomas}}$$

Tabla 18. Promedios de Regiones LSCH y coeficiente de consanguinidad (F)

GRUPO	% Componente Nativo	Total de regiones LSCH en autosomas (kbp, promedio)	F (Promedio)
MXM	67.8	351930.65	0.01221543
MXM_WBC	ND	1988679.85	0.00069027
MXM_A	61.70	17787.84	0.0062265

MXM, población sana de Mestizos Mexicanos. MXM_WBC, población femenina mestiza mexicana del GEOdataset de cáncer de mama. MXM_A, población mestiza mexicana con aneuploidías. ND, No Disponible en la base de datos.

8.2.2.2 No se encontraron diferencias entre los grupos, respecto a las variantes en el número de copias (CNV).

Se hallaron CNV en prácticamente todos los individuos estudiados y en todos los cromosomas. En la mayoría de los casos con aneuploidía, ya sea en tejidos de AE o bien en SP de NV, se localizaron prácticamente las mismas ganancias y/o pérdidas

genómicas en los cromosomas 2p11.2, 4q13, 8p, 8q 14q32, 15q11.2 y 22q, sin encontrar diferencias entre las etapas del desarrollo que estudiamos (NV vs AE).

Sin embargo, llamó la atención la presencia de cuatro variantes: 2p11.2 (2.9Mb), 8p11.22 (0.15Mb), 14q32.33 (1.02Mb) y 15q11.2 (0.76Mb), (Figura 5) con una frecuencia mayor al 55% en los mexicanos sanos (MXM), en el grupo control de cáncer de mama (MXM_WBC), que a partir de este momento se denominarán ambos como el grupo control MXM y en la población mexicana con aneuploidía (MXM_A) (Tabla 19).

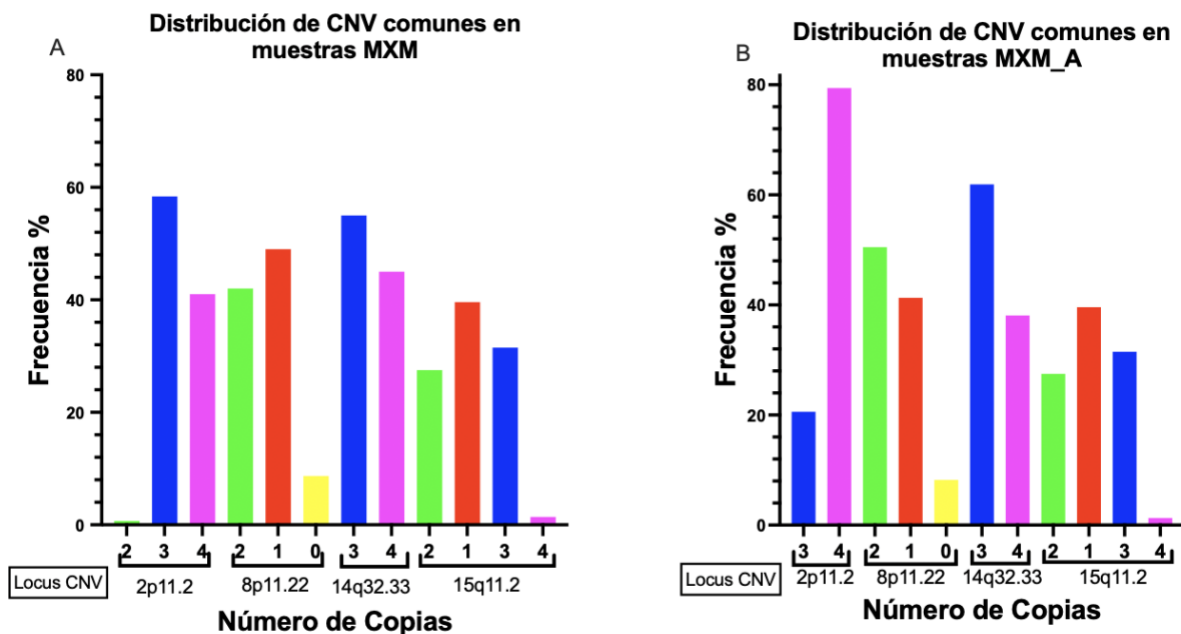


Figura 5. Distribución de CNV frecuentemente encontradas en población mestiza mexicana. Referencia usada: población del HapMap. A. MXM Sanos; B. MXM_Aneuploides

Las CNV comunes presentes en sujetos y tejidos MXM se muestran en la Figura 5A, en la región 2p11.2 hay una ganancia de copias, CN= 3 en 58% y CN= 4 en 41% respectivamente; para MXM_A, el 21% de los casos se manifestó con CN=3 y el 79%

con CN=4; sólo un caso en toda la población (0.67 %) mostró CN=2 en esta región (Figura 5B). Para el cromosoma 8p11.2, casi la mitad de los casos, 42% de MXM y 51% de MXM_A, tienen normal CN=2, pero 49 % MXM y 41 % MXM_A tienen pérdidas con CN=1 y el resto (9% y 8%, respectivamente) tienen nula CN=0. En 15q11.2, alrededor del 70 % de las muestras tuvieron ganancias o pérdidas: el 40 % y el 38 % de las muestras MXM y MXM_A, respectivamente, mostraron una pérdida CN=1, mientras que el 31,5 % de MXM y el 31 % de MXM_A tuvieron una ganancia con CN=3. Finalmente, de manera muy importante, la CNV ubicada en 14q32.33 presenta ganancia en el total de las muestras revisadas, tanto los archivos propios y como los del GEOdataset de tejidos sanos (MXM) y en pacientes con aneuploidía (MXM_A). Se encontró CN=3 en el 55 % de las muestras control MXM/MXM_WBC y en el 62% de las muestras MXM_A y como CN= 4 en el 45 % de los controles y en el 38 % de los sujetos MXM_A. No hay un solo caso que evidencie CN= 2 en esta región (Tabla 19, Figura 5A y B).

Tabla 19. Variantes en el número de copias con alta frecuencia en individuos Mestizos Mexicanos

Loci	CN	TEJIDOS SANOS				TEJIDOS ANEUPLOIDES		TOTAL %FREQ. POB MXM	Coordenadas (hg19)	GENES LOCALIZADOS EN LA REGION
		MXM (n=50)		MXM_WBC (n=99)		MXM_A (n=97)				
		Freq	Total Freq	Freq	Total Freq	Freq	Total Freq			
2p11.2	3	25	49/50 (98%)	62	99/99 (100%)	20	97/97 (100%)	99.6%	chr2: 89143755-92057597 2.9Mbp	IGKV2D-28 (HGNC:5799), IGKV3D-7 (HGNC:5829)
	4	24		37		77				
8p11.22	1	29	29/50 (58%)	44	57/99 (57.6%)	40	48/97 (49.5%)	54.5%	chr8: 39230170-39386952 156,782bp	ADAM5 (HGNC: 212), ADAM3A (HGNC:209)
	0	0		13		8				
14q32.33	3	20	50/50 (100%)	62	99/99 (100%)	55	97/97 (100%)	100%	chr14: 106078230-107100266 1.02Mbp	MIR4507 (HGNC:41642), MIR4538 (HGNC:41664), MIR4537 (HGNC:41682), MIR4539 (HGNC:41546), KIAA0125 (HGNC:1995), ADAM6 (HGNC:213), LINC00226 (HGNC:20168) IGHD (HGNC:5480) IGHG3 (HGNC:5527) IGHG1 (HGNC:5525)
	4	30		37		42				
15q11.2	1	21	45/50 (90%)	38	63/99 (63.6%)	37	67/97 (69%)	71.1%	chr15:2085106-22,588,019 1,735,914bp	OR4M2-OT1(HGNC:56199), LINC02203 (HGNC:53069), OR4M2 (HGNC:15373), OR4N4 (ID: 283694), OR4N3P (HGNC:15375), IGHV1OR15-1(HGNC:5563), LOC102724760 (NCBI ID: 102724760), IGHV1OR15-3 (HGNC:5565), LOC642131 (NCBI ID: 642131), MIR1268A (HGNC:35336), RREXP3 (HGNC:38797)
	3	24		23		30				
	4			2						

8.2.2.2.1 Validación del número de copias por PCR cuantitativo (qPCR).

Realizamos qPCR para corroborar los CN obtenidos con el microarreglo de genoma completo SNP Array 6.0. Diseñamos cebadores en los cuatro loci con CN≠2 y para un locus distal en el mismo cromosoma donde CN=2 como control del número de copias (Tabla 20). Se analizó el DNA genómico de una muestra representativa de los individuos estudiados, incluidos nueve individuos MXM y siete individuos MXM_A.

Tabla 20. Diseño de primers para qPCR de los loci con CNV y de regiones control

ID	3'-5' Sequence	
	Forward	Reverse
Chr2CNV	GGAAACACCTATTTGGACTGGT	GCCCGATAGGAAAGCGTATAG
Chr2Ctrl	TGATTTGGGTTGCACTTCTTT	TTGCAGCAAATAGGCGAATA
Chr8CNV	CAGCCGTTCCAAGGACAA	GAGACAGCATTGCGTAGCC
Chr8Ctrl	TGCAGTGAGCTCCCTAAGTCT	GCTCGGGAGTCTAACAGTCAA
Chr14CNV	AACACCCAGTGCAATGTGAC	TCCTCTATGACCGCACTTCTG
Chr14Ctrl	TTTTTGAAGGAGTTGGTTAAACATT	GTGTCCCTCAGCTAGGCAGT
Chr15CNV	TGAACAAGAGGGACAAGCAA	AGGGTATGTCCCCATCATCA
Chr15Ctrl	CAAAGTCTCCTAATCTTGGACAGC	GAGGGAAGACTAGGATGATACCTG

Con este método, 15 de 16 muestras (93.75%) probadas para el locus 2p11.2 mostraron CN de 4 a 17 copias. Para el cromosoma 8p11.22, 14 de 16 (87.5 %) de las muestras tuvieron <2 copias en ese locus. Para 14q32.33 se pudo corroborar la ganancia de la CNV en 13/16 (81.25%) con 3 a 5 copias; para el cromosoma 15 se hallaron pérdidas y ganancias con el microarreglo, en esta validación se encontraron 4 pacientes con pérdida y 6 con ganancia de copias (25 y 37.5% respectivamente) (Tabla 21, Figura 6)

Tabla 21. Validación por qPCR de lo obtenido por microarreglo SNP 6.0 en población mestiza mexicana

ID	2p11.2 chr2: 89143755- 92057597		8p11.22 chr8: 39230170- 39386952		14q32.33 chr14: 106078230- 107100266		15q11.2 chr15: 21914540- 22681064	
	CN Array	CN qPCR	CN Array	CN qPCR	CN Array	CN qPCR	CN Array	CN qPCR
MXM SANOS								
CtrNV03	3	2	1	1	3	2	2	2
CtrNV04	4	7	2	1	4	3	4	1
CtrNV05	3	4	2	1	3	2	2	2
CtrNV07	4	5	1	1	3	3	2	4
CtrNV08	4	6	1	1	4	3	1	2
CtrNV10	4	6	2	1	4	2	1	5
CtrNV11	4	4	1	1	3	3	3	4
CtrNV13	3	17	1	1	3	4	1	1
CtrNV16	4	5	2	1	4	3	1	1
MXM ANEUPLOIDE								
NV20T13	4	7	1	1	4	2	3	4
NV31X0	4	4	1	1	3	3	2	ND
NV32T21	3	10	2	ND	3	3	1	ND
NV53T18	3	11	2	1	3	5	3	2
NV56T13	4	4	2	ND	3	ND	3	ND
NV60X0	4	10	2	2	3	5	1	1
NV62T18	4	7	1	1	4	ND	2	ND
NV115X0	4	ND	2	2	3	4	3	3
AE19T18	3	ND	2	ND	4	ND	1	1

ND. DNA No Disponible

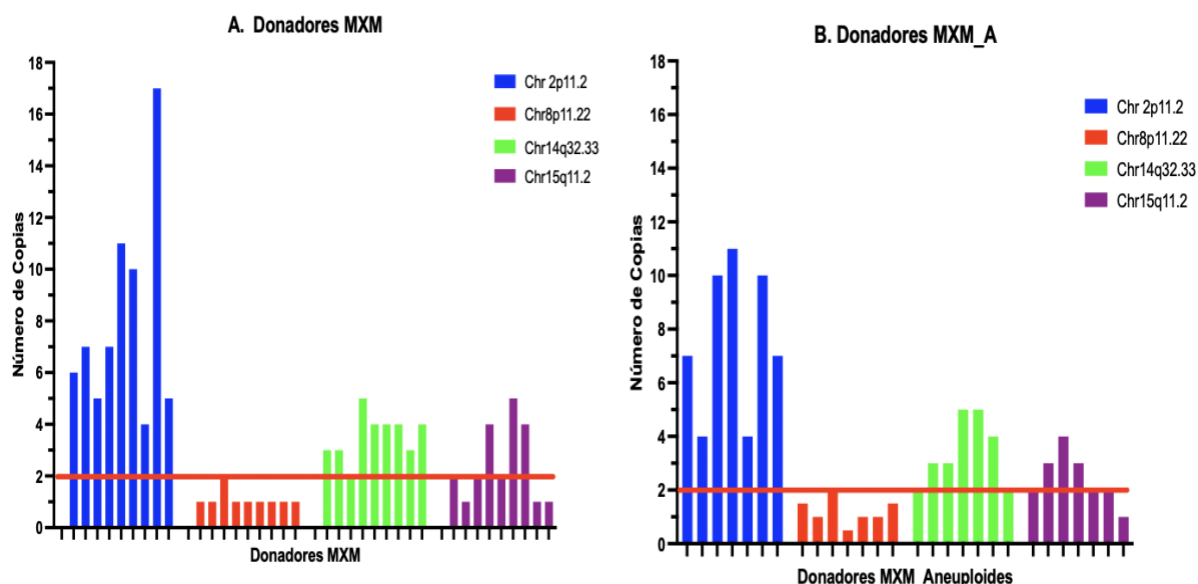


Figura 6. Validación de cambios de CNV en cuatro loci cromosómicos mediante qPCR. A) 9 muestras de ADN de donante mexicano-mestizo sano y B) 7 muestras de ADN de donante mexicano-mestizo con aneuploidía. La línea roja muestra CN=2.

8.2.2.2.2 Ancestría

Con la finalidad de conocer más a fondo las características particulares de la población de estudio y saber si es comparable con la población mexicana utilizada internacionalmente que se encuentra dentro del HapMap, se evaluaron los componentes de ancestría en los grupos MXM y MXM_A en comparación con el grupo de mexicanos nacidos en Los Ángeles CA, EE. UU. (MXL) incluidos en el Proyecto HAPMAP (64 personas). Las poblaciones MXM y MXM_A tienen contenidos genéticos de ancestría europea de Utah, EE. UU. (CEU), nativos americanos (NAT) y yorubas de Nigeria (YRI), similar a la que tienen los 64 hijos de mexicanos estudiados para el HapMap (MXL), siendo la mayor contribución el componente NAT, que es incluso mayor que para los MXL (MXL=0.488 frente a MXM=0.678 y MXM_A=0.618) (Figura 7).

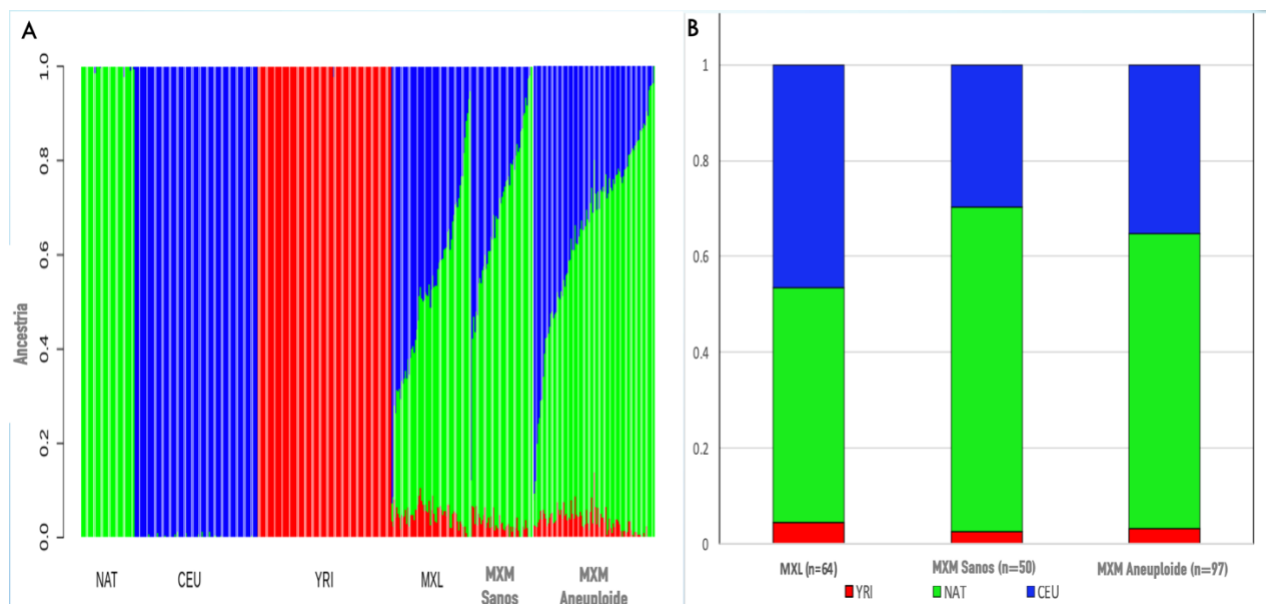


Figura 7. Patrón de ascendencia de cada población contribuyente en los grupos mestizos mexicanos (MXM) sanos y aneuploides. A. Gráfico de barras que muestra la ascendencia global de los grupos (MXM) deducidos con ADMIXTURE. B. Proporción de ascendencia de cada población contribuyente en el grupo MXL y grupos MXM y MXM_A propios. YRI: yorubas en Ibadan, Nigeria; NAT: nativo americano; CEU: Caucásico.

8.2.2.2.3 Confirmación de que la CNV encontrada en el 100% de la población estudiada, está relacionada con nuestra etnia mestiza-mexicana

Al ver que toda la población en estudio mostró 4 CNV que se comparten entre todos los grupos, ya sea en sujetos sanos, pacientes aneuploides y en las muestras control del estudio de cáncer de mama, todos ellos de origen mestizo mexicano; se decidió hacer un segundo llamado de las CNV detectadas con el primer análisis, con la finalidad de validar lo obtenido por medio del ChAS, esta vez con un robusto análisis por medio de CRMA v2 (Copy-number estimation using Robust Multichip Analysis). Se declaró el conjunto de datos conformado por 50 MXM archivos .CEL (Genome-Wide Human SNP Array 6.0) como referencia interna de MXM. Con este método, se lograron comparar las estimaciones del número de copias en la región 14q32.33 para cada muestra, se eligió esta variante ya que fue la que encontramos en el 100% de nuestra población estudiada. La Figura 8 muestra el llamado de la CNV localizada en el cromosoma 14, en el sujeto codificado para esta búsqueda como C12, en A) C12 frente a la referencia MXM. B) C12 vs una referencia de población ibérica (IBS) (GSE67047 – 2015). C) C12 vs la referencia de caucásicos (CEU) D) C12 vs referencia YRI. E) CN en C12 vs referencia HapMap (CEU+YRI). De manera muy importante, se encontró que la diferencia en CN que se detecta en la muestra, depende de la referencia utilizada.

Se observa claramente en la Figura 8A y B que en la región 14q32.33 no hay cambios con respecto a la población de referencia mexicana e ibérica, enfatizando el origen mestizo de la población de este trabajo; mientras que las comparaciones con caucásicos, yorubas y HapMap (juntos), hacen evidente una ganancia de sondas ubicadas en la región chr14:106078230-107100266. Esto demuestra las diferencias étnicas con esas poblaciones, no reportadas de manera previa y que resaltan este

resultado como muy importante, ya que el HapMap es la referencia por excelencia en el mundo y presenta sesgos importantes por carecer de representatividad de diversas etnias en el mundo, en este caso, de mestizos mexicanos.

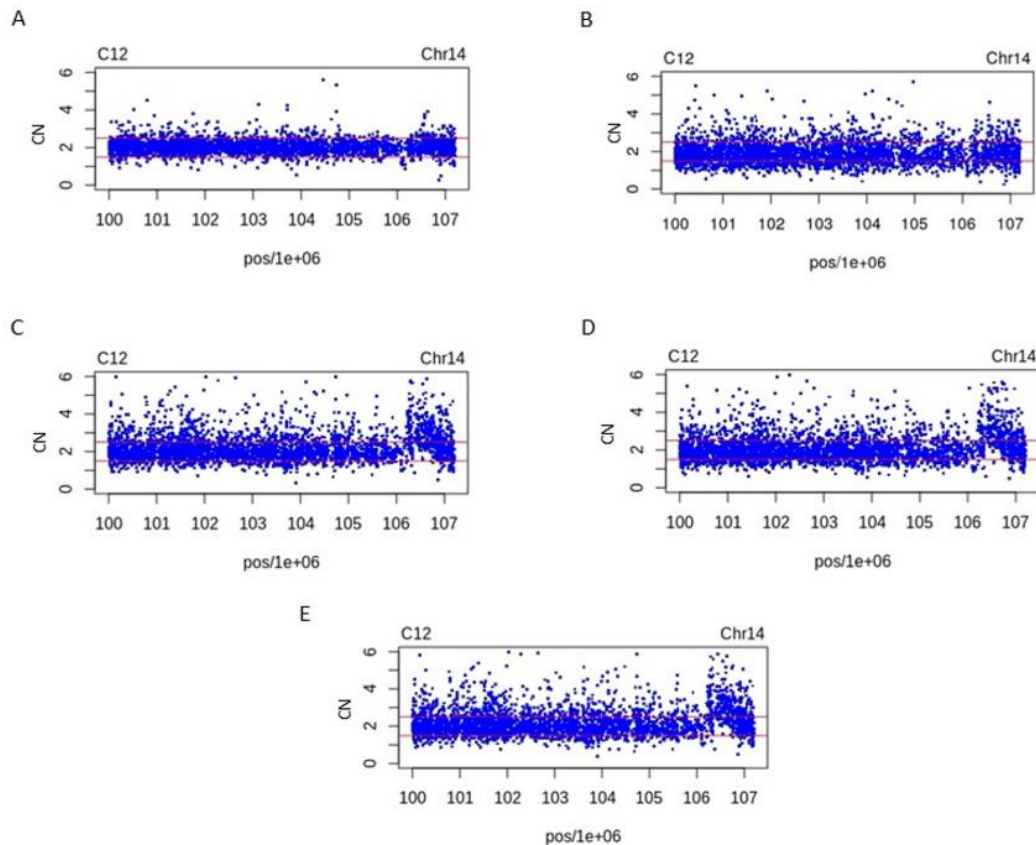


Figura 8. Estimación del número de copias en 14q32.33 para la muestra C12. A) vs referencia de mestizos mexicanos (MXM). B) vs referencia Ibéricos. C) vs referencia Caucásicos. D) vs referencia yorubas. E) vs referencia Hapmap (CEU+YRI). Se observa que el CNV en la región chr14: 106078230-107100266 solo es evidente cuando se compara con las muestras de Hapmap CEU y YRI.

9. DISCUSION

9.1 DIFERENCIAS EN LA PRESENCIA DE MOSAICISMO EN NACIDOS VIVOS Y ABORTOS ESPONTÁNEOS

En este trabajo se estudiaron células blancas sin agregar ningún mitógeno dirigido a linfocitos B o T, por lo que se evaluaron todas las estirpes de los leucocitos

sanguíneos, de esta manera en lugar de analizar de manera convencional por citogenética clásica, 25 células en promedio, lo que sólo permite detectar un mosaico >12% de acuerdo a Hook (Hook,1977), con iFISH se realiza una lectura de entre 500 y 1000 núcleos, lo cual incrementa la posibilidad de encontrar mosaico hasta de <1% (Hook, 1977). Además, al estudiar células de un origen embrionario diferente como lo son las células de descamación del epitelio bucal, que proviene del ectodermo (la SP proviene del mesodermo), al diferenciarse ambos tejidos de manera muy temprana en el desarrollo, prácticamente desde la formación de la blástula (día 5 o 6 post-fertilización) (Capalbo y Rienzi 2017, Shahbazi 2020), permite pensar que de existir un mosaico que ayude a un embrión aneuploide a sobrevivir, se tendría la capacidad de vislumbrarlo.

De manera general, se encontró que la frecuencia de células disómicas fue mayor en las muestras de AE en comparación con aquellas de NV con aneuploidías. Como se puede observar en la Tabla 8, en los sujetos NV al hacer el análisis con iFISH, se detectó mosaicismo en 59% (42/71) de los individuos con aneuploidías; de éstos en 20/42 casos se encontró el mosaico celular únicamente en las células epiteliales analizadas y no en los linfocitos no cultivados, ni en el cariotipo en metafases por bandas G previo al estudio. Estos resultados, contrario a lo esperado, no concuerdan con la teoría de que la presencia de células normales, pueden llevar a un feto a término, ya que en este trabajo se evidenció que los sujetos aneuploides que llegan a nacer, no lo hacen por tener una línea celular disómica, ya que los que se abortan de manera espontánea también la pueden presentar (Urbach y Benvenisty 2009, Hook y Warburton 2014), de manera que debe existir algún otro factor genómico que haga la diferencia entre la supervivencia y letalidad temprana.

Al analizar la distribución de individuos con mosaicismo, se encontró que no fueron similares entre los grupos con aneuploidía. La frecuencia de mosaicismo fue mayor en las muestras con trisomía 18 en comparación con el resto de las aneuploidías, sin importar el tejido estudiado; esta es una de las aneuploidías con mayor letalidad, con una supervivencia a 1 año es de entre el 8 y 10%, a pesar de mostrar mosaico bajo, esto quizás se deba al tipo de malformaciones en extremidades, orofaciales, de pared abdominal y por supuesto cardíacas que estos fetos desarrollan (Cavadino y Morris 2017).

En relación a la trisomía 13, que es muy letal, sólo se encontraron células disómicas en un solo caso de 7 NV estudiados y en 7/10 de los AE, esto indica que aun cuando el producto de la gestación con esta trisomía, presente células normales, el producto no sobrevive. Los porcentajes de mosaicismo que se detectaron en los casos de NV con Síndrome de Turner, son muy parecidos a lo reportado en la literatura, donde se menciona un 40- 50% de mosaicismo (Urbach y Benvenisty 2009, Hook y Warburton 2014) en NV, en este estudio se detectó un 43% de casos NV con mosaico y los AE mostraron mosaico en 58% de los casos, de manera importante no se encontraron referencias que estudien el porcentaje de mosaicos en tejidos de abortos. En cuanto a trisomía 21, se encontró 73% de mosaicismo en NV, particularmente más de la mitad de estos mosaicos se detectaron sólo en la muestra de células epiteliales, de aquí la importancia de analizar diferentes tejidos. En AE se observó 30% de mosaicos, estos valores son altos, si se considera que en la literatura se reporta que 2% de los casos de síndrome de Down, presentan mosaico (Antonarakis *et al.* 2020).

Existen algunas teorías del porqué los fetos aneuploides logran o no sobrevivir, una de ellas es la posibilidad de un rescate trisómico durante la gestación, que da

lugar a una línea celular disómica, que aunque sea en proporciones crípticas, actúe como balanceador genético y ayude a la supervivencia del feto aneuploide (Hook y Warburton 2014); sin embargo, este rescate puede dar lugar a una disomía uniparental del cromosoma involucrado, la cual origina una desregulación en todo el entorno genómico del embrión e incluso la expresión de genes con impronta o recesivos, que formen parte del desarrollo adecuado del organismo en cuestión (Urbach y Benvenisty 2009, Yingjun *et al.* 2017). Por otro lado, acerca de la supervivencia de un feto con aneuploidía, recientemente se reportó, que mutaciones en el DNA mitocondrial de embriones aneuploides, podrían ayudar a la supervivencia de los mismos e incluso, gradualmente disminuir la población de células aneuploides a lo largo del desarrollo embrionario (Ijuin *et al.* 2023).

9.2 VARIANTES GENÓMICAS

9.2.1 Análisis de diferencias genómicas entre Nacidos vivos vs Abortos espontáneos mediante Hibridación genómica comparativa (aCGH).

El análisis con microarreglos basado en hibridación genómica comparativa, con mezcla de DNA de sujetos NV vs mezcla de DNA de AE con la misma aneuploidía, se realizó con el objetivo de evitar las regiones polimórficas y variantes individuales y resaltar las diferencias grupales.

Con esta estrategia no se evidenciaron pérdidas o ganancias diferentes del cromosoma involucrado en la aneuploidía entre los NV vs AE, sin embargo, si encontramos diferencias en otras regiones del genoma. Siempre se utilizó como referencia el grupo de NV, por lo que se debe considerar que cuando se hace referencia a pérdidas en NV, pueden ser ganancias en AE y cuando se refiere a ganancia en NV, pueden ser una pérdida en AE.

Se hizo un análisis de las regiones con diferencias y en todas ellas se encontró la presencia de genes, como se muestra en la Tabla 22. La mayor parte de las diferencias fueron pérdidas de regiones en los NV con trisomías, mientras que se encontraron más regiones con ganancias en los NV con monosomía X. No es posible afirmar que esto esté relacionado con el balance a nivel de número de copias, sobre todo porque no ocurre en el cromosoma involucrado, sin embargo, se debe aclarar que en estos segmentos puede haber regiones reguladoras que podrían actuar en trans (de manera indirecta) sobre el cromosoma involucrado en la aneuploidía o bien en otros lugares del genoma que pudieran afectar la sobrevivencia del feto (Li y Zhu 2022)

Tabla 22. Genes localizados dentro de regiones de pérdida o ganancia para aneuploidías

	Trisomía 13	Trisomía 18	Trisomía 21	Monosomía X
Pérdidas en NV	<i>SLC9A3; PRPF8; PAK4; PFKL; SLC7A4; P2RXL1</i>	<i>SH3TC1; HOXA6, HOXA7; HOXA-AS3; miR196B; ANK1; PLEKHA5; APBA2; FAM189A1</i>	<i>WNT9A; DNMT3A; CD7; SECTM1; CTIF; GSTT1</i>	<i>IGF2BP2; NEUROG2;</i>
Ganancias en NV	<i>LDOC1; SPANXC</i>	<i>NME7</i>	<i>CCDC66; HLA-DRB1</i>	<i>CUX1; NARG1L; ADARB1</i>

9.2.2 Variantes de número de copia con alta frecuencia obtenidas mediante SNP6.0

Se encontró 4 CNV en los siguientes *loci*: 2p11.2, 8p11.22, 14q32.33 y 15q11.2, con una alta frecuencia en la muestra analizada. No se hallaron genes en los CNV de las regiones 2p11.2 y 15q11.2; mientras que en el CNV de la región 8p11.22 se encontraron los genes *ADAM5* (HGNC: 212) and *ADAM3A* (HGNC:209). El locus 14q32.33 incluye a los genes *KIAA0125* (HGNC ID: 9834), *ADAM6* (HGNC ID: 8755),

LINC00226 (HGNC ID: 338004), *IGHD* (HGNC:5480), *IGHG3* (HGNC:5527), y *IGHG1* (HGNC:5525); ninguno de estos genes ha sido asociado con enfermedades mendelianas (OMIM) al relacionarlas con la dosis genética (<https://search.clinicalgenome.org/kb/gene-dosage/region/ISCA-37477>), además no existen secuencias reguladoras que puedan modificar expresión génica en cualquiera de las cuatro regiones de CNV; ninguno de estos CNV se superpone con las regiones LCSH que aquí se detectaron.

Además, al buscar estas regiones específicas en bases de datos como el sSMC (cromosomas marcadores pequeños supernumerarios, base de datos <http://cs-tl.de/DB/CA/sSMC/0-Start.html>) y los heteromorfismos cromosómicos (base de datos <http://cs-tl.de/DB/CA/HCM/0-Start.html>), no se encontró evidencia de que un número que diferente a CN = 2 en las regiones 2p11.2, 8p11.22 y 15q11.2 o las duplicaciones 14q32.33 estén asociadas con patología, lo que sugiere que las variantes numéricas en estas regiones no tienen impacto en el fenotipo, probablemente debido a la ausencia de genes con sensibilidad a la dosis (Purwar *et al.* 2021).

La presencia de una elevada frecuencia en estas variantes, puede deberse a la existencia de endogamia o consanguinidad en la población, sin embargo, al evaluar los porcentajes de regiones LCSH como indicadores de consanguinidad (valor F, Tabla 18) (Kearney y Kearney 2011), se observó que no hay indicios de endogamia o consanguinidad en los grupos estudiados. Ninguna de las regiones LCSH detectadas en este estudio, se superpone con las CNV frecuentes halladas y más del 42 % son LCSH comunes reportadas anteriormente como las regiones 2q11.1q11.2, 11p11.2q12.1, 16p11.2p11.1 y 20q11.21q11.23 (IGSR 2020, Haraksingh *et al.* 2017). Esta información permite descartar la posibilidad de que existan genes que, al expresarse de manera autosómica recesiva, generen alguna ventaja entre los

individuos aneuploides que nacen sobre los que no lo logran, o incluso que promuevan la pérdida temprana de estos productos (Pajusalu *et al.* 2015).

Las CNV son variantes genómicas, que se ha reconocido desde hace algunos años y confieren una alta variabilidad entre los individuos (Iafate *et al.* 2004, Sebat *et al.* 2004, Feuk *et al.* 2006). En 2010, un estudio en el que reportan CNV mayores a 1 kb realizado en 450 muestras del HapMap (180 CEU, 180 YRI, 45 JPT y 45 CHB), reportó la CNV en la región 14q32.33 con una frecuencia menor al 1%, y en 2p11.2, 8p11.22 y 15q11.2 con una frecuencia cercana al 5% de las muestras analizadas (Conrad *et al.* 2010).

Más tarde, en el proyecto de los 1000 genomas en fase 3, realizado en 2015, se incluyó a 2504 individuos sanos, de los cuales 64 de ellos eran individuos con ascendencia mexicana residentes en Los Ángeles, California (MXL), quienes representan sólo el 2.5% del total de la muestra analizada (Sudmant *et al.* 2015); en este estudio se encontraron bajas frecuencias para la CNV en 2p11.2, 8p11.22, 14q32.33 y 15q11.2, similar a lo reportado por Conrad y colaboradores en 2010 (Conrad *et al.* 2010).

Ahora sabemos que en la ocurrencia de CNV hay amplias diferencias según la etnia que se estudia, como sucede con otras variantes polimórficas como como SNP o microsatélites (Li *et al.* 2009). Además, las frecuencias pueden variar según la plataforma de microarreglos utilizada y los algoritmos para el llamado de CNV (Pinto *et al.* 2011, Wang *et al.* 2015, Haraksingh *et al.* 2017, Godoy *et al.* 2020).

Los resultados aquí presentados se basan en la plataforma de microarreglos Affymetrix y se analizaron usando el software predeterminado proporcionado por la plataforma, con anotaciones Affymetrix NetAffx 33.1. Este flujo de trabajo es el que se utiliza para encontrar CNV para estudios clínicos y de investigación en México y en

varios otros países, sin embargo, dentro de los genomas de referencia de este software, hay poca representación de la población latinoamericana.

Existen estudios que reportan la asociación de algunos de los polimorfismos aquí presentados, a condiciones patológicas (Purwar *et al.* 2021, Ambele *et al.* 2020, Wijesiriwardhana *et al.* 2021); como lo reportado respecto a cambios en el número de copias del *locus* 14q32.33, relacionando este CNV con patologías como cáncer colorrectal hereditario en población de Sri Lanka (Wijesiriwardhana *et al.* 2021), donde observaron pérdidas y ganancias en esta región. En otro estudio se reportó amplificación de los loci 14q32.2 y 20q11.22 en 4 de 5 tumores orales de carcinoma de células escamosas de pacientes de Sudáfrica estudiados, sin poder establecer un papel claro en el proceso neoplásico (Ambele *et al.* 2020).

En un estudio realizado en la Universidad Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, se evaluó la expresión del lncRNA KIAA0125, ubicado en 14q32.33, se reportó una sobreexpresión de este gen en tejidos de pacientes con ameloblastoma, que es un tumor odontogénico benigno y (Diniz *et al.* 2019), aunque no se consideró el origen étnico de los pacientes que proporcionaron estas muestras, es probable que, al tratarse de población brasileña, el aumento en la expresión basal de *KIAA0125* se deba a la ganancia de copias en el locus 14q32.33 a causa del origen mestizo y no necesariamente estar involucrado en la patobiología del ameloblastoma.

En 2020 Godoy y colaboradores, identificaron una CNV obtenida por tres diferentes plataformas de microarreglos, de una población brasileña, reportaron la ganancia en 14q32.33, presente en el 97.8% de las muestras que estudiaron, esta frecuencia es muy parecida al 100% que se reporta en este estudio. De manera interesante, los orígenes de la población brasileña y la mexicana tienen en común el mestizaje que ocurrió con población ibérica, quienes conquistaron ambas poblaciones

hace siglos; en este trabajo lo anterior quedó demostrado gracias a la comparación con población ibérica como referencia, en el segundo llamado de la CNV que se realizó por medio de CRMA, en donde la ganancia de la CNV en 14q32.33 se encontró reducida e incluso no apareció como ganancia de número de copias.

Los hallazgos presentados en este estudio son importantes, primero por la descripción de una CNV común en la población mexicana y segundo, porque al ser los microarreglos ampliamente utilizados para diagnóstico e investigación, el hallazgo de una de estas CNV puede ser malinterpretado, ya que en las bases de datos de referencia internacional la población mexicana, y en general la mestiza latinoamericana está poco representada; por lo que este trabajo es un claro ejemplo de por qué el análisis de CNV debe llevarse a cabo utilizando una referencia étnicamente apropiada. La importancia de esto se está reconociendo más ampliamente, como consecuencia de esto hay un esfuerzo consciente por incluir grupos étnicos más diversos en las grandes bases de datos de referencia como HapMap (IGSR 2020). Esta política inclusiva es fundamental para tener una representación más precisa del genoma humano.

10. CONCLUSIONES

En el presente estudio se encontró que el mosaicismo no es un factor relevante para que un feto con aneuploidía pueda llegar a término, como generalmente se considera en la literatura.

No fue posible encontrar una relación clara entre la supervivencia de los pacientes con aneuploidías y las pérdidas y ganancias detectadas por medio de la estrategia de mezclas ó pools de DNA de NV vs AE. Los genes involucrados en estas diferencias genéticas nos hablan del descontrol de muchos procesos biológicos,

afectados quizás por el desbalance en la homeostasis genómica que conlleva la aneuploidía misma.

Las variantes genómicas de tipo CNV tienen frecuencias que varían según el grupo étnico estudiado. Se detectaron cuatro CNVs 2p11.2, 8p11.22, 14q32.33 y 15q11.2, con alta frecuencia en población mestiza mexicana al contrastar con la referencia HapMap (ChAS), mientras que al utilizar como referencia una población étnicamente relacionada, las diferencias se reducen o desaparecen. Resalta la importancia de analizar la CNV de los individuos estudiados, con un grupo de referencia que, en la medida de lo posible, compartan el mismo origen geográfico. Estos hallazgos contribuyen a una mejor descripción de las CNV características de la población mestiza-mexicana, para tener conocimiento de la variación del genoma en diferentes grupos étnicos, y son útiles para evitar falsas asociaciones de CNV con condiciones patológicas.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Hassold T y Hunt P. To err meiotically is human. The genesis of human aneuploidy. *Nature Rev* 2001, 2:280-291

Vorsanova SG, Kolotii AD, Iourov IY, Monakhov VV, Kirillova EA, Soloviev IV, Yorov YB. Evidence for high frequency of chromosomal mosaicism in spontaneous abortions revealed by interphase FISH analysis. *J Histochem Cytochem* (2005) 53:375-380

Fritz B, Hallermann C, Olert J, Fuchs B, Bruns M, Aslan M et al. Cytogenetic analyses of culture failures by comparative genomic hybridization (CGH). Re-evaluation of chromosome aberration rates in early spontaneous abortions. *Eur J Hum Genet* (2001) 9:539–547

Levedev IN, Ostroverkhova V, Nikitina TV, Surkhanova NN, Nazarenko SA. Cultures of chromosomal abnormalities in spontaneous abortion cell culture failures detected by interphase FISH analysis. *E J Hum Genet* (2004) 12:513-520

Moore GE, Ruangvutilert P, Chatzimeletiou K, Bell G, Chen CK, Johnson P, Harper JC. Examination of trisomy 13, 18 and 21 foetal tissues at different gestational ages using FISH. *Eur J Hum Genet*. 2000 Mar;8(3):223-8. doi: 10.1038/sj.ejhg.5200436. PMID: 10780789.

Hassold T. The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Hum Mol Genet* (2007) 16:203-208.

Delhanty JD. Mechanisms of aneuploidy induction in human oogenesis and early embryogenesis. *Cytogenet Genome Res*. (2005) 111(3-4):237-44.

Jingly F. Weiera,b, Heinz-Ulrich G. Weierb, Christine J. Jungc, Matthew Gormleya, Yan Zhouc, Lisa W. Chub, Olga Genbacevc, Alexi A. Wrightc, Susan J. Fisher. Human cytotrophoblasts acquire aneuploidies as they differentiate to an invasive phenotype. *Developmental Biology*. (2005) 279:420–432

Gardner-McKinlay RJ, Sutherland GR, Shaffer LG. *Chromosome Abnormalities and genetic counseling*. 4th edition. Oxford University Press. 2012, 634pp.

Gersen S y Keagle M: *The principles of Clinical Cytogenetics*. 2nd Ed. New Jersey; Human Press. 2005

Bakhoun SF y Compton DA. Kinetochores and disease: keeping microtubule dynamics in check! *Current Opinion in Cell Biology* (2012) 24:64–70

Williams GL, Roberts TM, Gjoerup OV. Bub1. Escapades in a Cellular World. *Cell Cycle* (2007) 6:14, 1699-1704.

Watanabe Y. Sister chromatid cohesion along arms and at centromeres. *TRENDS in Genetics*. (2005) 21(7):405-412.

Wang X y Dai W. Shugoshin, a guardian for sister chromatid segregation. *Experimental Cell Research* (2005)310: 1 – 9.

Webster A y Schuh M. Mechanisms of Aneuploidy in Human Eggs. *Trends Cell Biol*. 2017 Jan;27(1):55-68. doi: 10.1016/j.tcb.2016.09.002. Epub 2016 Oct 20. PMID: 27773484.

Sherman SL, Allen EG, Bean LH, and SB Freeman. Epidemiology of Down syndrome. *Mental retardation and developmental disabilities research reviews*. (2007) 13: 221 – 227.

Huete-García A y Otaola-Barranquero M. Demographic Assessment of Down Syndrome: A Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2021 Jan 5;18(1):352. doi: 10.3390/ijerph18010352. PMID: 33466470; PMCID: PMC7796484.

Freeman JL, Perry GH, Feuk L, Redon R, McCarroll SA, Altshuler DM, Aburatani H, Jones KW, Tyler-Smith C, Hurles ME, Carter NP, Scherer SW, Lee C. Copy number variation: new insights in genome diversity. *Genome Res*. 2006;16(8):949–61. <https://doi.org/10.1101/gr.3677206>.

Cassidy SB y Allanson JE. *Management of Genetic Syndromes, Third Edition*, Fohn Wiley & Sons, Inc, 2010.

Goel N, Morris JK, Tucker D, de Walle HEK, Bakker MK, Kancherla V, Marengo L, Canfield MA, Kallen K, Lelong N, Camelo JL, Stallings EB, Jones AM, Nance A, Huynh MP, Martínez-Fernández ML, Sipek A, Pierini A, Nembhard WN, Goetz D, Rissmann A, Groisman B, Luna-Muñoz L, Szabova E, Lapchenko S, Zarante I, Hurtado-Villa P, Martinez LE, Tagliabue G, Landau D, Gatt M, Dastgiri S, Morgan M. Trisomy 13 and 18-Prevalence and mortality-A multi-registry population based analysis. *Am J Med Genet A*. 2019 Dec;179(12):2382-2392. doi: 10.1002/ajmg.a.61365. Epub 2019 Sep 30. PMID: 31566869; PMCID: PMC6848757.

Holmgren C y Lacoursiere DY. The use of prenatal ultrasound for the detection of fetal aneuploidy. *Clinical Obstetrics and Gynecology*. (2008) 51(1): 48–61r.

Bugge M, Collins A, Hertz JM, Eiberg H, Lundsteen C, Brandt CA, Bak M, Hansen C, deLozier CD, Lespinasse J, Tranebjaerg L, Hahnemann JMD, Rasmussen K, Bruun-Petersen G, Duprez L, Tommerup N, Petersen MB, Non-disjunction of chromosome 13, *Human Molecular Genetics*, Volume 16, Issue 16, 15 August 2007, Pages 2004–2010, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm148>

Hall HE, Chan ER, Collins A, Judis L, Shirley S, Surti U, Hoffner L, Cockwell AE, Jacobs PA, Hassold TJ. The origin of trisomy 13. *Am J Med Genet A*. 2007 Oct 1;143A(19):2242-8. doi: 10.1002/ajmg.a.31913. PMID: 17853475.

Barrientos-Rios R, Frias S, Velázquez-Aragón JA, Villaroel CE, Sánchez S, Molina B, Martínez A, Carnevale A, García-de-Teresa B, Bonilla E, Alvarado-Araiza CD, Valderrama-Hernández A, Ríos-Gallardo PT, Calzada-León R, Altamirano-Bustamante N, Torres L. Low bone mineral density and renal malformation in Mexican patients with Turner syndrome are associated with single nucleotide variants in vitamin D-metabolism genes. *Gynecol Endocrinol*. 2019 Sep;35(9):772-776. doi: 10.1080/09513590.2019.1582626. Epub 2019 Mar 19. PMID: 30887870.

Steiner M, y Saenger P. Turner Syndrome: An Update. *Adv Pediatr*. 2022 Aug;69(1):177-202. doi: 10.1016/j.yapd.2022.03.004. Epub 2022 Jun 17. PMID: 35985709.

Urbach A y Benveni N. Studying early lethality of 45,X0 (Turner's Syndrome) embryos using human embryonic stem cells. *PLoS ONE* (2009) 4: e4175

Hook EB y Warburton D. Turner syndrome revisited: review of new data supports the hypothesis that all viable 45,X cases are cryptic mosaics with a rescue cell line, implying an origin by mitotic loss. *Hum Genet*. 2014 Apr;133(4):417-24. doi: 10.1007/s00439-014-1420-x. Epub 2014 Jan 30. PMID: 24477775.

Lyapunova NA, Porokhovnik LN, Kosyakova NV, Mandron IA, Tsvetkova TG. Effects of the copy number of ribosomal genes (genes for rRNA) on viability of subjects with chromosomal abnormalities. *Gene*. 2017 May 5; 611:47-53. doi: 10.1016/j.gene.2017.02.027. Epub 2017 Feb 27. PMID: 28249771.

Iafate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet*. 2004;36(9):949–51. <https://doi.org/10.1038/ng1416>.

Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, Månér S, Massa H, Walker M, Chi M, Navin N, Lucito R, Healy J, Hicks J, Ye K, Reiner A, Gilliam TC,

Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet.* 2006; 7:85–97. <https://doi.org/10.1038/nrg1767>.

Hujoel MLA, Sherman MA, Barton AR, Mukamel RE, Sankaran VJ, Terao C, Loh PR. Influences of rare copy-number variation on human complex traits. *Cell Cell.* 2022; 185:4233–48. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.09.028>.

Scherer SW, Lee C, Birney E, Altshuler DM, Eichler EE, Carter NP, Hurles ME, Feuk L. Challenges and standards in integrating surveys of structural variation. *Nat Genet.* 2007;39(7):7–15. <https://doi.org/10.1038/ng2093>.

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;464(7289):704-12. <https://doi.org/10.1038/nature08516>

Ionita-Laza I, Rogers AJ, Lange C, Raby BA, Lee C. Genetic association analysis of copy number variation (CNV) in human disease pathogenesis. *Genomics.* 2009;93(1):22–6. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2008.08.012>.

Zarrei M, MacDonald JR, Merico D, Scherer SW. A copy number variation map of the human genome. *Nat Rev Genet.* 2015; 16:172–83. <https://doi.org/10.1038/nrg3871>.

Hehir-Kwa JY, Pfundt R, Veltman JA, de Leeuw N. Pathogenic or not? Assessing the clinical relevance of copy number variants. *Clin Genet.* 2013;84(5):415–21. <https://doi.org/10.1111/cge.12242>.

Rooney ER, Andersen EF, Cherry AM, Kantarci S, Kearney H, Patel A, Raca G, Ritter DI, South ST, Thorland EC, Pineda-Alvarez D, Aradhya S, Martin CL. Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen). *Genet Med.* 2020; 22:245–57. <https://doi.org/10.1038/s41436-019-0686-8>.

Wellcome Trust Case Control Consortium, Craddock N, Hurles ME, Cardin N, Pearson RD, Plagnol V, Robson S, Vukcevic D, Barnes C, Conrad DF, Giannoulatou E, Holmes C, Marchini JL, Stirrups K, Tobin MD, Wain LV, Yau C, Aerts J, Ahmad T, Andrews TD, Arbury H, Attwood A, Auton A, Ball SG, Balmforth AJ, Barrett JC, Barroso I, Barton A, Bennett AJ, Bhaskar S, Blaszczyk K, Bowes J, Brand OJ,

Braund PS, Bredin F, Breen G, Brown MJ, Bruce IN, Bull J, Burren OS, Burton J, Byrnes J, Caesar S, Clee CM, Coffey AJ, Connell JM, Cooper JD, Dominiczak AF, Downes K, Drummond HE, Dudakia D, Dunham A, Ebbs B, Eccles D, Edkins S, Edwards C, Elliot A, Emery P, Evans DM, Evans G, Eyre S, Farmer A, Ferrier IN, Feuk L, Fitzgerald T, Flynn E, Forbes A, Forty L, Franklyn JA, Freathy RM, Gibbs P, Gilbert P, Gokumen O, Gordon-Smith K, Gray E, Green E, Groves CJ, Grozeva D, Gwilliam R, Hall A, Hammond N, Hardy M, Harrison P, Hassanali N, Hebaishi H, Hines S, Hinks A, Hitman GA, Hocking L, Howard E, Howard P, Howson JM, Hughes D, Hunt S, Isaacs JD, Jain M, Jewell DP, Johnson T, Jolley JD, Jones IR, Jones LA, Kirov G, Langford CF, Lango-Allen H, Lathrop GM, Lee J, Lee KL, Lees C, Lewis K, Lindgren CM, Maisuria-Armer M, Maller J, Mansfield J, Martin P, Massey DC, McArdle WL, McGuffin P, McLay KE, Mentzer A, Mimmack ML, Morgan AE, Morris AP, Mowat C, Myers S, Newman W, Nimmo ER, O'Donovan MC, Onipinla A, Onyiah I, Ovington NR, Owen MJ, Palin K, Parnell K, Pernet D, Perry JR, Phillips A, Pinto D, Prescott NJ, Prokopenko I, Quail MA, Rafelt S, Rayner NW, Redon R, Reid DM, Renwick, Ring SM, Robertson N, Russell E, St Clair D, Sambrook JG, Sanderson JD, Schuilenburg H, Scott CE, Scott R, Seal S, Shaw-Hawkins S, Shields BM, Simmonds MJ, Smyth DJ, Somaskantharajah E, Spanova K, Steer S, Stephens J, Stevens HE, Stone MA, Su Z, Symmons DP, Thompson JR, Thomson W, Travers ME, Turnbull C, Valsesia A, Walker M, Walker NM, Wallace C, Warren-Perry M, Watkins NA, Webster J, Weedon MN, Wilson AG, Woodburn M, Wordsworth BP, Young AH, Zeggini E, Carter NP, Frayling TM, Lee C, McVean G, Munroe PB, Palotie A, Sawcer SJ, Scherer SW, Strachan DP, Tyler-Smith C, Brown MA, Burton PR, Caulfield MJ, Compston A, Farrall M, Gough SC, Hall AS, Hattersley AT, Hill AV, Mathew CG, Pembrey M, Satsangi J, Stratton MR, Worthington J, Deloukas P, Duncanson A, Kwiatkowski DP, McCarthy MI, Ouwehand W, Parkes M, Rahman N, Todd JA, Samani NJ, Donnelly P. Genome-wide association study of CNV in 16,000 cases of eight common diseases and 3000 shared controls. *Nature*. 2010; 464(7289):713–20. <https://doi.org/10.1038/nature08979>

Mazina V, Gerds J, Trinh S, Ankenman K, Ward T, Dennis MY, Girirajan S, Eichler EE, Bernier R. Epigenetics of autism-related impairment: copy number variation and maternal infection. *J Dev Behav Pediatr*. 2015;36(2):61.

Pajusalu S, Žilina O, Yakoreva M, Tammur P, Kuuse K, Mõlter-Väär T, Nõukas M, Reimand T, Õunap K. The Diagnostic Utility of Single Long Contiguous Stretches of Homozygosity in Patients without Parental Consanguinity. *Mol Syndromol*. 2015 Sep;6(3):135-40. doi: 10.1159/000438776. Epub 2015 Aug 15. PMID: 26733775; PMCID: PMC4698626.

Li R y Zhu J. Effects of aneuploidy on cell behaviour and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2022 Apr;23(4):250-265. doi: 10.1038/s41580-021-00436-9. Epub 2022 Jan 5. PMID: 34987171.

Del Castillo RV, Uranga HR, Zafra de la RG. 2019. *Genética clínica*. Cd. Mx. México. 2da. Edición. Ed. Manual Moderno. 651pp.

Hoang S, Ahn J, Mann K, Bint S, Mansour S, Homfray T, Mohammed S, Ogilvie CM. Detection of mosaicism for genome imbalance in a cohort of 3,042 clinical cases using an oligonucleotide array CGH platform. *Eur J Med Genet*. 2011 Mar-Apr;54(2):121-9. doi: 10.1016/j.ejmg.2010.10.010. Epub 2010 Nov 5. PMID: 21056703.

Yurov YB, Iourov IY, Vorsanova SG, Liehr T, Kolotii AD, Kutsev SI, Pellestor F, Beresheva AK, Demidova IA, Kravets VS, Monakhov VV, Soloviev IV. Aneuploidy and confined chromosomal mosaicism in the developing human brain. *PLoS One*. 2007 Jun 27;2(6):e558. doi: 10.1371/journal.pone.0000558. PMID: 17593959; PMCID: PMC1891435.

Vorsanova SG, Yurov YB, Iourov IY. Human interphase chromosomes: a review of available molecular cytogenetic technologies. *Mol Cytogenet*. 2010 Jan 11; 3:1. doi: 10.1186/1755-8166-3-1. PMID: 20180947; PMCID: PMC2830939.

Sevilla-Montoya R, Zavaleta-Abreu MJ, Queipo G, Sanchez S, Frias S, Hidalgo-Bravo A, Grether-González P. Unravelling complex mosaicism of sex chromosomes in a patient with primary amenorrhea through cytogenetic analysis on urothelial cells. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2021 May;60(3):526-529. doi: 10.1016/j.tjog.2021.03.025. PMID: 33966741.

Xue J, Dominguez Rieg JA, Thomas L, White JR, Rieg T. Intestine-Specific NHE3 Deletion in Adulthood Causes Microbial Dysbiosis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 May 26; 12:896309. doi: 10.3389/fcimb.2022.896309. PMID: 35719363; PMCID: PMC9204535.

Wu Z, Zhong M, Li M, Huang H, Liao J, Lu A, Guo K, Ma N, Lin J, Duan J, Liu L, Xu F, Zhong Z, Chen J. Mutation Analysis of Pre-mRNA Splicing Genes PRPF31, PRPF8, and SNRNP200 in Chinese Families with Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. *Curr Mol Med*. 2018;18(5):287-294. doi: 10.2174/1566524018666181024160452. PMID: 30360737

Cao D, Xue J, Huang G, An J, An W. The role of splicing factor PRPF8 in breast cancer. *Technol Health Care*. 2022;30(S1):293-301. doi: 10.3233/THC-THC228028. PMID: 35124606; PMCID: PMC9051661.

Eswaran J, Soundararajan M, Knapp S. Targeting group II PAKs in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2009 Jun;28(1-2):209-17. doi: 10.1007/s10555-008-9181-4. PMID: 19160016.

Yuan Y, Zhang H, Li D, Li Y, Lin F, Wang Y, Song H, Liu X, Li F, Zhang J. PAK4 in cancer development: Emerging player and therapeutic opportunities. *Cancer Lett.* 2022 Oct 1; 545:215813. doi: 10.1016/j.canlet.2022.215813. Epub 2022 Jul 4. PMID: 35798086

Tang L, Gao Y, Li T. Pan-cancer analysis identifies the immunological and prognostic role of PAK4. *Life Sci.* 2023 Jan 1; 312:121263. doi: 10.1016/j.lfs.2022.121263. Epub 2022 Dec 2. PMID: 36470541.

Yang J, Li J, Le Y, Zhou C, Zhang S, Gong Z. PFKL/miR-128 axis regulates glycolysis by inhibiting AKT phosphorylation and predicts poor survival in lung cancer. *Am J Cancer Res.* 2016 Jan 15;6(2):473-85. PMID: 27186417; PMCID: PMC4859674.

Wolf S, Janzen A, Vékony N, Martiné U, Strand D, Closs EI. Expression of solute carrier 7A4 (SLC7A4) in the plasma membrane is not sufficient to mediate amino acid transport activity. *Biochem J.* 2002 Jun 15;364(Pt 3):767-75. doi: 10.1042/BJ20020084. PMID: 12049641; PMCID: PMC1222626.

Dubyak GR. Go it alone no more--P2X7 joins the society of heteromeric ATP-gated receptor channels. *Mol Pharmacol.* 2007 Dec;72(6):1402-5. doi: 10.1124/mol.107.042077. Epub 2007 Sep 25. PMID: 17895406.

Zhao S, Zhao Y, Wang Q, Li Z, Ma X, Wu L, Li W, Du M, Ji H, Qin G. LDOC1 is differentially expressed in thyroid cancer and display tumor-suppressive function in papillary thyroid carcinoma. *Cell Biol Int.* 2020 Apr;44(4):985-997. doi: 10.1002/cbin.11295. Epub 2020 Jan 17. PMID: 31889386.

Zendman AJ, Cornelissen IM, Weidle UH, Ruiters DJ, van Muijen GN. CTp11, a novel member of the family of human cancer/testis antigens. *Cancer Res.* 1999 Dec 15;59(24):6223-9. PMID: 10626816.

Salvatorelli L, Puzzo L, Russo A, Reibaldi M, Longo A, Ragusa M, Aldo C, Rappazzo G, Caltabiano R, Salemi M. Immunoexpression of SPANX-C in metastatic uveal melanoma. *Pathol Res Pract.* 2019 Jul;215(7):152431. doi: 10.1016/j.prp.2019.04.023. Epub 2019 Apr 29. PMID: 31072624.

Lacombe ML, Milon L, Munier A, Mehus JG, Lambeth DO. The human Nm23/nucleoside diphosphate kinases. *J Bioenerg Biomembr.* 2000 Jun;32(3):247-58. doi: 10.1023/a:1005584929050. PMID: 11768308.

Liu P, Choi YK, Qi RZ. NME7 is a functional component of the γ -tubulin ring complex. *Mol Biol Cell.* 2014 Jul 1;25(13):2017-25. doi: 10.1091/mbc.E13-06-0339. Epub 2014 May 7. PMID: 24807905; PMCID: PMC4072575.

Vijay S, Chiu M, Dacks JB, Roberts RC. Exclusive expression of the Rab11 effector SH3TC2 in Schwann cells links integrin- α 6 and myelin maintenance to Charcot-Marie-Tooth disease type 4C. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Jul;1862(7):1279-90. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.04.003. Epub 2016 Apr 9. PMID: 27068304; PMCID: PMC4879868.

Garzon R, Garofalo M, Martelli MP, Briesewitz R, Wang L, Fernandez-Cymering C, Volinia S, Liu CG, Schnittger S, Haferlach T, Liso A, Diverio D, Mancini M, Meloni G, Foa R, Martelli MF, Mecucci C, Croce CM, Falini B. Distinctive microRNA signature of acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic mutated nucleophosmin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Mar 11;105(10):3945-50. doi: 10.1073/pnas.0800135105. Epub 2008 Feb 28. PMID: 18308931; PMCID: PMC2268779.

Pan W, Pang LJ, Cai HL, Wu Y, Zhang W, Fang JC. MiR-1294 acts as a tumor suppressor in clear cell renal cell carcinoma through targeting HOXA6. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019 May;23(9):3719-3725. doi: 10.26355/eurrev_201905_17797. PMID: 31114997.

Zhu X, Chen D, Liu Y, Yu J, Qiao L, Lin S, Chen D, Zhong G, Lu X, Wang Y, Wen J, Zhong X, Jiang Y. Long Noncoding RNA HOXA-AS3 Integrates NF- κ B Signaling To Regulate Endothelium Inflammation. *Mol Cell Biol*. 2019 Sep 11;39(19):e00139-19. doi: 10.1128/MCB.00139-19. PMID: 31285272; PMCID: PMC6751633

Yekta S, Shih IH, Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*. 2004 Apr 23;304(5670):594-6. doi: 10.1126/science.1097434. PMID: 15105502.

Matossian M, Warriar R, Kattar N. Concurrent presentations of hereditary spherocytosis and Craniosynostosis syndromes in siblings: a case series. *Clin Pediatr*. 2021:151–3

Wang R, Yang S, Xu M, Huang J, Liu H, Gu W, et al. Exome sequencing confirms molecular diagnoses in 38 Chinese families with hereditary spherocytosis. *Sci China Life Sci*. 2018; 61:947–953. doi: 10.1007/s11427-017-9232-6.

Jilaveanu LB, Parisi F, Barr ML, Zito CR, Cruz-Munoz W, Kerbel RS, Rimm DL, Bosenberg MW, Halaban R, Kluger Y, Kluger HM. PLEKHA5 as a Biomarker and Potential Mediator of Melanoma Brain Metastasis. *Clin Cancer Res*. 2015 May 1;21(9):2138-47. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0861. Epub 2014 Oct 14. PMID: 25316811; PMCID: PMC4397107.

Zhang H, Zhu H, Deng G, Zito CR, Oria VO, Rane CK, Zhang S, Weiss SA, Tran T, Adeniran A, Zhang F, Zhou J, Kluger Y, Bosenberg MW, Kluger HM, Jilaveanu LB.

PLEKHA5 regulates tumor growth in metastatic melanoma. *Cancer*. 2020 Mar 1;126(5):1016-1030. doi: 10.1002/cncr.32611. Epub 2019 Nov 26. PMID: 31769872; PMCID: PMC7147081.

Biederer T. y Südhof T.C. Mints as Adaptors. Direct Binding to Neurexins and Recruitment of Munc18. *J. Biol. Chem.* 2000; 275:39803–39806. doi: 10.1074/jbc.C000656200

Mitchell J.C., Ariff B.B., Yates D.M., Lau K.F., Perkinton M.S., Rogelj B., Stephenson J.D., Miller C.C.J., Mcloughlin D.M. X11beta Rescues Memory and Long-Term Potentiation Deficits in Alzheimer's Disease APPswe Tg2576 Mice. *Hum. Mol. Genet.* 2009; 18:4492–4500. doi: 10.1093/hmg/ddp408

Saitoh T, Hirai M, Katoh M. Molecular cloning and characterization of WNT3A and WNT14 clustered in human chromosome 1q42 region. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Jun 29;284(5):1168-75. doi: 10.1006/bbrc.2001.5105. PMID: 11414706.

Hartmann C y Tabin CJ. Wnt-14 plays a pivotal role in inducing synovial joint formation in the developing appendicular skeleton. *Cell.* 2001 Feb 9;104(3):341-51. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00222-7. PMID: 11239392.

Boer CG, Yau MS, Rice SJ, Coutinho de Almeida R, Cheung K, Styrkarsdottir U, Southam L, Broer L, Wilkinson JM, Uitterlinden AG, Zeggini E, Felson D, Loughlin J, Young M, Capellini TD, Meulenbelt I, van Meurs JB. Genome-wide association of phenotypes based on clustering patterns of hand osteoarthritis identify *WNT9A* as novel osteoarthritis gene. *Ann Rheum Dis.* 2021 Mar;80(3):367-375. doi: 10.1136/annrheumdis-2020-217834. Epub 2020 Oct 14. PMID: 33055079; PMCID: PMC7892373.

Yanagisawa Y, Ito E, Yuasa Y, Maruyama K. The human DNA methyltransferases DNMT3A and DNMT3B have two types of promoters with different CpG contents. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Sep 27;1577(3):457-65. doi: 10.1016/s0167-4781(02)00482-7. PMID: 12359337.

Yan XJ, Xu J, Gu ZH, Pan CM, Lu G, Shen Y, Shi JY, Zhu YM, Tang L, Zhang XW, Liang WX, Mi JQ, Song HD, Li KQ, Chen Z, Chen SJ. Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia. *Nat Genet.* 2011 Mar 13;43(4):309-15. doi: 10.1038/ng.788. PMID: 21399634.

Chu X, Zhong L, Dan W, Wang X, Zhang Z, Liu Z, Lu Y, Shao X, Zhou Z, Chen S, Liu B. DNMT3A R882H mutation drives daunorubicin resistance in acute myeloid leukemia

via regulating NRF2/NQO1 pathway. *Cell Commun Signal*. 2022 Oct 27;20(1):168. doi: 10.1186/s12964-022-00978-1. PMID: 36303144; PMCID: PMC9615155.

Van Heemst J, Hensvold AH, Jiang X, van Steenbergen H, Klareskog L, Huizinga TW, van der Helm-van Mil A, Catrina AI, Toes RE, Lundberg K, van der Woude D. Protective effect of HLA-DRB1*13 alleles during specific phases in the development of ACPA-positive RA. *Ann Rheum Dis*. 2016 Oct;75(10):1891-8. doi: 10.1136/annrheumdis-2015-207802. Epub 2015 Dec 29. PMID: 26715653.

Brownlee WJ, Tur C, Manole A, Eshaghi A, Prados F, Miszkiel KA, Wheeler-Kingshott CAG, Houlden H, Ciccarelli O. *HLA-DRB1*1501* influences long-term disability progression and tissue damage on MRI in relapse-onset multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2023 Mar;29(3):333-342. doi: 10.1177/13524585221130941. Epub 2022 Nov 18. PMID: 36398585.

Stillwell R y Bierer BE. T cell signal transduction and the role of CD7 in costimulation. *Immunol Res*. 2001;24(1):31-52. doi: 10.1385/ir:24:1:31. PMID: 11485208.

Rogers SL, Zhao Y, Jiang X, Eaves CJ, Mager DL, Rouhi A. Expression of the leukemic prognostic marker CD7 is linked to epigenetic modifications in chronic myeloid leukemia. *Mol Cancer*. 2010 Feb 22; 9:41. doi: 10.1186/1476-4598-9-41. PMID: 20175919; PMCID: PMC2843654.

Slentz-Kesler KA, Hale LP, Kaufman RE. Identification and characterization of K12 (SECTM1), a novel human gene that encodes a Golgi-associated protein with transmembrane and secreted isoforms. *Genomics*. 1998 Feb 1;47(3):327-40. doi: 10.1006/geno.1997.5151. PMID: 9480746.

Kim KM, Cho H, Choi K, Kim J, Kim BW, Ko YG, Jang SK, Kim YK. A new MIF4G domain-containing protein, CTIF, directs nuclear cap-binding protein CBP80/20-dependent translation. *Genes Dev*. 2009 Sep 1;23(17):2033-45. doi: 10.1101/gad.1823409. Epub 2009 Jul 31. PMID: 19648179; PMCID: PMC2751978.

Chen H, Sandler DP, Taylor JA, Shore DL, Liu E, Bloomfield CD, Bell DA. Increased risk for myelodysplastic syndromes in individuals with glutathione transferase theta 1 (GSTT1) gene defect. *Lancet*. 1996 Feb 3;347(8997):295-7. doi: 10.1016/s0140-6736(96)90468-7. PMID: 8569364.

Fode C, Gradwohl G, Morin X, Dierich A, LeMeur M, Goridis C, Guillemot F. The bHLH protein NEUROGENIN 2 is a determination factor for epibranchial placode-derived sensory neurons. *Neuron*. 1998 Mar;20(3):483-94. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80989-7. PMID: 9539123.

Liu F, Zhang Y, Chen F, Yuan J, Li S, Han S, Lu D, Geng J, Rao Z, Sun L, Xu J, Shi Y, Wang X, Liu Y. Neurog2 directly converts astrocytes into functional neurons in midbrain and spinal cord. *Cell Death Dis.* 2021 Mar 1;12(3):225. doi: 10.1038/s41419-021-03498-x. PMID: 33649354; PMCID: PMC7921562.

Neufeld EJ, Skalnik DG, Lievens PM, Orkin SH. Human CCAAT displacement protein is homologous to the Drosophila homeoprotein, cut. *Nat Genet.* 1992 Apr;1(1):50-5. doi: 10.1038/ng0492-50. PMID: 1301999.

Dermawan JK, Wensel C, Visconte V, Maciejewski JP, Cook JR, Bosler DS. Clinically Significant CUX1 Mutations Are Frequently Subclonal and Common in Myeloid Disorders with a High Number of Co-mutated Genes and Dysplastic Features. *Am J Clin Pathol.* 2022 Apr 1;157(4):586-594. doi: 10.1093/ajcp/aqab157. PMID: 34661647.

Arnesen T, Betts MJ, Pendino F, Liberles DA, Anderson D, Caro J, Kong X, Varhaug JE, Lillehaug JR. Characterization of hARD2, a processed hARD1 gene duplicate, encoding a human protein N-alpha-acetyltransferase. *BMC Biochem.* 2006 Apr 25; 7:13. doi: 10.1186/1471-2091-7-13. PMID: 16638120; PMCID: PMC1475586.

Polevoda B, Arnesen T, Sherman F. A synopsis of eukaryotic Nalpha-terminal acetyltransferases: nomenclature, subunits and substrates. *BMC Proc.* 2009 Aug 4;3 Suppl 6(Suppl 6): S2. doi: 10.1186/1753-6561-3-S6-S2. PMID: 19660095; PMCID: PMC2722095.

Heraud-Farlow JE y Walkley CR. What do editors do? Understanding the physiological functions of A-to-I RNA editing by adenosine deaminase acting on RNAs. *Open Biol.* 2020 Jul;10(7):200085. doi: 10.1098/rsob.200085. Epub 2020 Jul 1.

GSE87048 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE87048> Re bollar-Vega R, Romero-Córdoba S, Rodríguez-Cuevas S, Maffuz-Aziz A, Hidalgo-Miranda A. Analysis of somatic DNA copy number alterations and frequency of breast cancer intrinsic subtypes from Mexican women [copy number]. Contributor(s) Rebollar-Vega R, Romero-Córdoba S, Rodríguez-Cuevas S, Maffuz-Aziz A, Hidalgo-Miranda A Citation(s) Romero-Cordoba SL, Salido-Guadarrama I, Rebollar-Vega R, Bautista-Piña V, Dominguez-Reyes C, Tenorio-Torres A, Villegas-Carlos F, Fernández-López JC, Uribe-Figueroa L, Alfaro-Ruiz L, Hidalgo-Miranda A. Comprehensive omic characterization of breast cancer in Mexican-Hispanic women. *Nat Commun.* 2021;12(1):2245. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22478-5>.

Chaves TF, Oliveira LF, Ocampos M, Barbato IT, de Luca GR, Barbato-Filho JH, de Camargo-Pinto LL, Bernardi P, Maris AF. Long contiguous stretches of homozygosity detected by chromosomal microarrays (CMA) in patients with neurodevelopmental

disorders in the South of Brazil. *BMC Med Genomics*. 2019; 12:50. [https:// doi. org/ 10. 1186/ s12920-019-0496-5](https://doi.org/10.1186/s12920-019-0496-5).

GSE67047 [https:// www. ncbi. nlm. nih. gov/ geo/ query/ acc. cgi? acc= GSE67047](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE67047). Genome-wide association and epistatic studies in sporadic medullary and juvenile papillary thyroid carcinomas. Bleda M, Garcia-Alonso L, Medina I, Gonzalez CY, Fernandez RM, Nuñez-Torres R, Luzon-Toro B, Torroglosa A, Marba M, del Valle Enguix-Riego M, Montaner D, Antiñolo G, Borrego S, Dopazo J. Citation: Luzón-Toro B, Bleda M, Navarro E, García-Alonso L, Ruiz-Ferrer M, Medina I, Martín-Sánchez M, Gonzalez CY, Fernández RM, Torroglosa A, Antiñolo G, Dopazo J, Borrego S. Identification of epistatic interactions through genome-wide association studies in sporadic medullary and juvenile papillary thyroid carcinomas. *BMC Med Genomics*. 2015; 8:83. [https:// doi. org/ 10. 1186/ s12920-015-0160-7](https://doi.org/10.1186/s12920-015-0160-7)

Hook EB. Exclusion of chromosomal mosaicism: tables of 90%, 95% and 99% confidence limits and comments on use. *Am J Hum Genet*. 1977 Jan;29(1):94-7. PMID: 835578; PMCID: PMC1685228.

Capalbo A y Rienzi L. Mosaicism between trophectoderm and inner cell mass. *Fertil Steril*. 2017 May;107(5):1098-1106. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.03.023. Epub 2017 Apr 19. PMID: 28433375.

Shahbazi MN. Mechanisms of human embryo development: from cell fate to tissue shape and back. *Development*. 2020 Jul 17;147(14):dev190629. doi: 10.1242/dev.190629. PMID: 32680920; PMCID: PMC7375473.

Cavadino A y Morris JK. Revised estimates of the risk of fetal loss following a prenatal diagnosis of trisomy 13 or trisomy 18. *Am J Med Genet A*. 2017 Apr;173(4):953-958. doi: 10.1002/ajmg.a.38123. PMID: 28328132.

Antonarakis SE, Skotko BG, Ruffalo MS, Strydom A, Pape SE, Bianchi DW, Sherman SL, Reeves RH. Down syndrome. *Nat Rev Dis Primers*. 2020 Feb 6;6(1):9. doi: 10.1038/s41572-019-0143-7. PMID: 32029743; PMCID: PMC8428796.

Yingjun X, Zhiyang H, Linhua L, Fangming S, Linhuan H, Jinfeng T, Qianying P, Xiaofang S. Chromosomal uniparental disomy 16 and fetal intrauterine growth restriction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2017 Apr; 211:1-7. doi: 10.1016/j.ejogrb.2016.12.019. Epub 2016 Dec 23. PMID: 28157578.

Ijuin A, Ueno H, Hayama T, Miyai S, Miyakoshi A, Hamada H, Sueyoshi S, Tochiara S, Saito M, Hamanoue H, Takeshima T, Yumura Y, Miyagi E, Kurahashi H, Sakakibara H, Murase M. Mitochondrial DNA mutations can influence the post-implantation development of human mosaic embryos. *Front Cell Dev Biol*. 2023 Aug 11;

11:1215626. doi: 10.3389/fcell.2023.1215626. PMID: 37635871; PMCID: PMC10451077.

Purwar N, Tiwari P, Mathur N, Sharma H, Sahlot R, Garg U, Sharma B, Saxena A, Mathur SK. Higher CNV Frequencies in Chromosome 14 of Girls with Turner Syndrome Phenotype. *J Clin Endocrinol Metab.* 2021;106(12):e4935-e4955. [https://doi: 10.1210/clinem/dgab572](https://doi.org/10.1210/clinem/dgab572).

Kearney HM y Kearney JB, Conlin LK. Diagnostic implications of excessive homozygosity detected by SNP-based microarrays: consanguinity, uniparental disomy, and recessive single-gene mutations. *Clin Lab Med.* 2011 Dec;31(4):595-613, ix. [https://doi: 10.1016/j.cll.2011.08.003](https://doi.org/10.1016/j.cll.2011.08.003).

IGSR: The International Genome Sample Resource. Supporting open human variation data. [https:// www. inter natio nalg e nome. org/ dataportal/popul ation](https://www.internationalgenome.org/dataportal/population)
Citation: Susan Fairley, Ernesto Lowy-Gallego, Emily Perry, Paul Flicek, The International Genome Sample Resource (IGSR) collection of open human genomic variation resources. *Nucl Acids Res* 48(D1) 2020:941–947. [https:// doi. org/ 10. 1093/ nar/ gkz836](https://doi.org/10.1093/nar/gkz836)

Haraksingh RR, Abyzov A, Urban AE. Comprehensive performance comparison of high-resolution array platforms for genome-wide Copy Number Variation (CNV) analysis in humans. *BMC Genomics.* 2017;18(1):321. [https://doi: 10.1186/s12864-017-3658-x](https://doi.org/10.1186/s12864-017-3658-x).

Sudmant PH, Rausch T, Gardner-McKinlay EJ, Handsaker RE, Abyzov A, Huddleston J, Zhang Y, Ye K, Jun G, Fritz MH, Konkel MK, Malhotra A, Stütz AM, Shi X, Casale FP, Chen J, Hormozdiari F, Dayama G, Chen K, Malig M, Chaisson MJP, Walter K, Meiers S, Kashin S, Garrison E, Auton A, Lam HYK, Mu XJ, Alkan C, Antaki D, Bae T, Cerveira E, Chines P, Chong Z, Clarke L, Dal E, Ding L, Emery S, Fan X, Gujral M, Kahveci F, Kidd JM, Kong Y, Lameijer EW, McCarthy S, Flicek P, Gibbs RA, Marth G, Mason CE, Menelaou A, Muzny DM, Nelson BJ, Noor A, Parrish NF, Pendleton M, Quitadamo A, Raeder B, Schadt EE, Romanovitch M, Schlattl A, Sebra R, Shabalin AA, Untergasser A, Walker JA, Wang M, Yu F, Zhang C, Zhang J, Zheng-Bradley X, Zhou W, Zichner T, Sebat J, Batzer MA, McCarroll SA; 1000 Genomes Project Consortium, Mills RE, Gerstein MB, Bashir A, Stagle O, Devine SE, Li J, Yang T, Wang L, Yan H, Zhang Y, Guo Y, Pan F, Zhang Z, Peng Y, Zhou Q, He L, Zhu X, Deng H, Levy S, Papasian CJ, Drees BM, Hamilton JJ, Recker RR, Cheng J, Deng HW. Whole genome distribution and ethnic differentiation of copy number variation in caucasian and asian populations. *PLoS ONE.* 2009;4(11):7958. [https:// doi. org/ 10. 1371/ journ al. pone. 0007958](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007958).

Li J, Yang T, Wang L, Yan H, Zhang Y, Guo Y, Pan F, Zhang Z, Peng Y, Zhou Q, He L, Zhu X, Deng H, Levy S, Papasian CJ, Drees BM, Hamilton JJ, Recker RR, Cheng J, Deng HW. Whole genome distribution and ethnic differentiation of copy number variation in caucasian and asian populations. PLoS ONE. 2009;4(11):7958. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007958>.

Pinto D, Darvishi K, Shi X, Rajan D, Rigler D, Fitzgerald T, Lionel AC, Thiruvahindrapuram B, Macdonald JR, Mills R, Prasad A, Noonan K, Gribble S, Prigmore E, Donahoe PK, Smith RS, Park JH, Hurles ME, Carter NP, Lee C, Scherer SW, Feuk L. Comprehensive assessment of array-based platforms and calling algorithms for detection of copy number variants. Nat Biotechnol. 2011; 29(6):512-20. [https://doi: 10.1038/nbt.1852](https://doi.org/10.1038/nbt.1852).

Wang JC, Ross L, Mahon LW, Owen R, Hemmat M, Wang BT, El Naggar M, Kopita KA, Randolph LM, Chase JM, Matas Aguilera MJ, Siles JL, Church JA, Hauser N, Shen JJ, Jones MC, Wierenga KJ, Jiang Z, Haddadin M, Boyar FZ, Anguiano A, Strom CM, Sahoo T. Regions of homozygosity identified by oligonucleotide SNP arrays: evaluating the incidence and clinical utility. Eur J Hum Genet. 2015 May;23(5):663-71. [https://doi: 10.1038/ejhg.2014.153](https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.153).

Godoy VCSM, Teixeira BF, Colovati M, Rodrigues OJH, Moysés- Oliveira M, Melaragno MI. Copy number variation (CNV) identification, interpretation, and database from Brazilian patients. Genet Mol Biol. 2020;43(4):e20190218. [https://doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2019-0218](https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2019-0218).

Ambele MA, van Zyl A, Pepper MS, van Heerden MB, van Heerden WFP. Amplification of 3q26.2, 5q14.3, 8q24.3, 8q22.3, and 14q32.33 Are Possible Common Genetic Alterations in Oral Cancer Patients. Front Oncol. 2020; 10:683. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00683>

Wijesiriwardhana P, Wettasinghe K, Dissanayeke VHW. Copy Number Variants Captured by the Array Comparative Genomic Hybridization in a Cohort of Patients Affected with Hereditary Colorectal Cancer in Sri Lanka: The First CNV Analysis Study of the Hereditary Colorectal Cancer in the Sri Lankan Population. Asian Pac J Cancer Prev. 2021;22(6):1957–1966. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2021.22.6.1957>.

Diniz MG, França JA, Vilas-Boas FAS, de Souza FTA, Calin GA, Gomez RS, Sousa SF, Gomes CC. The long noncoding RNA KIAA0125 is upregulated in ameloblastomas. Pathol Res Pract. 2019;215(3):466-469. [https://doi: 10.1016/j.prp.2018.12.030](https://doi.org/10.1016/j.prp.2018.12.030).

12. ANEXOS.

Artículos publicados, producto de este trabajo.

- A. Sánchez S, Juárez U, Domínguez J, Molina B, Barrientos R, Martínez-Hernández A, Carnevale A, Grether-González P, Mayen DG, Villarroel C, Lieberman E, Yokoyama E, Del Castillo V, Torres L, Frias S. Frequent copy number variants in a cohort of Mexican-Mestizo individuals. *Mol Cytogenet.* 2023 Jan 12;16(1):2. [doi: 10.1186/s13039-022-00631-z](https://doi.org/10.1186/s13039-022-00631-z). PMID: 36631885; PMCID: PMC9835318.

- B. Sevilla-Montoya R, Zavaleta-Abreu MJ, Queipo G, Sanchez S, Frias S, Hidalgo-Bravo A, Grether-González P. Unravelling complex mosaicism of sex chromosomes in a patient with primary amenorrhea through cytogenetic analysis on urothelial cells. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2021 May;60(3):526-529. [doi: 10.1016/j.tjog.2021.03.025](https://doi.org/10.1016/j.tjog.2021.03.025). PMID: 33966741.

RESEARCH

Open Access



Frequent copy number variants in a cohort of Mexican-Mestizo individuals

Silvia Sánchez^{1,2}, Ulises Juárez¹, Julieta Domínguez¹, Bertha Molina¹, Rehotbevely Barrientos¹, Angélica Martínez-Hernández³, Alessandra Carnevale⁴, Patricia Grether-González^{5,9}, Dora Gilda Mayen⁶, Camilo Villarroel⁷, Esther Lieberman⁷, Emiy Yokoyama⁷, Victoria Del Castillo⁷, Leda Torres^{1*} and Sara Frias^{1,8*}

Abstract

Background The human genome presents variation at distinct levels, copy number variants (CNVs) are DNA segments of variable lengths that range from several base pairs to megabases and are present at a variable number of copies in human genomes. Common CNVs have no apparent influence on the phenotype; however, some rare CNVs have been associated with phenotypic traits, depending on their size and gene content. CNVs are detected by microarrays of different densities and are generally visualized, and their frequencies analysed using the HapMap as default reference population. Nevertheless, this default reference is inadequate when the samples analysed are from people from Mexico, since population with a Hispanic genetic background are minimally represented. In this work, we describe the variation in the frequencies of four common CNVs in Mexican-Mestizo individuals.

Results In a cohort of 147 unrelated Mexican-Mestizo individuals, we found that the common CNVs 2p11.2 (99.6%), 8p11.22 (54.5%), 14q32.33 (100%), and 15q11.2 (71.1%) appeared with unexpectedly high frequencies when contrasted with the HapMap reference (ChAS). Yet, while when comparing to an ethnically related reference population, these differences were significantly reduced or even disappeared.

Conclusion The findings in this work contribute to (1) a better description of the CNVs characteristics of the Mexican Mestizo population and enhance the knowledge of genome variation in different ethnic groups. (2) emphasize the importance of contrasting CNVs identified in studied individuals against a reference group that—as best as possible—share the same ethnicity while keeping this relevant information in mind when conducting CNV studies at the population or clinical level.

Keywords CNV, Mexican population, Hispanic population, 2p11.2, 8p11.22, 14q32.33, 15q11.2, Affymetrix SNP6.0

*Correspondence:

Leda Torres
ledatorres@gmail.com
Sara Frias
sarafrias@iibiomedicas.unam.mx

¹ Laboratorio de Citogenética, Instituto Nacional de Pediatría, Insurgentes Sur 3700-C Insurgentes Cuicuilco, P01090 Ciudad de Mexico, México

² Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

³ Laboratorio de Inmunogenómica y Enfermedades Metabólicas, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Ciudad de Mexico, México

⁴ Laboratorio de Enfermedades Mendelianas, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Ciudad de Mexico, México

⁵ Departamento de Genética y Genómica Humana, Instituto Nacional de Perinatología, Ciudad de Mexico, México

⁶ Unidad de Genética Aplicada. Hospital Ángeles Lomas, Huixquilucan, Edo. de México, México

⁷ Genética Humana, Instituto Nacional de Pediatría, Ciudad de Mexico, México

⁸ Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

⁹ Present Address: Centro Médico ABC, Campus Santa Fe, Ciudad de Mexico, México



© The Author(s) 2023. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Background

The human genome presents distinct variations: single nucleotide variants, insertion–deletion of a few nucleotides, repetitive sequences of a variable number of nucleotides, and structural variants. The human genome is 3.1 giga base pairs (Gb) in size, distributed in 23 pairs of chromosomes so that every individual inherits one copy from each parent and has two copies or copy number (CN) $CN=2$ of every *locus* in their cells (except for the X and Y *loci* in males). In 2004, two independent groups, Iafrate and Sebat [1, 2], described for the first time the genome-wide presence of large-scale copy number variations in the human genome; these variants involve gains or losses of several to hundreds of kilobases (kb) of genomic DNA among phenotypically normal individuals, and these copy number variants (CNVs) are an important source of human genomic variation [3]. Common CNVs have a minor allele frequency (MAF) $>5\%$ and no apparent influence on the phenotype. However, some rare CNVs, with $MAF < 1\%$, have been associated with phenotypic traits [4], and a few of them have shown clinical relevance depending on their size, gene content, or when overlap with genes that manifest haploinsufficiency (when CNV is $CN=1$) or triplosensitivity (when CNV is $CN > 2$) [5, 6]. In some occasions, their interaction with additional genetic or environmental factors may influence whether CNVs have a detectable phenotypic effect [7, 8]. CNV represents a significant proportion of the total genetic variability in all human populations [9–11]. A CNV was initially defined as a DNA segment larger than one kb with a variable copy number compared to a reference genome [12]. Nevertheless, this term has extended to all quantitative variations in the genome, including tandem repeats, deletions, and duplications [13].

The accurate detection and interpretation of CNVs are essential for research and clinical diagnostics because CNVs may be a general population variant or associated with pathology [14]. Therefore, it has become increasingly important to detect the presence of common and harmless CNVs within different ethnic groups to avoid misinterpretation of pathological variants.

The Database of Genomic Variants (DGV) was initiated to provide a publicly accessible, comprehensive, and curated catalog of genomic variants [15]. The DGV comprises the CNVs and structural variations found in the genomes of control individuals from worldwide populations. However, only three studies in this database included individuals with Mexican ancestry, and they are the same in all three studies [16–18]. Furthermore, currently it only comprises individuals born in the US with

parents and grandparents of Mexican origin, representing only 3% of the total Mexican population [19].

In general, this could represent an issue since the contribution of the ethnic group is diluted when the entire group is used as a reference.

Therefore, it is necessary to report information on this type, especially for underrepresented populations.

Several methodologies are commonly used for CNV genome-wide study; one of the most robust methods is microarray analysis, mainly when an array contains a high density of probes. Most CNV studies are performed with single nucleotide polymorphism (SNP) microarrays, which, in addition to providing information on CNV in the genome, also provide information at the allele level, highlighting the presence of regions/runs of homozygosity called long contiguous stretches of homozygosity (LCSH) and providing essential clues regarding parental relatedness (consanguinity), uniparental disomy, chromosomal recombination or rearrangements [20, 21].

This work describes the frequency of four common CNVs found using SNP microarrays in unrelated Mexican-Mestizo individuals, who were healthy or had aneuploidies, and in whom structural alterations in their genome was not suspected. The study highlights the frequency variation of these common CNVs depending on the ethnic origin of the population used as reference for comparison.

It is essential to recognize the ethnic differences in the distribution and frequency of CNVs, not only to recognize their contribution to structural chromosomal variation but also to ease recognition of possible associations between CNVs and phenotypic characteristics that may or may not be pathogenic.

Results

We studied the presence of CNV in a population of 147 Mexican-Mestizo individuals, 50 phenotypically normal (MXM, 30 females and 20 males) and 97 patients with aneuploidies (MXM_A, 41 with trisomy 21, 28 with monosomy X, 11 with trisomy 13 and 17 with trisomy 18), which are part of a more extensive study that aims to find genomic differences among these groups. In this first study, we show four CNVs in common among all these groups, with a very high frequency in our population when contrasted with distant populations, as is the mix of the HapMap reference that includes African, Asian, and Caucasian individuals.

Long contiguous stretches of homozygosity

To recognize the presence of inbreeding and consanguinity in our sample population, we analyzed the

Table 1 LSCSH characteristics in the studied population

	% NAT Component	Total Autosomal LSCSH (kb, Avg)	F (Avg)
MXM	67.8	351,930.646	0.01221543
MXM_WBC	NA	1,988,679.847	0.00069027
MXM_A	61.70	17,787.83589	0.0062265

NAT Native American, LSCSH Long-contiguous stretches of homozygosity, Avg average, NA not available, MXM Mexican Mestizo, MXM_WBC Women Breast Cancer, MXM_A Mexican Mestizo with aneuploidy, F Inbreeding Coefficient, shows no kinship

regions with homozygosity or long contiguous stretches of homozygosity (LSCSH) with Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 (GW SNP 6.0). Eighteen of the 50 healthy controls (MXM) studied showed at least one autosomal region with LSCSH. In the aneuploidy group (MXM_A), 73/97 presented at least one autosomal region with LSCSH.

In addition, we analyzed 99 CEL files from 99 blood samples of Mexican women with breast cancer (MXM_WBC) present in public databases, where 75/99 presented at least one autosomal region with LSCSH.

Neither of these LSCSH regions overlaps with the CNV reported in this study, and more than 42% are common LSCSHs, such as the 2q11.1q11.2, 11p11.2p12.1, 16p11.2p11.1, and 20q11.21q11.23 regions previously reported [22–24]. The inbreeding coefficient (F) calculated in the three groups supports the absence of inbreeding or consanguinity (Table 1).

Ancestry

We deduced the ancestry in our MXM and MXM_A groups compared with the Mexican ancestry in Los Angeles CA, USA (MXL) included in the HapMap project (64 Mexican individuals born in the US). First, we noticed that our population (MXM and MXM_A) has almost the same genetic content of European descent from Utah, USA (CEU), Native American (NAT), and Yoruba from Nigeria (YRI), then those studied for the HapMap, with NAT being the most significant contribution, even greater than for MXL, 0.488 vs 0.678 and 0.618, then of Caucasians and finally Africans (Fig. 1).

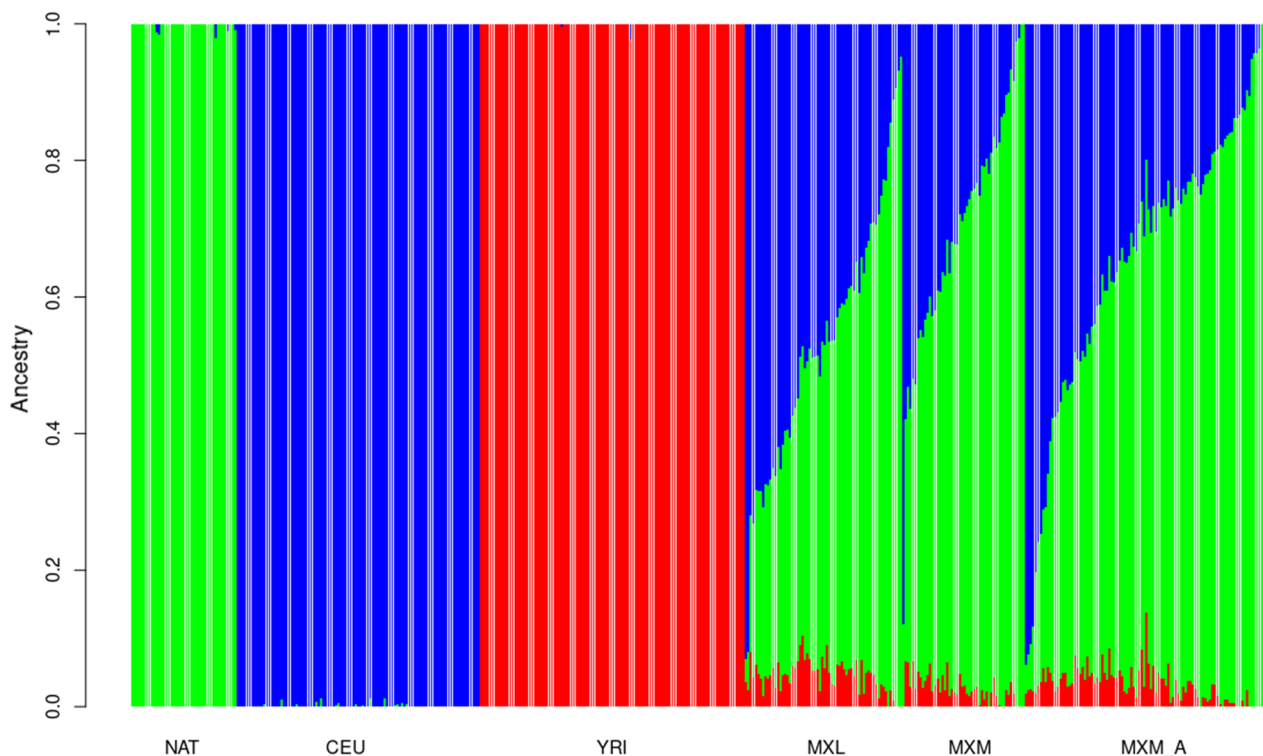


Fig. 1 Ancestry pattern from each contributing population in the Mexican Mestizo Healthy (MXM) and Mexican Mestizo with aneuploidy (MXM_A) groups. Bar plot showing global ancestry of MXM groups deduced with ADMIXTURE. YRI: Yoruba in Ibadan, Nigeria; NAT: Native American; CEU: Caucasian

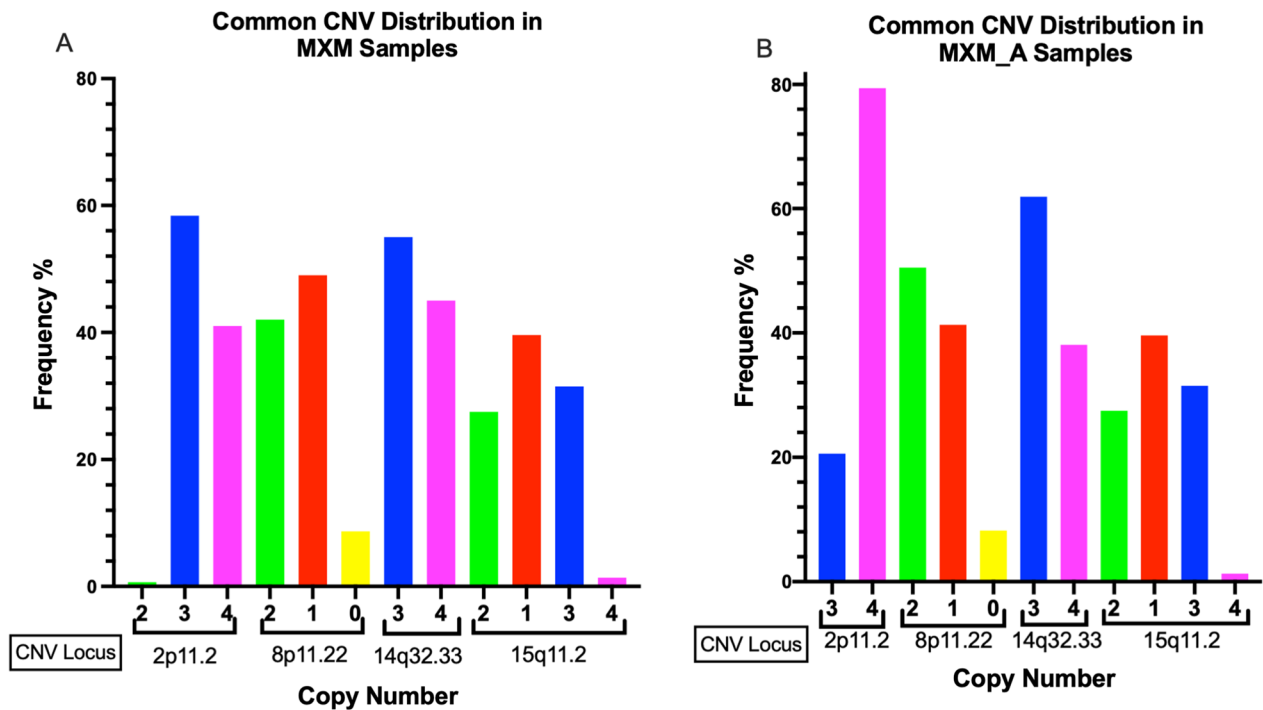


Fig. 2 Distribution of copy number variants (CNVs) frequently found in the Mexican-Mestizo population. **a** Mexican-Mestizo Healthy (MXM). **b** Mexican-Mestizo with aneuploidy (MXM_A)

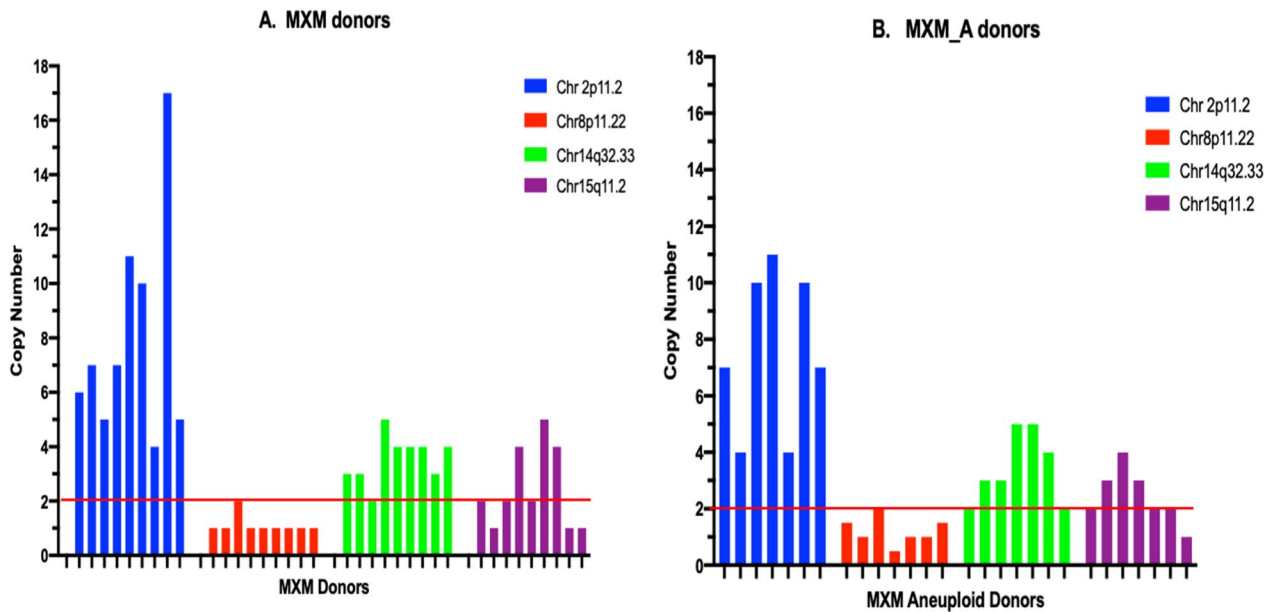


Fig. 3 Validation of copy number variant (CNV) changes at four chromosome *loci* by qPCR. **a** Nine DNA samples from healthy Mexican-Mestizo (MXM) donors and **b** 7 DNA samples from Mexican-Mestizo donors with aneuploidy (MXM_A). The red line shows CN=2

Table 2 Copy number variants with high frequency in Mexican Mestizo individuals

Locus	CN		Healthy tissues		Aneuploid tissues		Total percentage across all studied population	Coordinates (hg19)	Genes located in the region
	MXM (n = 50)	n	MXM_WBC (n = 99)		MXM_A (n = 97)				
			n	Total (Percentage)	n	Total (Percentage)			
2p11.2	3	25 (98%)	62 (100%)	20 (100%)	99.6%	chr2: 89,143,755–92,057,597. 2.9 Mb	IGKV2D-28 (HGNC:5799), IGKV3D-7 (HGNC:5829)		
	4	24 (98%)	37 (100%)	77 (100%)					
8p11.22	1	29 (58%)	44 (57.6%)	40 (49.5%)	54.5%	chr8: 39,230,170–39,386,952. 156,782 bp	ADAM5 (HGNC: 212), ADAM3A (HGNC:209)		
	0	0 (58%)	13 (57.6%)	8 (49.5%)					
14q32.33	3	20 (100%)	62 (100%)	55 (100%)	100%	chr14: 106,078,230–107,100,266. 1.02 Mb	MIR4507 (HGNC:41,642), MIR4538 (HGNC:41,664), MIR4537 (HGNC:41,682), MIR4539 (HGNC:41,546), KIAA0125 (HGNC:1995), ADAM6 (HGNC:213), LINC00226 (HGNC:20,168)		
	4	30 (100%)	37 (100%)	42 (100%)			IGHD (HGNC:5480) IGHG3 (HGNC:5527) IGHG1 (HGNC:5525)		
15q11.2	1	21 (90%)	38 (63.6%)	37 (69%)	71.1%	chr15:2,085,106–22,588,019. 1,735,914 bp	OR4M2-OT1 (HGNC:56,199), LINC02203 (HGNC:53,069), OR4M2 (HGNC:15,373), OR4M4 (NCBI: 283,694), OR4N3P (HGNC:15,375), IGHV1OR15-1 (HGNC:5563), LOC102724760 (NCBI: 102,724,760), IGHV1OR15-3 (HGNC:5565), LOC642131 (NCBI: 642,131), MIR1268A (HGNC:35,336), RERE3 (HGNC:38,797)		
	3	24 (90%)	23 (63.6%)	30 (69%)					
4	4	2							

Copy number variants with high frequency in Mexican-Mestizo population

We found CNV in almost all individuals and in all the chromosomes; however, we observed four polymorphisms that occurred in chromosomes 2 (2.9 megabases (Mb)), 8 (0.15 Mb), 14 (1.02 Mb), and 15 (0.76 Mb) with a high frequency in the general population of Mexican-Mestizo (MXM), in Mexican-Mestizo with aneuploidy (MXM_A), and in the MXM_WBC group (Figs. 2 and 3) (Table 2).

In region 2p11.2 for MXM healthy tissues, there was a gain of 3 and 4 copies, CN=3 in 58% and CN=4 in 41%, respectively, and only one case (0.67%) was CN=2 (Fig. 2a); for MXM_A, 21% of cases presented with CN=3 and 79% with CN=4, with an overall copy gain across all groups of 99.6% (Fig. 2b, Table 2).

For chromosome 8p11.2, almost half of the cases, 42% of MXM and 51% of MXM_A, have CN=2, but 49% MXM and 41% MXM_A have losses with CN=1, and the rest (9% and 8%, respectively) have null CN=0. The frequency of CN ≠ 2 across all the groups is 54.5% (Fig. 2, Table 2).

The CNV located in 14q32.33 is present as CN=3 in 55% of MXM healthy samples and 62% in MXM_A samples and as CN=4 in 45% of MXM and 38% of MXM_A

subjects; there is not a single individual who shows CN=2, 100% of individuals presented with gain in this region (Table 2, Fig. 2a and b).

Finally, in 15q11.2, approximately 70% of the samples had either gains or losses: 40% and 38% of the MXM healthy tissues and MXM_A samples, respectively, showed loss CN=1, while 31.5% of MXM and 31% of MXM_A had gain with CN=3, giving a frequency of CN ≠ 2 across all the groups of 71.1%.

The common CNV in MXM healthy subjects and tissues observed utilizing HapMap as a population of reference is shown in Fig. 3a.

Validation of CN by qPCR

We performed qPCR to corroborate the CN obtained with GW SNP Array 6.0 and analyzed the gDNA for a representative sample of the individuals studied, including nine MXM individuals and seven MXM_A individuals. With this method, 15 out of 16 samples (93.75%) in *locus* 2p11.2 showed CN from 4 to 17 copies (ChAS only detects up to CN=4). For chromosome 8, locus 8p11.22 A total of 14/16 (87.5%) samples showed < 2 copies. For 14q32.33, we corroborated the gain of the CNV in 13/16 (81.25%) with 3 to 5 copies; for chromosome 15, we found both losses and gains by GW, and we found 4

Table 3 qPCR validation of CNV found with GWAS SNP Array 6.0 in Mexican-Mestizo

ID	2p11.2 chr2: 89,143,755–92,057,597		8p11.22 chr8: 39,230,170–39,386,952		14q32.33 chr14: 106,078,230–107,100,266		15q11.2 chr15: 21,914,540–22,681,064	
	CN Array	CN qPCR	CN Array	CN qPCR	CN Array	CN qPCR	CN Array	CN qPCR
Healthy								
CtrNV03	3	2	1	1	3	2	2	2
CtrNV04	4	7	2	1	4	3	4	1
CtrNV05	3	4	2	1	3	2	2	2
CtrNV07	4	5	1	1	3	3	2	4
CtrNV08	4	6	1	1	4	3	1	2
CtrNV10	4	6	2	1	4	2	1	5
CtrNV11	4	4	1	1	3	3	3	4
CtrNV13	3	17	1	1	3	4	1	1
CtrNV16	4	5	2	1	4	3	1	1
Aneuploid								
NV20T13	4	7	1	1	4	2	3	4
NV31X0	4	4	1	1	3	3	2	ND
NV32T21	3	10	2	ND	3	3	1	ND
NV53T18	3	11	2	1	3	5	3	2
NV56T13	4	4	2	ND	3	ND	3	ND
NV60X0	4	10	2	2	3	5	1	1
NV62T18	4	7	1	1	4	ND	2	ND
NV115X0	4	ND	2	2	3	4	3	3
AE19T18	3	ND	2	ND	4	ND	1	1

ND No DNA available

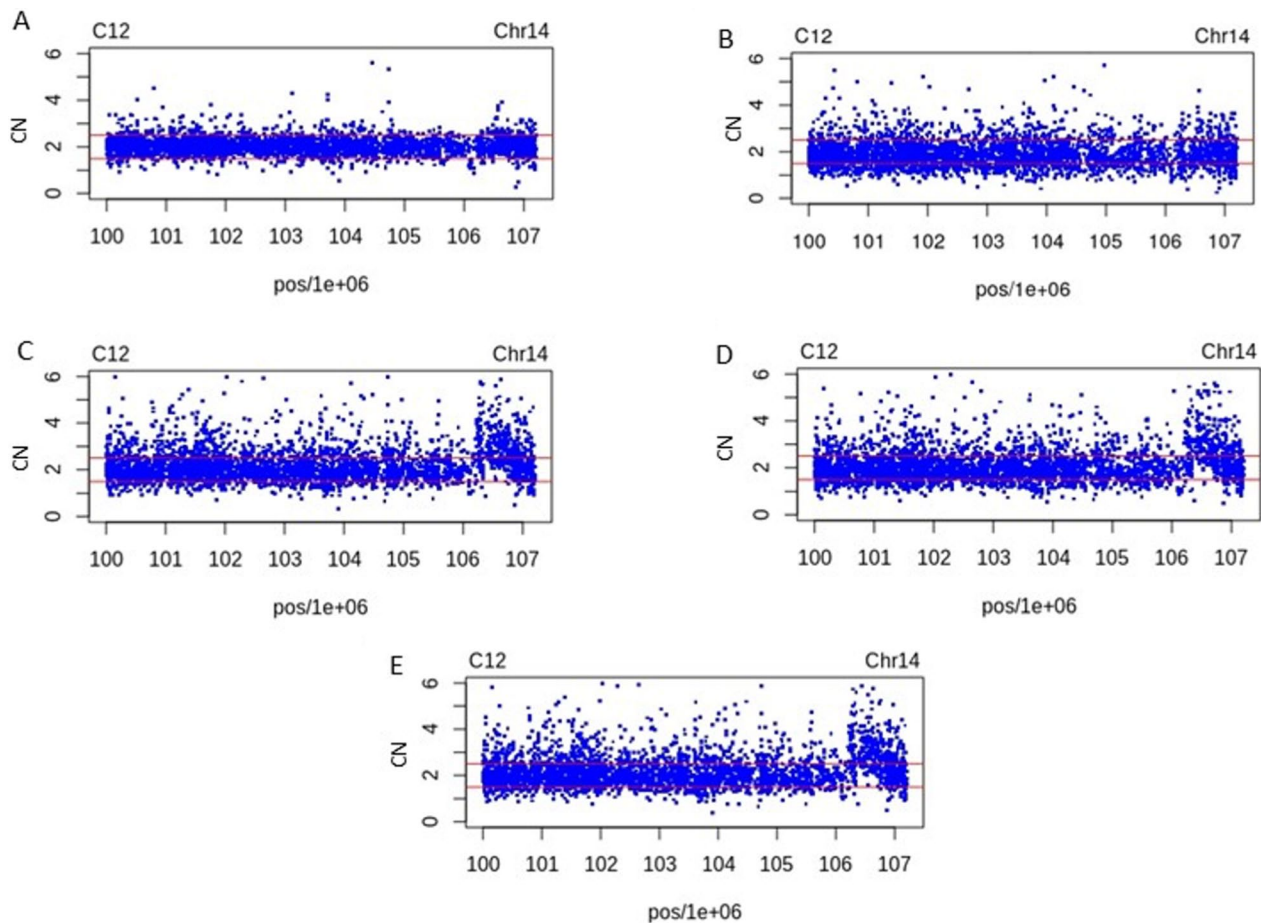


Fig. 4 Copy number (CN) estimates in 14q32.33 for sample C12. **a** CN in the C12 vs. Mexican Mestizo Healthy (MXM) reference. **b** CN in the C12 vs. Iberian population in Spain (IBS) reference. **c** CN in the C12 vs. Caucasian (CEU) reference. **d** CN in C12 vs. Yoruba in Ibadan (YRI) reference. **e** CN in C12 vs. Hapmap reference (CEU + YRI). Note that the CNV in region chr14: 106,078,230–107,100,266 is only noticed when compared with HapMap CEU and YRI samples

patients with loss and 6 with copy gains (25% and 37.5%, respectively) (Table 3, Fig. 3).

CRMA v2 analysis

The CNV found with the Chromosome Analysis Suite (ChAS) was validated with an additional CNV calling method CRMA v2.

We declare the raw data set conformed by 50 MXM CEL files (Genome-Wide Human SNP Array 6.0).

This method could compare the copy number estimates in 14q32.33 for each sample. Figure 4 shows the CNV calling for chromosome 14 in subject C12 in the A) C12 vs MXM reference. B) C12 vs Spanish population (IBS) reference. C) C12 vs CEU reference. D) CN in the C12 vs. YRI reference. E) CN in C12 vs. two populations included in the HapMap reference (CEU + YRI). It is important to note that the difference in CN in our sample depends on the reference used.

It is clear that in A and B, the 14q32.33 region does not show changes with respect to the Mexican and Spanish reference population, emphasizing our Mestizo race formed by Spanish and Native American groups. In contrast, comparisons with CEU, YRI and CEU + YRI make evident a gain of probes located in the chr14:106,078,230–107,100,266 region, showing our racial differences with these populations.

Discussion

In the tested samples, we found four high-frequency CNVs in the following *loci*: 2p11.2, 8p11.22, 14q32.33, and 15q11.2. No genes were found at 2p11.2 or 15q11.2, while the CNV at 8p11.22 included the genes *ADAM5* (HGNC: 212) and *ADAM3A* (HGNC: 209). The 14q32.33 *locus* comprises the genes *KIAA0125* (HGNC: 9834), *ADAM6* (HGNC: 8755), *LINC00226* (HGNC:

338,004), *IGHD* (HGNC:5480), *IGHG3* (HGNC:5527), and *IGHG1* (HGNC:5525); none of these genes has been associated with Mendelian diseases (OMIM) related to genetic dosage (<https://search.clinicalgenome.org/kb/gene-dosage/region/ISCA-37477>), and there are no regulatory sequences that could modify gene expression in any of the regions of the four CNV; neither of our CNV reported overlap with LCSH regions.

Additionally, by searching these specific regions in databases such as the sSMC (small supernumerary marker chromosomes) database <http://cs-tl.de/DB/CA/sSMC/0-Start.html> and the chromosomal heteromorphisms database <http://cs-tl.de/DB/CA/HCM/0-Start.html>, we found no evidence that a number other than CN=2 in the 2p11.2, 8p11.22 and 15q11.2 regions or 14q32.33 duplications is associated with pathology, indicating that numerical variants in these regions have no impact on the phenotype, probably due to the absence of dosage-sensitive genes [25].

The high frequency of some variants could be due to the existence of inbreeding or consanguinity in the population. However, according to our results on the percentage of homozygosity of the LCSH regions and the degree of inbreeding (F value) [26], there is no indication of inbreeding or consanguinity in the studied groups.

CNVs are genomic variants that confer high variability among individuals and have been recognized for several years [1–3]. The first CNV studies were performed in the HapMap collection, which comprises 270 subjects divided into four populations: 90 Yoruba from Ibadan, Nigeria (YRI), 90 European descent from Utah, USA (CEU), 45 Japanese from Tokyo, Japan (JPT) and 45 Han Chinese from Beijing, China (CHB) [4]. In that study, the gDNA was analyzed with 500 K Affymetrix SNP arrays, and the CNV was determined using the software provided by Affymetrix. No individual presented CNVs at 2p11.2, 8p11.22, 14q32.33, or 15q11.2. In 2010, a study of large CNVs (1 kb) performed in 450 samples of HapMap (180 CEU, 180 YRI, 45 JPT and 45 CHB) reported CNV at 14q32.33 with a frequency less than 1% and in 2p11.2, 8p11.22 and 15q11.2 with a frequency near 5% [13].

Later in 2015, the phase 3 1000 genome study included 2504 healthy individuals, only 64 of them (2.5% of the total sample analyzed) were individuals of Mexican descent, and they all were living in Los Angeles, California (MXL) [18]. This study in which Hispanic genomes were underrepresented showed low frequencies for CNVs at 2p11.2, 8p11.22, 14q32.33 and 15q11.2, coincident with the data previously reported by Conrad et al. [13].

Now we know that the CNV rate of occurrence has wide differences according to the ethnic group that is studied, as it occurs with other polymorphic traits such as SNPs or microsatellites [27]. Furthermore, frequencies may vary depending on the microarray platform used and the CNV calling algorithms [20, 28].

The results presented here are based on the Affymetrix microarray platform and were analyzed using Affymetrix software, with Affymetrix annotations NetAffx 33.1, which is the default software provided with this commercial platform. This workflow is the one being used to find CNV for clinical and research studies in Mexico and in several other countries, however, in this software there is little representation of the Latin American population.

In fact, there are studies reporting association of some of the polymorphisms studied, to pathological conditions [29–31]; one of these studies was conducted in Brazil and described the association of CNV gain of the 14q32.33 region with dental tumors [32], the reported copy gain in this 14q32.33 *locus* is as compared to the default reference genome without taking into account possible ethnic differences of the studied population, an ethnic matched reference genome would not have shown gain in this region. Indeed in 2020, Godoy et al. identified a CNV obtained from three different microarray platforms from a Brazilian population to conform the Brazilian CNV database. They found that a 14q32.33 gain was present in 97.8% of the samples studied [33], similar to that found in our study in 100% of the samples. Interestingly, the origins of the Brazilian population and ours have in common the mixture of the Iberian population that conquered us centuries ago.

The foregoing was addressed in this work by CNV calling (CRMA), where a Spanish population was used as reference, with this better-suited ethnical matched reference the gain of the CNV at 14q32.33 was reduced, and even did not appear as copy number gain (Fig. 4a and b).

The findings presented in this study contribute to the description of the frequency of common CNV in the Mexican-Mestizo population. Because microarrays are widely used tools in diagnostic and research contexts, this work is a clear example of why CNVs analysis must be carried out using an ethnically appropriate reference population. The significance of this is being recognized more widely, as a consequence of this there is a conscient effort to include more diverse ethnic groups in the widely used reference databases like HapMap [19]. This inclusive policy is fundamental to have a more accurate representation of the human genome.

Conclusions

We found four CNVs, 2p11.2, 8p11.22, 14q32.33, and 15q11.2, with a high frequency in the Mexican-Mestizo population when contrasted with the HapMap population of reference (ChAS), while when using an ethnically related population as a reference, the differences were reduced or disappeared, highlighting the importance of analyzing the CNVs of the studied individuals with a reference group that (as far as possible) shares the same ethnicity. These findings contribute to a better description of the CNVs characteristics of the Mexican-Mestizo population and enhance the knowledge of genome variation in different ethnic groups.

Methods

Population, samples, and DNA extraction

We included blood samples from subjects with Mexican-Mestizo origin who consented to participating in this study. Fifty were healthy, unrelated volunteers from the general population. All subjects were over 18 years of age, had no history of genetic diseases and at the time of sample donation were not suffering from any infectious disease nor taking any medications (MXM, 30 females and 20 males). All participants had a normal karyotype 46,XX in females and 46,XY in males (20 corroborated by G banding in 25 metaphases, and 30 by chromosome microarray). We also included 97 aneuploid patients (MXM_A, 41 with trisomy 21, 28 with monosomy X, 11 with trisomy 13 and 17 with trisomy 18), with karyotype showing regular trisomy as well as X-monosomy without mosaicism, which was corroborated by interphase FISH (1000 cells analyzed).

Genomic DNA was extracted from the blood samples obtained from the participants with the saline precipitation method (Gentra Puregene Kit, QIAGEN, Venlo, Limburg, NL).

Genome-wide Human SNP arrays

We analyzed the gDNA with the Affymetrix GeneChip® Genome-Wide Human SNP Array 6.0 (Santa Clara, CA, USA). This array contains 906,600 SNP probes and 946,000 nonpolymorphic oligonucleotides; the median intermarker distance over all 1.8 million SNP and copy number markers combined is less than 700 bases.

The procedures for DNA digestion, ligation, PCR amplification, fragmentation, labeling, denaturing and hybridization into the array were performed in 147 DNA samples (two DNA samples were not included because they did not pass quality controls) according to the protocols provided by the supplier. Arrays were stained and washed in the Affymetrix GeneChip Fluidic Station 450 and scanned using an Affymetrix GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). We

analyzed the files obtained with the appropriate bioinformatics tools.

Long contiguous stretches of homozygosity

We visualized the long contiguous stretches of homozygosity (LCSH) in Chromosome Analysis Suite (ChAS) software version 4.1, provided by Affymetrix (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). For the analysis, we used the NetAffx 33 hg19 annotation files (<http://www.affymetrix.com>). For LCSH > 3 Mb, the analysis configuration was set at LOH with marker count = 50 and size = 3000 kb, and for LCSH > 5 Mb, it was set at marker count = 50 and size = 5000 kb.

Estimation of the coefficient of inbreeding (F)

Individual inbreeding coefficients (F) were estimated using LCSH > 3 Mb data; F was the total length of autosomal LCSH in kb divided by the total autosomal size covered by the Genome-Wide Human SNP Array 6.0 (2,881,033,286 kb for hg19). We report the average of the F value for each group. An F value of 0.25 could reflect a first-degree parental relationship, 0.125 a second-degree relationship, 0.0625 a third-degree relationship and 0.03125 a fourth-degree relationship [26].

Additional files

To compare our studied population, we used the following CEL files obtained from Affymetrix GeneChip® Genome-Wide Human SNP Array 6.0 (Santa Clara, CA, USA):

(a) Ninety-nine files from healthy tissues obtained from women with breast cancer (MXM_WBC) [34] from the GEO open database (GSE87048).

Together with the MXM, they will be the Healthy tissues.

(b) 30 Spanish (IBS) files downloaded from GEO data set GSE67047 [35]

(c) 30 Caucasian (CEU) and 10 Yoruba (YRI), part of the population studied in the HapMap project, CEL files kindly provided by Affymetrix/Thermo Fisher.

Ancestry

The MAP and PED files obtained by Genotyping Console software (Affymetrix) were used for the ancestry analysis; we eliminated two files that did not pass quality control.

The global ancestry of 49/50 healthy Mexican-Mestizo files (MXM) and 96/97 individuals with aneuploidy (MXM_A) was deduced through a supervised maximum likelihood ADMIXTURE approach from K = 2 to K = 3 ancestral components and compared with the global ancestry of the group MXL (Mexican ancestry from Los Angeles California US) (n = 64). For this analysis,

genotypic frequencies of Northern European (CEU) (n=99), Yoruba (YRI) (n=108), and Native American (NAT) (n=43), reported in the 1000 genomes project (1KGP), were considered as reference parental populations for demographic and historical reasons.

Copy number variant (CNV) calling

CNVs were visualized with Affymetrix software (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). GeneChip Command Console (AGCC) software was used to generate the CEL files and ARR files from each microarray scanned. The CEL and ARR files were analyzed with Genotyping Console software (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) to

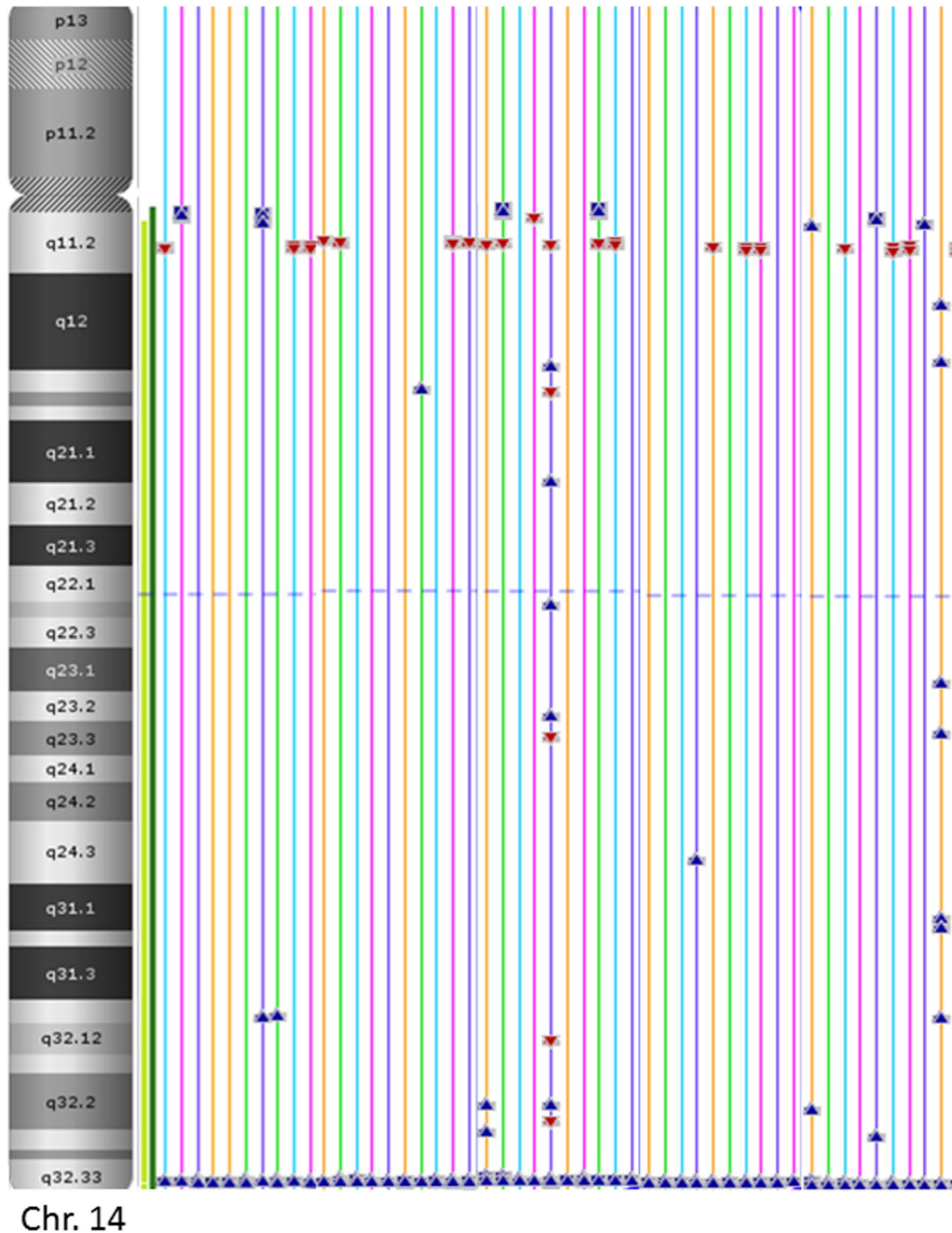


Fig. 5 Chromosome 14 image with CNV highlighted, CN > 2 in blue arrowheads, and the regions with CN = 1 in red arrowheads, the CN regions with copy number (CN = 2) are only marked in lines. CNV in 14q32.33 is present in all samples of our group of study (n = 246). CN: Copy Number

Table 4 Primers designed for qPCR of the *loci* with copy number variants (CNVs) and control regions

ID	3'-5' Sequence Forward	3'-5' Sequence Reverse
Chr2CNV	GGAAACACCTATTGGACTGGT	GCCCGATAGGAAAGCGTATAG
Chr2Ctrl	TGATTTGGGTTGCACTTCTTT	TTGCAGCAAATAGGCGAATA
Chr8CNV	CAGCCGTTCCAAGGACAA	GAGACAGCATTGCGTAGCC
Chr8Ctrl	TGCAGTGAGCTCCCTAAGTCT	GCTCGGGAGTCTAACAGTCAA
Chr14CNV	AACACCCAGTGCAATGTGAC	TCCTCTATGACCGCACTTCTG
Chr14Ctrl	TTTTTGAAGGAGTTGGTTAAACATT	GTGTCCCTCAGCTAGGCAGT
Chr15CNV	TGAACAAGAGGGACAAGCAA	AGGGTATGTCCCCATCATCA
Chr15Ctrl	CAAAGTCTCTAATCTTGACAGC	GAGGGAAGACTAGGATGATACCTG

obtain the CN data files (CNCHP) MAP and PED files for ancestry. CNCHP data were analyzed using Chromosome Analysis Suite (ChAS) software version 4.1 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA).

The annotation file used in our analysis can be found on the Affymetrix website, listed as NetAffx 33.1 (hg19). The reporting threshold of the copy number was set at "High Resolution" settings, which gave us a total of gains or losses of 100 kb with a marker count ≥ 50 . The copy number variants were compared among all samples. The CN analysis in ChAS software (<http://www.affymetrix.com>) has two ways of showing the results: one as a table that includes both coordinates and CN for each region; or a graphical interphase that displays the results of CN in an image of each of the 23 chromosomes, highlighting the regions with $CN > 2$ in blue arrowhead, regions with $CN = 1$ in red arrowhead, or CN regions with copy number ($CN = 2$), which are only marked in lines (Fig. 5).

To corroborate the changes in the CN obtained by GW SNP 6.0, we analyzed the absolute changes in copy number with qPCR in a representative sample. Oligonucleotides primers were designed at the four *loci* with $CN \neq 2$ and for a distal *locus* on the same chromosome, where $CN = 2$ was used as a copy number control (Table 4). qPCR was performed with LightCycler[®] Master (Roche Diagnostics) using hydrolysis TaqMan[®] probes (Universal Probes, Roche) with 100 ng of DNA, 45 amplification cycles and a single quantification. For those chromosomal regions in which it is possible to have a $CN = 2$ control DNA, the method proposed by Livak of 2^{-DDCt} was used [36]; for the *loci* where all subjects showed the change in the CN, the 2^{-DCt} method was used (Table 3) [36].

For an additional CNV calling method, we used copy number estimation using robust multichip analysis, and this method provides full-resolution raw total copy number estimates by preprocessing and probe summarization. CRMA v2 is available in Bioconductor [37] and

implemented in R (<http://www.aroma-project.org/vignettes/CRMAv2/>).

Briefly, the CEL files were analyzed for quality after the program calibrated for crosstalk between allele probe pairs, followed by normalization for 25-mer nucleotide-position probe sequence effects. Next, we analyzed the performance of robust probe-summarization, normalized the PCR fragment-length effects on summary signals, and finally calculated the full-resolution total copy numbers. When a standard reference is used, it is often the average of a pool of samples CnChipEffectFile.

The reference control samples for CRMA v2 analysis were a) the same 50 healthy individuals of MXM; b) 30 IBS, 30 CEU and 10 YRI. All groups were analyzed with the same pipeline.

We made the following comparisons: (a) MXM vs. MXM reference; (b) MXM vs. IBS reference; (c) MXM vs. CEU reference; (d) MXM vs. YRI reference; and (e) MXM vs. HapMap reference (CEU + YRI).

Databases

We reviewed publicly available databases to classify the CNVs found in our samples and the genes included:

Database of Genomic Variants (DGV, <http://projects.tcag.ca/variation/>).

DECIPHER (<https://decipher.sanger.ac.uk>).

ECARUCA (<http://www.ecaruca.net/>).

Genes2Cognition (<http://www.g2conline.org/>).

Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>).

OMIM (<https://www.omim.org/>).

Gene ontology (<http://geneontology.org/>).

ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>).

ClinGen (<https://www.clinicalgenome.org/>).

The sSMC database (<http://cs-tl.de/DB/CA/sSMC/0-Start.html>).

The heteromorphisms database (<http://cs-tl.de/DB/CA/HCM/0-Start.html>).

<http://franklin.genoox.com/clinical-db/home>

Abbreviations

CEU	Utah residents (CEPH) with Northern and Western European ancestry (1KGP population)
CHB	Han Chinese from Beijing, China
CN	Copy number
CNV	Copy number variant
DGV	The Database of Genomic Variants
Gb	Gigabases
GW SNP 6.0	Genome-Wide Human SNP Array 6.0, Affymetrix
hg19	Homo sapiens (human) genome assembly GRCh37
IBS	Iberian population in Spain
INP	Instituto Nacional de Pediatría
kb	Kilobases
LCSH	Long contiguous stretches of homozygosity
MAF	Minor allele frequency
MXL	Mexican Ancestry in Los Angeles CA, USA (1 KGP population)
MXM	Mexican Mestizo healthy controls
MXM_A	Mexican Mestizo with aneuploidy
MXM_WBC	Mexican-Woman with breast cancer (blood samples)
NAT	Native Americans (1KGP population)
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
sSMC	Small Supernumerary Marker Chromosomes
SNP	Single nucleotide polymorphism
YRI	Yoruba in Ibadan, Nigeria (1KGP population)

Acknowledgements

We would like to thank all the individuals for their consent to participate in this study. We would like to acknowledge Benilde García de Teresa for english revision, Fabiola Morales and Raúl Mojica, Unidad de Genotipificación y Análisis de la Expresión, Instituto Nacional de Medicina Genómica, for help with microarray performance and Jorge Yañez and Paul Gaytan from the Unidad de Síntesis y Secuenciación, Instituto de Biotecnología, UNAM, for primer synthesis.

Author contributions

Conception SF. Design of the work SF, AC, LT, SS. Recruitment of patients and healthy individuals RB, AMH, PGG, DGM, CV, EL, EY, VC. Acquisition and analysis of data: SS, LT, SF, JD, RB, AC, and BM. Interpretation of data, UJ, SS, LT, SF. Drafted the work, SS, LT, SF. All authors approved the submitted version and have agreed both to be personally accountable for the author's own contributions and to ensure that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work, even those in which the author was not personally involved, are appropriately investigated and resolved, and the resolution documented in the literature. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

CONACyT-FONCICYT 95419, CONACyT-FOSISS 142040 and Federal Resources from the Instituto Nacional de Pediatría 084/2010 and 2020/043. SS had a scholar fellowship CONACyT 100254.

Availability of data and materials

The data that support the findings of this study are not publicly available because one part of them is available from the Instituto Nacional de Ciencias Genómicas (México), but restrictions apply to the availability of these data, which were used under license for the current study. Data are, however, available from the authors upon reasonable request, with permission of Instituto Nacional de Ciencias Genómicas (México) and following the approved ethics committee guidelines.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

This study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki and was carried out with protocols approved by the Institutional Ethics and Research Committees from the Instituto Nacional de Pediatría, project numbers 084/2010 and 2020/043. Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 1 November 2022 Accepted: 13 December 2022

Published online: 12 January 2023

References

1. lafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet.* 2004;36(9):949–51. <https://doi.org/10.1038/ng1416>.
2. Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, Månér S, Massa H, Walker M, Chi M, Navin N, Lucito R, Healy J, Hicks J, Ye K, Reiner A, Gilliam TC, Trask B, Patterson N, Zetterberg A, Wigler M. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science.* 2004;305(5683):525–8. <https://doi.org/10.1126/science.1098918>.
3. Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet.* 2006;7:85–97. <https://doi.org/10.1038/nrg1767>.
4. Huijoe ML, Sherman MA, Barton AR, Mukamel RE, Sankaran VJ, Terao C, Loh PR. Influences of rare copy-number variation on human complex traits. *Cell Cell.* 2022;185:4233–48. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.09.028>.
5. Hehir-Kwa JY, Pfundt R, Veltman JA, de Leeuw N. Pathogenic or not? Assessing the clinical relevance of copy number variants. *Clin Genet.* 2013;84(5):415–21. <https://doi.org/10.1111/cge.12242>.
6. Rooney ER, Andersen EF, Cherry AM, Kantarci S, Kearney H, Patel A, Raca G, Ritter DI, South ST, Thorland EC, Pineda-Alvarez D, Aradhya S, Martin CL. Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen). *Genet Med.* 2020;22:245–57. <https://doi.org/10.1038/s41436-019-0686-8>.
7. Wellcome Trust Case Control Consortium, Craddock N, Hurles ME, Cardin N, Pearson RD, Plagnol V, Robson S, Vukcevic D, Barnes C, Conrad DF, Giannoulidou E, Holmes C, Marchini JL, Stirrups K, Tobin MD, Wain LV, Yau C, Aerts J, Ahmad T, Andrews TD, Arbury H, Attwood A, Auton A, Ball SG, Balmforth AJ, Barrett JC, Barroso I, Barton A, Bennett AJ, Bhaskar S, Blaszczyk K, Bowes J, Brand OJ, Braund PS, Bredin F, Green G, Brown MJ, Bruce IN, Bull J, Burren OS, Burton J, Byrnes J, Caesar S, Clee CM, Coffey AJ, Connell JM, Cooper JD, Dominiczak AF, Downes K, Drummond HE, Dudakia D, Dunham A, Ebbs B, Eccles D, Edkins S, Edwards C, Elliot A, Emery P, Evans DM, Evans G, Eyre S, Farmer A, Ferrier IN, Feuk L, Fitzgerald T, Flynn E, Forbes A, Forty L, Franklyn JA, Freathy RM, Gibbs P, Gilbert P, Gokumen O, Gordon-Smith K, Gray E, Green E, Groves CJ, Grozeva D, Gwilliam R, Hall A, Hammond N, Hardy M, Harrison P, Hassanali N, Hebaishi H, Hines S, Hinks A, Hitman GA, Hocking L, Howard E, Howard P, Howson JM, Hughes D, Hunt S, Isaacs JD, Jain M, Jewell DP, Johnson T, Jolley JD, Jones IR, Jones LA, Kirov G, Langford CF, Lango-Allen H, Lathrop GM, Lee J, Lee KL, Lees C, Lewis K, Lindgren CM, Maisuria-Armer M, Maller J, Mansfield J, Martin P, Massey DC, McArdle WL, McGuffin P, McLay KE, Mentzer A, Mimmack ML, Morgan AE, Morris AP, Mowat C, Myers S, Newman W, Nimmo ER, O'Donovan MC, Onipinla A, Onyiah I, Ovington NR, Owen MJ, Palin K, Parnell K, Pernet D, Perry JR, Phillips A, Pinto D, Prescott NJ, Prokopenko I, Quail MA, Rafelt S, Rayner NW, Redon R, Reid DM, Renwick, Ring SM, Robertson N, Russell E, St Clair D, Sambrook JG, Sanderson JD, Schuilenburg H, Scott CE, Scott R, Seal S, Shaw-Hawkins S, Shields BM, Simmonds MJ, Smyth DJ, Somaskantharajah E, Spanova K, Steer S, Stephens J, Stevens HE, Stone MA, Su Z, Symmons DP, Thompson JR, Thomson W, Travers ME, Turnbull C, Valsesia A, Walker M, Walker NM, Wallace C, Warren-Perry M, Watkins NA, Webster J, Weedon MN, Wilson AG, Woodburn M, Wordsworth BP, Young AH, Zeggini E, Carter NP, Frayling TM, Lee C, McVean G, Munroe PB, Palotie A, Sawcer SJ, Scherer SW, Strachan DP, Tyler-Smith C, Brown MA, Burton PR, Caulfield MJ, Compston A, Farrall M, Gough SC, Hall AS, Hattersley AT, Hill AV, Mathew CG, Pembrey M, Satsangi J, Stratton MR, Worthington J, Deloukas P, Duncanson A, Kwiakowski DP, McCarthy MI, Ouwehand W, Parkes M, Rahman N, Todd JA, Samani NJ, Donnelly P. Genome-wide association study of CNV in 16,000 cases of eight common diseases and 3000 shared controls. *Nature.* 2010; 464(7289):713–20. <https://doi.org/10.1038/nature08979>

8. Mazina V, Gerds J, Trinh S, Ankenman K, Ward T, Dennis MY, Girirajan S, Eichler EE, Bernier R. Epigenetics of autism-related impairment: copy number variation and maternal infection. *J Dev Behav Pediatr*. 2015;36(2):61.
9. Ionita-Laza I, Rogers AJ, Lange C, Raby BA, Lee C. Genetic association analysis of copy number variation (CNV) in human disease pathogenesis. *Genomics*. 2009;93(1):22–6. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2008.08.012>.
10. Zarrei M, MacDonald JR, Merico D, Scherer SW. A copy number variation map of the human genome. *Nat Rev Genet*. 2015;16:172–83. <https://doi.org/10.1038/nrg3871>.
11. Freeman JL, Perry GH, Feuk L, Redon R, McCarroll SA, Altshuler DM, Aburatani H, Jones KW, Tyler-Smith C, Hurler ME, Carter NP, Scherer SW, Lee C. Copy number variation: new insights in genome diversity. *Genome Res*. 2006;16(8):949–61. <https://doi.org/10.1101/gr.3677206>.
12. Scherer SW, Lee C, Birney E, Altshuler DM, Eichler EE, Carter NP, Hurler ME, Feuk L. Challenges and standards in integrating surveys of structural variation. *Nat Genet*. 2007;39(7):7–15. <https://doi.org/10.1038/ng2093>.
13. 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, Kristianson 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, Hurler ME. Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature*. 2010;464(7289):704–12. <https://doi.org/10.1038/nature08516>
14. Beckmann JS, Estivill X, Antonarakis SE. Copy number variants and genetic traits: closer to the resolution of phenotypic to genotypic variability. *Nat Rev Genet*. 2007;8(8):639–46. <https://doi.org/10.1038/nrg2149>.
15. MacDonald JR, Ziman R, Yuen RK, Feuk L, Scherer SW. The Database of Genomic Variants: a curated collection of structural variation in the human genome. *Nucleic Acids Res*. 2014;42:D986–92. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt958>.
16. Sudmant PH, Kitzman JO, Antonacci F, Alkan C, Malig M, Tsalenko A, Sampas N, Bruhn L, Shendure J. 1000 Genomes Project, Eichler EE. Diversity of human copy number variation a646nd multicopy genes. *Science*. 2010;330(6004):641–6. doi:<https://doi.org/10.1126/science.1197005>
17. Campbell CD, Sampas N, Tsalenko A, Sudmant PH, Kidd JM, Malig M, Vu TH, Vives L, Tsang P, Bruhn L, Eichler EE. Population-genetic properties of differentiated human copy-number polymorphisms. *Am J Hum Genet*. 2011;88(3):317–32. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.02.004>.
18. Sudmant PH, Rausch T, Gardner EJ, Handsaker RE, Abyzov A, Huddleston J, Zhang Y, Ye K, Jun G, Fritz MH, Konkel MK, Malhotra A, Stütz AM, Shi X, Casale FP, Chen J, Hormozdiazari F, Dayama G, Chen K, Malig M, Chaisson MJP, Walter K, Meiers S, Kashin S, Garrison E, Auton A, Lam HYK, Mu XJ, Alkan C, Antaki D, Bae T, Cerveira E, Chines P, Chong Z, Clarke L, Dal E, Ding L, Emery S, Fan X, Gujral M, Kahveci F, Kidd JM, Kong Y, Lameijer EW, McCarthy S, Flicek P, Gibbs RA, Marth G, Mason CE, Menelaou A, Muzny DM, Nelson BJ, Noor A, Parrish NF, Pendleton M, Quitadamo A, Raeder R, Schadt EE, Romanovitch M, Schlattl A, Sebra R, Shabalina AA, Untergasser A, Walker JA, Wang M, Yu F, Zhang C, Zhang J, Zheng-Bradley X, Zhou W, Zichner T, Sebati J, Batzer MA, McCarroll SA; 1000 Genomes Project Consortium, Mills RE, Gerstein MB, Bashir A, Stegle O, Devine SE, Lee C, Eichler EE, Korbel JO. An integrated map of structural variation in 2,504 human genomes. *Nature*. 2015;526(7571):75–81. doi:<https://doi.org/10.1038/nature15394>
19. IGS: The International Genome Sample Resource. Supporting open human variation data. <https://www.internationalgenome.org/data-portal/population> Citation: Susan Fairley, Ernesto Lowy-Gallego, Emily Perry, Paul Flicek, The International Genome Sample Resource (IGSR) collection of open human genomic variation resources. *Nucl Acids Res* 48(D1)2020:941–947. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz836>
20. Haraksingh RR, Abyzov A, Urban AE. Comprehensive performance comparison of high-resolution array platforms for genome-wide Copy Number Variation (CNV) analysis in humans. *BMC Genom*. 2017;18(1):321. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3658-x>.
21. Bruce S, Leinonen R, Lindgren CM, Kivinen K, Dahlman-Wright K, Lipsanen-Nyman M, Hannula-Jouppi K, Kere J. Global analysis of uniparental disomy using high density genotyping arrays. *J Med Genet*. 2005;42(11):847–51. <https://doi.org/10.1136/jmg.2005.032367>.
22. Pajusalu S, Žilina O, Yakoreva M, Tammur P, Kuuse K, Mõlter-Väär T, Nõukas M, Reimand T, Üunap K. The diagnostic utility of single long contiguous stretches of homozygosity in patients without parental consanguinity. *Mol Syndromol*. 2015;6:135–40. <https://doi.org/10.1159/000438776>.
23. Wang JC, Ross L, Mahon LW, Owen R, Hemmat M, Wang BT, El Naggar M, Kopita KA, Randolph LM, Chase JM, Matas Aguilera MJ, Siles JL, Church JA, Hauser N, Shen JJ, Jones MC, Wierenga KJ, Jiang Z, Haddadin M, Boyar FZ, Anguiano A, Strom CM, Sahoo T. Regions of homozygosity identified by oligonucleotide SNP arrays: evaluating the incidence and clinical utility. *Eur J Hum Genet*. 2015;23(5):663–71. doi:<https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.153>
24. Chaves TF, Oliveira LF, Ocampos M, Barbatto IT, de Luca GR, Barbatto-Filho JH, de Camargo-Pinto LL, Bernardi P, Maris AF. Long contiguous stretches of homozygosity detected by chromosomal microarrays (CMA) in patients with neurodevelopmental disorders in the South of Brazil. *BMC Med Genomics*. 2019;12:50. <https://doi.org/10.1186/s12920-019-0496-5>.
25. Liehr T. Introduction. In: Small supernumerary marker chromosomes (sSMC). Berlin: Springer; 2012. https://doi.org/10.1007/978-3-642-20766-2_1
26. Kearney HM, Kearney JB, Conlin LK. Diagnostic implications of excessive homozygosity detected by SNP-based microarrays: consanguinity, uniparental disomy, and recessive single-gene mutations. *Clin Lab Med*. 2011;31(4):595–613. <https://doi.org/10.1016/j.cllm.2011.08.003>.
27. Li J, Yang T, Wang L, Yan H, Zhang Y, Guo Y, Pan F, Zhang Z, Peng Y, Zhou Q, He L, Zhu X, Deng H, Levy S, Papasian CJ, Drees BM, Hamilton JJ, Recker RR, Cheng J, Deng HW. Whole genome distribution and ethnic differentiation of copy number variation in caucasian and asian populations. *PLoS ONE*. 2009;4(11):7958. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007958>.
28. Pinto D, Darvishi K, Shi X, Rajan D, Rigler D, Fitzgerald T, Lionel AC, Thiruvahindrapuram B, Macdonald JR, Mills R, Prasad A, Noonan K, Gribble S, Prigmore E, Donahoe PK, Smith RS, Park JH, Hurler ME, Carter NP, Lee C, Scherer SW, Feuk L. Comprehensive assessment of array-based platforms and calling algorithms for detection of copy number variants. *Nat Biotechnol*. 2011;29(6):512–20. <https://doi.org/10.1038/nbt.1852>.
29. Purwar N, Tiwari P, Mathur N, Sharma H, Sahlot R, Garg U, Sharma B, Saxena A, Mathur SK. Higher CNV frequencies in chromosome 14 of girls with turner syndrome phenotype. *J Clin Endocrinol Metab*. 2021;106(12):e4935–55. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgab572>.
30. Ambele MA, van Zyl A, Pepper MS, van Heerden MB, van Heerden WFP. Amplification of 3q26.2, 5q14.3, 8q24.3, 8q22.3, and 14q32.33 Are Possible Common Genetic Alterations in Oral Cancer Patients. *Front Oncol*. 2020;10:683. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00683>
31. Wijesiriwardhana P, Wettasinghe K, Dissanayake VHW. Copy Number Variants Captured by the Array Comparative Genomic Hybridization in a Cohort of Patients Affected with Hereditary Colorectal Cancer in Sri Lanka: The First CNV Analysis Study of the Hereditary Colorectal Cancer in the Sri Lankan Population. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2021;22(6):1957–1966. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2021.22.6.1957>.
32. Diniz MG, França JA, Vilas-Boas FAS, de Souza FTA, Calin GA, Gomez RS, Sousa SF, Gomes CC. The long noncoding RNA KIAA0125 is upregulated in ameloblastomas. *Pathol Res Pract*. 2019;215(3):466–9. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2018.12.030>.
33. Godoy VCSM, Teixeira BF, Colovati M, Rodrigues OJH, Moysés-Oliveira M, Melaragno MI. Copy number variation (CNV) identification, interpretation, and database from Brazilian patients. *Genet Mol Biol*. 2020;43(4):e20190218. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2019-0218>
34. GSE87048 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE87048Rebollar-Vega> R, Romero-Córdoba S, Rodríguez-Cuevas S, Maffuz-Aziz A, Hidalgo-Miranda A. Analysis of somatic DNA copy number alterations and frequency of breast cancer intrinsic subtypes from Mexican women [copy number]. Contributor(s) Rebollar-Vega R, Romero-Córdoba S, Rodríguez-Cuevas S, Maffuz-Aziz A, Hidalgo-Miranda A Citation(s) Romero-Córdoba SL, Salido-Guadarrama I, Rebollar-Vega R, Bautista-Piña V, Dominguez-Reyes C, Tenorio-Torres A, Villegas-Carlos F, Fernández-López JC, Uribe-Figueroa L, Alfaro-Ruiz L, Hidalgo-Miranda A. Comprehensive omic characterization of breast cancer in Mexican-Hispanic women. *Nat Commun*. 2021;12(1):2245. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22478-5>
35. GSE67047 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE67047> Genome-wide association and epistatic studies in sporadic medullary and juvenile papillary thyroid carcinomas. Bleda M, Garcia-Alonso L, Medina I, Gonzalez CY, Fernandez RM, Nuñez-Torres R, Luzon-Toro B,

Torroglosa A, Marba M, del Valle Enguix-Riego M, Montaner D, Antiñolo G, Borrego S, Dopazo J. Citation: Luzón-Toro B, Bleda M, Navarro E, García-Alonso L, Ruiz-Ferrer M, Medina I, Martín-Sánchez M, Gonzalez CY, Fernández RM, Torroglosa A, Antiñolo G, Dopazo J, Borrego S. Identification of epistatic interactions through genome-wide association studies in sporadic medullary and juvenile papillary thyroid carcinomas. *BMC Med Genomics*. 2015;8:83. <https://doi.org/10.1186/s12920-015-0160-7>

36. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*. 2001;25(4):402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
37. Bengtsson H, Wirapati P, Speed TP. A single-array preprocessing method for estimating full-resolution raw copy numbers from all Affymetrix genotyping arrays including GenomeWideSNP 5 & 6. *Bioinformatics*. 2009;25(17):2149–56. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp371>.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions





Contents lists available at ScienceDirect

Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology

journal homepage: www.tjog-online.com

Case Report

Unravelling complex mosaicism of sex chromosomes in a patient with primary amenorrhea through cytogenetic analysis on urothelial cells

Rosalba Sevilla-Montoya ^{a,1}, Maria de Jesus Zavaleta-Abreu ^{a,1}, Gloria Queipo ^b,
Silvia Sanchez ^c, Sara Frias ^{c,d}, Alberto Hidalgo-Bravo ^e, Patricia Grether-González ^{a,*}, ²

^a Department of Genetics and Human Genomics, National Institute of Perinatology, Montes Urales 800, Lomas-Verreyes, Lomas de Chapultepec IV Secc, Z. C. 11000, Mexico City, Mexico

^b Human Genetics Department, General Hospital of Mexico, School of Medicine UNAM, Dr. Balmis 148, Doctores, Cuauhtémoc, Z. C. 06720 Mexico City, Mexico

^c Cytogenetics Laboratory, National Institute of Pediatrics, Insurgentes Sur 3700, Insurgentes Cuicuilco, Z. C. 04530 Mexico City, Mexico

^d Biomedical Research Institute UNAM, Circuito, Mario de La Cueva, C.U., Coyoacán, Z. C. 04510 Mexico City, Mexico

^e Department of Genetics, National Institute of Rehabilitation, Calzada Mexico-Xochimilco 289, Arenal de Guadalupe, Z. C. 14389, Mexico City, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 15 December 2020

Keywords:

Amenorrhea
Disorders of sex development
Partial gonadal dysgenesis
Sex chromosome mosaicism

ABSTRACT

Objective: Sex chromosome mosaicism remains challenging in the study of disorders of sex development (DSD). Aneuploid cells in the developing gonad play a major role in sex determination. Therefore, it is necessary to acknowledge their presence by different methods. Our aim was to stand out the utility of urothelial cells for unravelling complex and hidden cell lines in DSD patients.

Case report: Herein we report on a 19-year-old female with primary amenorrhea, short stature without ambiguous external genitalia. She had a 45,X/46, XY karyotype in leukocytes. Interphase FISH revealed hidden 45,X/47,XXY/47,XXY/46,XY/46, XX mosaicism in leukocytes and urothelial cells.

Conclusion: These findings highlight the importance of investigating sex chromosome mosaicism in other tissues. Of particular interest in cases of DSD are the cells from the urinary epithelium, which may reflect the cell composition of the urogenital ridge, the analysis of these cells should be considered within the clinical assessment of DSD patients.

© 2021 Taiwan Association of Obstetrics & Gynecology. Publishing services by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

Amenorrhea is the most common disorder affecting menstruation, its prevalence is approximately 4%. Among the causes of primary amenorrhea, gonadal dysgenesis represents almost 40%, therefore cytogenetic analysis is an essential part of the clinical assessment [1]. The most common cytogenetic finding is chromosome X monosomy or Turner syndrome. It has been described that most 45,X individuals may possess another cell line with a second sex chromosome [2]. The existence of sex chromosome mosaicism may be manifested as a wide clinical spectrum, from a female phenotype, to a male phenotype with infertility. In some patients characteristics of disorders of sex differentiation (DSDs) involving the Y chromosome, can be observed [3]. However, most cases of

45,X/46, XY mosaicism exhibit an asymmetric gonadal differentiation, with a dysgenetic testis on one side and a contralateral streak gonad, which is known as partial gonadal dysgenesis [4]. Mosaicism involving more than two cell lines has been rarely described and there is no constant relationship between karyotype and phenotype [5].

We present the case of a phenotypically female patient with primary amenorrhea but with spontaneous secondary sex development with a 45,X/46, XY mosaicism in peripheral blood karyotype and a hidden 45,X/47,XXY/47,XXY/46,XY/46, XX mosaicism, as demonstrated by fluorescence *in situ* hybridization (FISH), in uncultivated leukocytes and urothelial cells. These findings highlight the importance of investigating urothelial cells in patients with DSDs to unravel cell absent or in very low number in blood.

Case presentation

All procedures were approved by the institutional bioethics committee. The patient and her parents signed an informed consent form. The proband was a 19 years old female with history of primary

* Corresponding author.

E-mail address: pgrether@gmail.com (P. Grether-González).

¹ These authors contributed as first authors.

² Current address: ABC Medical Center, Av. Carlos Fernández Graef 154, Cuajimalpa, Z. C. 05330 Mexico City, Mexico.

amenorrhea. She has two healthy siblings. Her parents were non-consanguineous with no relevant medical history. She presented spontaneous secondary sex development, but menarche was hormonally induced at 18 years old. Clinical examination revealed short stature, height 1.47 m (<3rd percentile) and weight of 58 kg (percentile 50). She had low posterior hair implantation, broad thorax, breast Tanner stage III and cubitus valgus. The external genitalia were morphologically normal, corresponding to female Tanner stage IV. No other relevant clinical data or Turner related signs were found. Pelvic ultrasound showed a 5.6 × 1.7 × 3.6 cm uterus and a 2 × 0.8 × 2 cm right gonad, the left gonad was not visualized. Renal ultrasound, thyroid hormones and electrocardiogram were normal. The results of hormones levels were FSH 108 mU/ml (3–10 mU/ml), LH 49.7 mU/ml (2–10 mU/ml), estradiol 25 pg/ml (27–161 pg/ml), total testosterone 1.02 ng/ml (female up to 0.73, male 1.95–11.38) progesterone 0.82 ng/ml (5–20 ng/ml) and prolactin 9.76 ng/ml (0–20 ng/ml). Karyotype on blood lymphocytes revealed a 45,X[67]/46,XY[33] mosaicism. In order to compile a more specific characterization of the mosaicism, FISH was carried out on phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes, unstimulated leukocytes and non-cultivated urothelial cells. Urothelial cells were processed according to the Vysis protocol for uncultured amniocytes [6], with some modifications such as lysozyme treatment after a microscope analysis to verify the presence and amount of bacteria. The sample was incubated with lysozyme (1 mg/ml of Hank's Balanced Salt Solution without Ca nor Mg) and Penicillin-Streptomycin (10,000 U/ml) at 37 °C and 5% of CO₂ for at least 1 h.

LSI SRY/spectrum orange, CEP X/spectrum green and sat III Y/spectrum aqua probes from Vysis were used on metaphases from stimulated lymphocytes. Centromeric probes for chromosomes X, Y and 18 (CEP X/spectrum green, CEP Y/spectrum orange, and CEP 18/spectrum aqua, Vysis, Inc), were used on interphase nuclei from leukocytes and urothelial cells. Chromosome 18 probe was used as an internal control to differentiate aneuploid from polyploid cells.

FISH on 1000 interphase nuclei from non-stimulated leukocytes showed a proportion of 45,X (81.4%) and 46,XY (15.7%). In addition, a normal XX and an XYY cell lines were found in a proportion of 1.3% and 1.6%, respectively. In an attempt to investigate the distribution of the mosaicism in a tissue more closely related to the urogenital ridge, we decided to study uncultivated urothelial cells, which could provide an additional view of this mosaicism. FISH on 365 urothelial cell nuclei revealed cell lines 45,X and 46,XY, in a similar proportion compared to blood leukocytes. However, urothelial cells revealed a more complex mosaicism, including a not previously observed XXY cell line in 1.6% of the nuclei and one XYY cell corresponding to a non-representative 0.3% (Table 1) (Fig. 1).

In order to infer the structure of the Y chromosome, the sequences *PABY*, *SRY*, *AMELY*, *Ycen* and *Yqh* were investigated by PCR analysis. PCR was performed in DNA derived from blood leukocytes.

PCR conditions were as previously reported [7]. All Y chromosome sequences were present, suggesting no structural abnormalities.

Discussion

The 45,X/46,XY karyotype is a rare condition of sex chromosomes, with an estimated incidence of 1/10,000 newborns. In 34 cases of X/XY mosaicism, Matsumoto et al. found ambiguous genitalia in 74%. Regarding the gonad histology, 59% presented a unilateral testis and a contralateral gonad with abnormal histology, 26% bilateral streak gonads and 15% bilateral dysgenetic testes [8].

Some patients with 45,X/46,XY karyotype have an abnormal Y chromosome, which can be related with its lost in some cells, adding complexity to the genotype–phenotype correlation [9]. In this case, the Y chromosome regions analyzed suggested integrity of the Y chromosome. Whatever phenotype is present, analysis of the mosaicism is important during the clinical approach, as well as an investigation of all the comorbidities associated with the mosaicism.

Sex chromosome mosaicisms involving more than three cell lines have been studied in blood, skin and gonadal preparations, but, to the best of our knowledge they have not been investigated in urothelial cells for DSD patients. In the present case, we identified five cell lines with different distributions within the analyzed tissues, which provide a possible explanation for the phenotype observed in the patient.

High frequencies of mosaicism (50–80%) have been reported in cleavage stage human embryos [10], however, by the 12th week of gestation, most pregnancies carrying a mosaicism are lost. Nevertheless, the recognition of the presence of mosaicism disorders is rapidly increasing because of new reproduction technologies. Mosaicisms can arise at various stages of development or during adult life. Mosaicism be caused by a postzygotic rescue in cells derive from an aneuploid zygote, or by *de novo* postzygotic non-disjunction during mitosis in cells derived from a zygote with a diploid chromosome complement [11].

In our case, the multiple cell lines observed could have emerged from a 47,XXY, 48,XXYY, 47,XY, or even an from an euploid 46,XY zygote. Various aberrant postzygotic events, could lead to the complex mosaicism detected. Irrespective of the chromosome complement of the zygote, the mosaicism most probably started at the cleavage stage, by the time when it is known that some of the checkpoints of the cell cycle are absent [12]. It is known that gene expression in the embryonic genome begins after the 8-cell stage. At the same time the control of cell cycle begins to be active. Cell cycle control is fully activated by the 64-cell stage (free blastocyst stage). At this moment numerical changes in chromosomal composition are restricted [12].

In viable mosaicisms, such as those involving sex chromosomes, the survival of aneuploid cells is expected. Furthermore, recent studies have reported a wider range of chromosome mosaicisms in

Table 1
Frequency of cell lines detected in blood and urothelial cells.

Cell type	Method Probes	Number of XX cells	Number of XY cells	Number of X cells	Number of XYY cells	Number of XXY cells
Metaphases from Stimulated lymphocytes	GTG		55 (30.7%)	124 (69.3%)		
Stimulated lymphocytes	FISH CEPX/SRY/SATIIIY		127 (12.7%)	873 (87.3%)		
Non-stimulated leukocytes	FISH CEPX/CEPY/CEP18	13 (1.3%)	157 (15.7%)	814 (81.4%)	16 (1.6%)	
Non cultivated urothelial cells	FISH CEPX/CEPY/CEP18	15 (4.1%)	49 (13.4%)	294 (80.5%)	1 (0.3%)	6 (1.6%)

GTG (Trypsin Giemsa Stain), FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization), CEPX (Chromosome X centromeric probe), SRY (Sex determining region Y probe), SATIIIY (satellite III Y DNA probe), CEPY (Chromosome Y centromeric probe), CEP18 (Chromosome 18 centromeric probe).

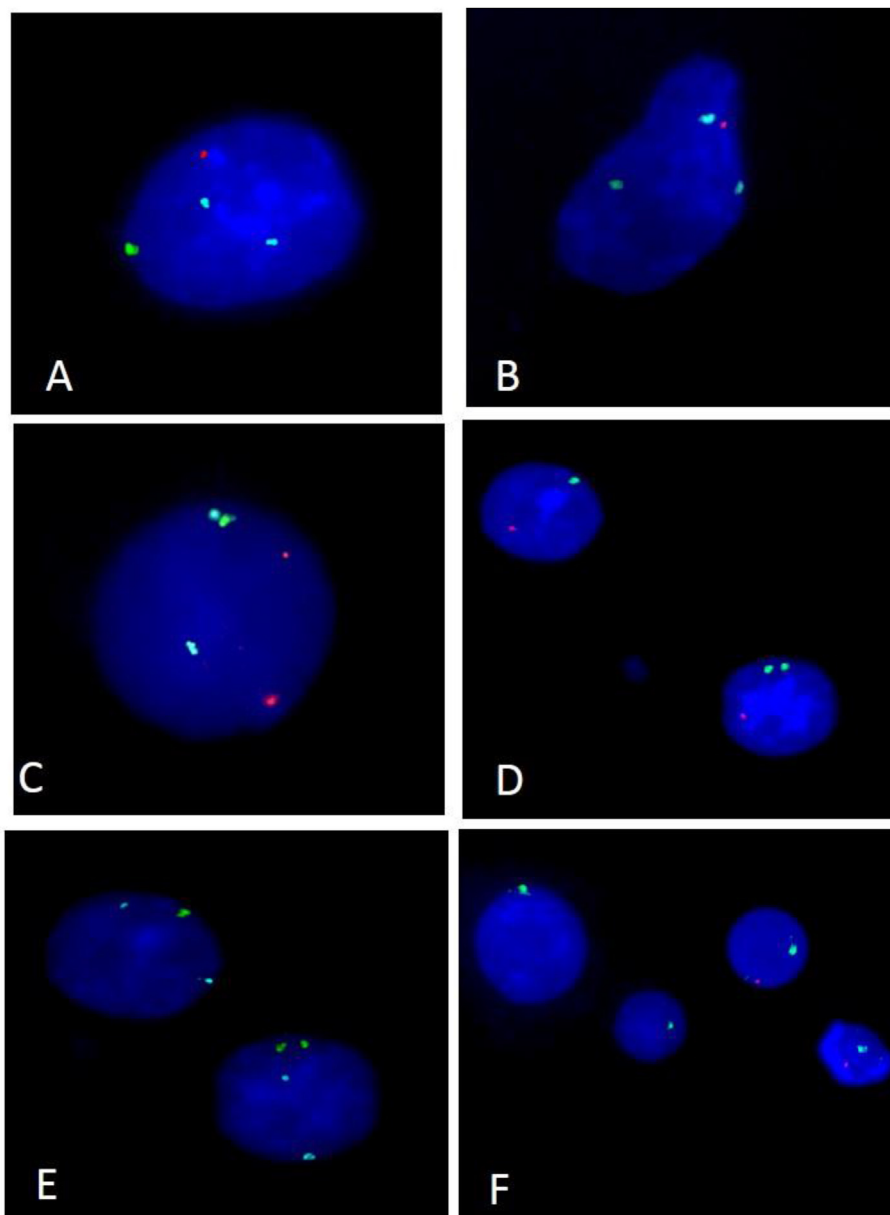


Fig. 1. Fluorescence *In Situ* Hybridization. Mosaicism distribution identified by FISH analysis using X, Y and chromosome 18 probes labeled with spectrum green, orange and aqua respectively. **A–D:** Uncultured urothelial cells showing different hybridization signals. **A** and **B:** XY nuclei, **C:** XYY and **D:** shows two cell lines one XY and other XX. **E–F:** Interphase nuclei from non-stimulated peripheral blood leukocytes showing X, XX, and XY cell lines in the mosaic. (Aqua signals not shown in **D** and **F**).

clinically normal individuals, supporting the notion of mosaicism generation in late prenatal or even postnatal life [13].

In the present case, the discovery of unseen cell lines in uncultivated leukocytes and urothelial cells suggests that some of the cell lines emerged after the free blastocyst stage, probably in the yolk sac endothelium. The endodermal layer of the yolk sac generates, at least, part of the hematopoietic stem cells [14] and the primordial germ cells, that become readily recognizable at 24 days after fertilization. Therefore, the embryonic developmental stages, at which different cell lines appear, as well as their distribution along tissues, are crucial for the resultant phenotype and the clinical consequences.

Biesecker [13] proposed that somatic mosaicism is widespread during normal development and they pointed out the relevance of investigating different tissues. The findings in the present case suggest that new cell lines with different chromosome compositions

were generated in the developing embryo beyond the free blastocyst stage. It has been reported that different culture time could result in different cytogenetic outcomes, which may also help explain the selective growth of mesodermal cells during the process of prolonged culture [15]. This is the reason why we consider that the analysis of uncultured cells is essential to avoid *in vitro* preferential cell proliferation.

A combination of different methods, namely conventional karyotyping following culture, multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and fluorescence *in situ* hybridization (FISH), or even genomic technologies could provide unprecedented opportunities to assess increasing genomic variation among individuals and tissues.

In summary, the present case highlights the need for a more extensive chromosome investigation during the study of disorders

of sex development, extending it to other tissues and including interphase cells. Of particular interest in cases of DSD are the cells from the urinary epithelium, which somehow reflects the cell composition of the urogenital ridge. In addition, these cells can be obtained through noninvasive procedures. The analysis of these cells, should be considered within the routine clinical assessment of these patients.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors of this publication, had research support from Fonciyct (Fondo de cooperación internacional de ciencia y tecnología), with an approved protocol No. 95419.

The authors acknowledge the Research Division of the General Hospital of Mexico City and the School of Medicine UNAM for their support in English Language Editing service.

References

- [1] Marsh CA, Grimstad FW. Primary amenorrhea: diagnosis and management. *Obstet Gynecol Surv* 2014 Oct;69(10):603–12.
- [2] Dabrowski E, Jensen R, Johnson EK, Habiby RL, Brickman WJ, Finlayson C. Turner syndrome systematic review: spontaneous thelarche and menarche stratified by karyotype. *Horm Res Paediatr* 2019;92(3):143–9.
- [3] Lee PA, Houk CP, Ahmed SF, Hughes IA. International consensus conference on intersex organized by the Lawson Wilkins pediatric endocrine society and the European society for paediatric endocrinology. Consensus statement on management of intersex disorders. International consensus conference on intersex. *Pediatrics* 2006 Aug;118(2):e488–500.
- [4] El Moussaif N, Haddad NE, Iraqi N, Gaouzi A. 45,X/46,XY mosaicism: report of five cases and clinical review. *Ann Endocrinol (Paris)* 2011 Jun;72(3):239–43.
- [5] García-Acero M, Moreno-Niño O, Suárez-Obando F, Molina M, Manotas MC, Prieto JC, et al. Disorders of sex development: genetic characterization of a patient cohort. *Mol Med Rep* 2020 Jan;21(1):97–106.
- [6] Tepperberg J, Pettenati MJ, Rao PN, Lese CM, Rita D, Wyandt H, et al. Prenatal diagnosis using interphase fluorescence in situ hybridization (FISH): 2-year multi-center retrospective study and review of the literature. *Prenat Diagn* 2001 Apr;21(4):293–301.
- [7] Queipo G, Zenteno JC, Pena R, Nieto K, Radillo A, Dorantes LM, et al. Molecular analysis in true hermaphroditism: demonstration of low-level hidden mosaicism for Y-derived sequences in 46,XX cases. *Hum Genet* 2002 Sep;111(3):278–83.
- [8] Matsumoto F, Matsuyama S, Matsui F, Yazawa K, Matsuoka K. Variation of gonadal dysgenesis and tumor risk in patients with 45,X/46,XY mosaicism. *Urology* 2020 Mar;137:157–60.
- [9] Wu Q, Wang C, Shi H, Kong X, Ren S, Jiang M. The clinical manifestation and genetic evaluation in patients with 45,X/46,XY mosaicism. *Sex Dev* 2017;11(2):64–9.
- [10] Chavez SL, Loewke KE, Han J, Moussavi F, Colls P, Munne S, et al. Dynamic blastomere behaviour reflects human embryo ploidy by the four-cell stage. *Nat Commun* 2012;3:1251.
- [11] Taylor TH, Gitlin SA, Patrick JL, Crain JL, Wilson JM, Griffin DK. The origin, mechanisms, incidence and clinical consequences of chromosomal mosaicism in humans. *Hum Reprod Update* 2014 Jul-Aug;20(4):571–81.
- [12] Los FJ, Van Opstal D, van den Berg C. The development of cytogenetically normal, abnormal and mosaic embryos: a theoretical model. *Hum Reprod Update* 2004 Jan-Feb;10(1):79–94.
- [13] Biesecker LG, Spinner NB. A genomic view of mosaicism and human disease. *Nat Rev Genet* 2013 May;14(5):307–20.
- [14] Oberlin E, El Hafny B, Petit-Cocault L, Souyri M. Definitive human and mouse hematopoiesis originates from the embryonic endothelium: a new class of HSCs based on VE-cadherin expression. *Int J Dev Biol* 2010;54(6–7):1165–73.
- [15] Zhang Y, Lei Q, Liu J, Lin M, Luo L, Li T, et al. Selective growth of mosaic cells in chromosomal analysis of chorionic villi by conventional karyotyping. *Mol Cell Probes* 2020 Feb 18:101532.