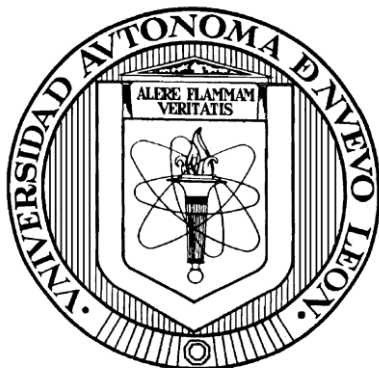


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR POR aCGH DE ALTERACIONES
GENÓMICAS EN PACIENTES CON DISCAPACIDAD INTELECTUAL Y
MALFORMACIONES MÚLTIPLES DE ETIOLOGÍA DESCONOCIDA”

Por

Q.C.B. Lizeth Alejandra Martínez Jacobo

Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS con
Orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética

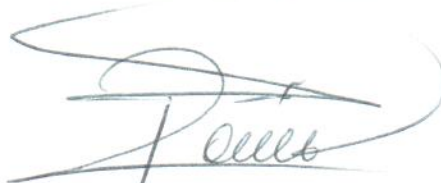
Julio, 2013

“Caracterización molecular por aCGH de alteraciones genómicas en pacientes con discapacidad intelectual y malformaciones múltiples de etiología desconocida”.

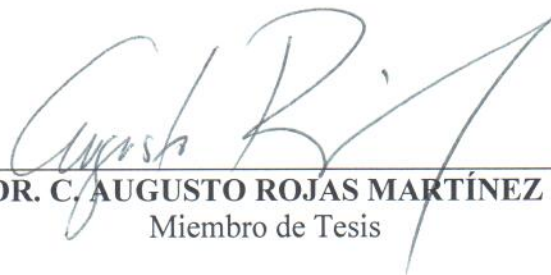
Aprobación de la Tesis:



DR. C. CARLOS CÓRDOVA FLETES
Director de Tesis



DRA. C. ROCÍO ORTIZ LÓPEZ
Co- Directora de Tesis



DR. C. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ
Miembro de Tesis



DR. med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO
Subdirector de Estudios de Posgrado

El presente trabajo de tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Medicina Genómica de la Unidad de Diagnóstico Molecular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la facultad de Medicina, así como en la Unidad de Biología Molecular Genómica y Secuenciación del Centro de investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, ambos de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Carlos Córdova Fletes, la co-dirección de la Dra. Rocío Ortiz López y como miembro de la comisión el Dr. Augusto Rojas Martínez.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca otorgada para realizar mi posgrado.

A mi director de tesis, Dr. Carlos Córdova Fletes, Gracias por sus consejos, paciencia, apoyo y dedicación en este proyecto, por compartirme de sus conocimientos procurando siempre mi formación profesional; muchísimas gracias por confiar en mí.

A la Dra. Rocío Ortiz López y al Dr. Augusto Rojas, por todo su apoyo para la realización de este proyecto y por permitirme formar parte de la UBMG y S.

A los investigadores del CIBO por su valiosa colaboración en la captación de los pacientes y su apoyo en la parte clínica del proyecto.

A la Dra. Herminia G. Martínez, por confiar en mí, por sus consejos y apoyarme en todo momento.

A mis compañeros de generación: Geo, Junior, Alex, Erick, Mariel y Kame por vivir esta experiencia conmigo y brindarme su amistad.

A Geo Clavo por su paciencia, consejos y apoyo en el laboratorio, por brindarme su amistad y sinceridad durante estos 2 años.

A mis compañeros del CIDICS: Sandra, Laura, Adriana, Yadira, Ramsés y la Química Paty, por su apoyo y por hacerme sentir parte del equipo.

A mi familia, por su apoyo incondicional y confianza para cumplir mis metas.

A Pedrin Salas, por apoyarme siempre para lograr mi superación profesional y estar conmigo en los momentos buenos y en los no tan buenos. TA.

DEDICATORIA

A mis padres: Por su amor y apoyo incondicional. Por todo el sacrificio puesto para que mis hermanas y yo pudiéramos estudiar, se merecen esto y mucho más. Estoy convencida que un día les compensare un poco de lo mucho que me han dado.

A mis hermanas: Porque ustedes me han dado el ejemplo, siempre estudiando y trabajando para lograr sus metas. Porque me han apoyado incondicionalmente y siempre han creído en mí. Estoy orgullosa de ser su hermana menor, ustedes son mi inspiración y cuando sea grande quiero ser como ustedes.

A mis sobrinos (Vale, Emi y Ernesto) y a Pedrín: Por motivarme a seguir estudiando, por creer en mí, jamás les voy a fallar.

A todos ustedes, con Amor

Liz

“Después de escalar una montaña muy alta, descubrí que hay muchas otras montañas por escalar”....Nelson Mandela

CONTENIDO

ABREVIATURAS.....	IX
INDICE DE FIGURAS.....	X
INDICE DE TABLAS	X
RESUMEN	1
CAPÍTULO 1.....	2
INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Malformaciones múltiples	3
1.2 DI	5
1.2.1 Epidemiología de la DI.....	6
1.2.2 Etiología de la DI	8
1.3 Herramientas de Diagnóstico	9
1.3.1 Microarreglos genómicos	11
1.4 Variaciones en el número de copias	13
1.5 JUSTIFICACIÓN	15
CAPÍTULO 2.....	16
OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GENERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
CAPÍTULO 3.....	17
DISEÑO METODOLÓGICO.....	17
3.1 Diseño de estudio	17
3.2 Universo de estudio	17
3.3 Muestra de estudio	17
3.4 Criterios de inclusión	17
3.5 Criterios de no inclusión.....	18
3.6 Criterios de exclusión.....	18
CAPÍTULO 4.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
4.1 Estrategia General	19
4.2 MATERIALES	20
4.2.1 Reactivos.....	20
4.2.2 Material Biológico.....	21

4.2.3 Equipo	21
4.2.4 Programas computacionales	21
4.3 MÉTODOS (ver anexos).....	22
4.3.1 Escanéo Genómico	22
4.3.1.1 Naturaleza de la muestra.....	22
4.3.1.2 Extracción de ADN	22
4.3.1.3 Calidad de ADN por electroforesis y espectrofotometría	23
4.3.1.4 Microarreglos de genotipificación (anexo 4)	23
4.3.1.4 Control de calidad del escanéo genómico en plataforma Affymetrix	25
4.3.1.5 Algoritmo Birdseed y Algoritmo Canary.....	25
4.3.2 Identificación de alteraciones genómicas	25
4.3.2.1 Variaciones en el número de copias (CNV).....	25
4.3.2.2 Identificación de LOH	26
4.3.3 Validación de las alteraciones encontradas.....	26
4.3.3.1 Validación de alteraciones cromosómicas por plataforma de microarreglos de NimbleGen	26
4.3.4 Búsqueda de patrones de metilación.....	27
4.3.4.1 Preparación de la muestra (anexo 6).....	27
4.3.4.2 Microarreglos de Metilación.....	28
4.3.4.3 Análisis de microarreglos de metilación	29
4.3.5 Análisis de RFLPs	30
4.3.6 Asociación del fenotipo con las alteraciones genómicas	31
4.3.6 Consideraciones éticas.....	32
CAPÍTULO 5.....	33
RESULTADOS	33
5.1. Captación de pacientes	33
5.2 Descripción de casos	33
Caso #1.....	33
Caso#2.....	33
Caso#3.....	34
Caso#4.....	34
Caso#5.....	35
5.3 Obtención de ideogramas	36
5.4 Identificación de CNV.....	38
5.5 Identificación de alteraciones genómicas	39
Caso#1	39
Caso#2	40
Caso#3	41
Caso#4	44
Caso#5	45
5.6 Validación de las alteraciones encontradas.....	49
5.7 Microarreglos de metilación.....	50

CAPÍTULO 6.....	52
DISCUSIÓN	52
6.1 Identificación de CNV.....	52
6.2 Caso #1.....	53
6.3 Caso #2: CNV de SCI	55
6.4 Caso#3: CN-LOH.....	56
6.5 Delineación de alteraciones identificadas con cariotipo	60
6.6 Caso#4 :Deleción intersticial en 3p26.1p26.3	60
6.7 Caso#5: Deleción intersticial en 7q21.3-q31.1	64
CAPÍTULO 7.....	70
CONCLUSIÓN.....	70
CAPÍTULO 8.....	71
PERSPECTIVAS	71
BIBLIOGRAFÍA	72
ANEXOS	76
ARTÍCULO ACEPTADO	92

ABREVIATURAS

aCGH: Array-comparative genomic hybridization

ACM: Anomalías congénitas múltiples

ADN: Ácido desoxirribonucleico

CI: Coeficiente intelectual

CN-LOH: Copy neutral loss of heterozygosity

CNV: Copy Number Variations

DGV: Database of genomic variants

DI: Discapacidad Intelectual

FISH: Fluorescent In Situ Hybridization

ISCA: International Standards for Cytogenomic Arrays

LOH: Loss of heterozygosity

MLPA: Multiplex Ligation Probe Amplification

MM: Malformaciones múltiples

OMS: Organización mundial de la salud

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RD: Retraso en el Desarrollo

SCI: Significancia clínica incierta

INDICE DE FIGURAS

No	Nombre	Página
1	Gráfica de porcentaje de población con discapacidad según dificultad en la actividad.	7
2	Algoritmo para la clasificación de CNV según los lineamientos del ISCA.	26
3	Gráfica de segmentación log ₂ del caso#1 vs control femenino.	36
4	Ideograma del paciente del caso#2	36
5	Ideograma de la paciente 1 del caso#3	37
6	Ideograma de la paciente 2 del caso#3	37
7	Ideograma del paciente del caso#4	37
8	Ideograma de la paciente del caso#5	38
9	CNV de SCI identificado en el paciente del caso#2	40
10	Casos reportados en la posición genómica de la duplicación del caso#2	41
11	Gráficos de CN-LOH de las pacientes del caso#3	42
12	Representación del traslape de CN-LOH en ambas pacientes del caso#3	42
13	Análisis de LOH en las pacientes del caso#3	43
14	Esquema de la delección en 3p26.1-p26.3 del caso#4.	44
15	Análisis de los puntos de ruptura de la delección en 7q21.3-31.1	45
16	Caso #5. Imagen A,B y C.	46
17	Gráficos de segmentación log ₂ del caso#2	49
18	Patrones de metilación caso#3	50
19	Resultados del análisis de RFLPs (caso#4)	51

INDICE DE TABLAS

No	Nombre	Página
1	Clasificación de la DI según la OMS	5
2	Comparación de cariotipo vs microarreglos genómicos	13
3	Resultados de la identificación de CNVs en los pacientes	39
4	Alteraciones genómicas encontradas en los pacientes	39
5	Genes deletados en 7q21.3q31.1 potencialmente relacionados a algunas características clínicas frecuentes observadas en otros casos con delecciones similares	47
6	Características clínicas de casos de delección reportados en 7q21q32 pero con un aparente traslape mayor en la región 7q21.3q31.1.	48

RESUMEN

Lizeth Alejandra Martínez Jacobo

Fecha de Graduación: Julio, 2013

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del Estudio: “Caracterización molecular por aCGH de alteraciones genómicas en pacientes con malformaciones múltiples y discapacidad intelectual de etiología desconocida”

Número de páginas: 109

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Área de Estudio: Diagnóstico Molecular

Propósito y Método del Estudio: Las alteraciones genómicas son la principal causa de anomalías congénitas y del desarrollo como rasgos dismórficos, retraso en el desarrollo (RD)/discapacidad intelectual (DI), así como de pérdidas gestacionales. En México, el diagnóstico en pacientes con malformaciones múltiples (MM) y DI se limita a cariotipo de mediana resolución, FISH y MLPA. En este estudio se realizó un escaneo genómico mediante microarreglos de hibridación genómica comparativa (aCGH) en 6 pacientes (estudiados en 5 casos) con MM y DI, se identificaron y clasificaron las CNV, se validaron los hallazgos encontrados dependiendo del caso. Adicionalmente, con los datos generales obtenidos se generó una base de datos de variantes en el número de copias (CNV) benignas. Se realizó una asociación genotipo-fenotipo de las alteraciones genómicas identificadas.

Contribuciones y Conclusiones: Se identificaron y/o delinearon alteraciones genómicas patogénicas en 3 de los 5 casos de estudio. Se identificó una pérdida de heterocigosidad de copia neutral (CN-LOH) como probable mecanismo patogénico del fenotipo presentado en un par de hermanas. Se identificó una región que sugiere un síndrome de delección en 7q21.3-q31.1 (artículo aceptado) de acuerdo a las características clínicas de los casos reportados y las regiones de traslape. Por otra parte, con los resultados obtenidos se apoya indirectamente el papel del gen SRGAP3 como principal candidato para el fenotipo de DI en pacientes con delección en 3p y se confirma el tenue efecto de los genes deletados (en 3p26) sobre el fenotipo de DI en nuestro paciente y otros casos similares.

Firma del director:

Dr.C. Carlos Córdova Fletes

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Las alteraciones genómicas son la principal causa de anomalías congénitas y del desarrollo como rasgos dismórficos, retraso en el desarrollo (RD)/discapacidad intelectual (DI), así como de pérdidas gestacionales.(X. Lu et al., 2007) Las malformaciones congénitas afectan del 3 a 5% de los recién nacidos vivos (Barboza-Argüello M, 2008) y en México son la segunda causa de muerte en niños menores de 5 años. En la actualidad no se cuentan con datos precisos acerca de la incidencia de RD/DI en nuestro país (CENSO, 2010).

El estudio de rutina para el diagnóstico en pacientes con malformaciones congénitas y DI o RD es el cariotipo, esta técnica de citogenética clásica permite detectar aneuploidías cromosómicas comunes, como la monosomía X y las trisomías 13, 18 y 21, entre otras, así como también alteraciones estructurales. Sin embargo, debido a que la técnica de cariotipo presenta una resolución de ~5-10 Mb, un gran porcentaje de los pacientes analizados pasan sin alteraciones citogenéticas, dejando así una gran incertidumbre a los genetistas en cuanto al diagnóstico y/o asesoramiento genético (Smeets, 2004) .

Con el advenimiento de la era postgenómica ha sido posible identificar alteraciones genómicas como microdeleciones y microduplicaciones causantes de nuevos síndromes de retraso mental y/o malformaciones congénitas a través de la estrategia llamada "genotipo a fenotipo" o "dismorfología inversa" (Shaffer et al., 2007). Estos avances en el diagnóstico genético han sido posibles con la introducción de los microarreglos genómicos. Esta técnica consiste en la comparación del contenido de ADN en dos

genomas diferencialmente marcados, un genoma de ensayo (paciente) y un genoma de referencia (control), y su alto nivel de resolución permite detectar alteraciones cromosómicas de hasta 700 pb en tamaño, dependiendo del diseño del chip. A través de estudios realizados con estas plataformas, se sabe que la frecuencia con la que las anomalías cromosómicas y/o reordenamientos genómicos se detectan en pacientes con RD/DI es mayor con la presencia de malformaciones o características dismórficas (Stankiewicz & Beaudet, 2007). De esta manera, el diagnóstico genético final estándar de un paciente con MM y/o RD/DI, debe incluir 1) cariotipo convencional que detecta alteraciones estructurales y numéricas conspicuas, 2) Hibridación in situ fluorescente (FISH) para detectar reordenamientos subteloméricos y síndromes de microdelección conocidos o confirmar hallazgos de cariotipo, y 3) los análisis genético- moleculares de los genes asociados a síndromes comunes de DI. Sin embargo, a pesar de este panel de estudio completo, la etiología no está clara en aproximadamente la mitad de los pacientes con DI (Engels et al., 2007).

1.1 Malformaciones múltiples

La OMS define defecto congénito como: “toda anomalía del desarrollo morfológico, estructural, funcional o molecular, presente al nacer (aunque se manifieste después del nacimiento)”. Los defectos congénitos abarcan una amplia variedad de patologías y su prevalencia puede llegar hasta un 7-10% durante el primer año de vida. Actualmente, no existen estimaciones sólidas del número de niños nacidos con un trastorno congénito grave atribuible a causas genéticas o ambientales. Algunos de los trastornos congénitos graves más frecuentes son los defectos cardíacos, los defectos de cierre de tubo neural y el síndrome de Down (Barboza-Argüello M, 2008).

Los defectos congénitos o malformaciones congénitas forman un grupo heterogéneo de trastornos que pueden obedecer a la presencia de mutaciones monogénicas, alteraciones cromosómicas, a teratógenos presentes en el medio ambiente o a carencias de micronutrientes, entre otros factores (OMS, 2010). Las malformaciones congénitas se pueden clasificar, según el número de ellas presentes en el recién nacido, como: 1) defecto único (defectos aislados) y 2) malformaciones múltiples (MM). En este último grupo se pueden encontrar: 1) Aquellos cuyos defectos correspondan con alguno de los síndromes ya descritos en la literatura. Los síndromes generalmente suelen tener la misma causa y el mismo riesgo familiar, 2) Pacientes con defectos congénitos que afectan a diferentes estructuras corporales aparentemente no relacionadas, en quienes no se ha podido diagnosticar ningún síndrome conocido y no se ha identificado un agente causal. 3) Pacientes con un único defecto del desarrollo, pero en quienes, ese defecto, ha dado lugar secundaria y secuencialmente, a alteraciones de otras estructuras cuyo desarrollo morfológico era normal. Este tipo de eventos se denominan “secuencias” y estas pueden ser producidas por muchos agentes causales, pueden manifestarse en pacientes polimalformados sin etiología establecida, como síndromes o como una secuencia aislada. Las MM, también son conocidas como anomalias congénitas múltiples (ACM). Para que las malformaciones congénitas sean consideradas como MM, el paciente debe presentar dos o más malformaciones mayores (e.g. defecto del tubo neural, defectos cardíacos) y/o tres o más malformaciones menores (e.g. sindactilia, pabellones auriculares de forma anormal) (Barboza-Argüello M, 2008). Por último, las MM afectan del 3 al 5% de los recién nacidos vivos, y el 40% corresponden con síndromes descritos y el 60% corresponden a causa desconocida(OMS, 2010).

1.2 DI

La DI es un deterioro significativo de las funciones cognitivas y de adaptación, con inicio antes de los 18 años, otros términos comunes son las dificultades de aprendizaje, retraso mental, retraso en el desarrollo, deterioro cognitivo y deficiencia mental (Sagoo et al., 2009). De hecho, la OMS define la discapacidad intelectual como un cociente de inteligencia (CI) <70, que se caracteriza por un funcionamiento cognitivo significativamente limitado, junto con limitaciones en habilidades adaptativas en dos o más de las siguientes áreas: Comunicación, Autocuidado, Vida en el Hogar, Habilidades Sociales, Uso de la Comunidad, Autodirección, Salud y Seguridad, Habilidades Académicas Funcionales, Ocio y Trabajo (OMS, 2010).

Tabla 1. Clasificación de la discapacidad intelectual de acuerdo al CI, según la OMS:

1. Leve:	CI entre 50-69
2. Moderada:	CI entre 35-49
3. Grave:	CI entre 20-34
4. Profunda:	CI inferior a 20

El RD describe el retraso significativo en dos o más de las siguientes áreas: cognición, habla/lenguaje, habilidades motoras gruesas/finas, habilidades sociales/personales, y vida diaria. El RD es evidenciado como un déficit en las habilidades de aprendizaje y adaptación específicas de la edad, en comparación con sus pares cronológicos. Por lo tanto, debido a que el diagnóstico exacto y válido de la DI requiere evaluación de la inteligencia, el término RD es generalmente reservado para los niños de cinco años de edad o menos, en quienes las pruebas de CI no pueden ser aplicables (Shaffer, 2005). En más de la mitad de los casos se desconoce la causa de la discapacidad intelectual y esta proporción es mayor en países no desarrollados (Márquez-Caraveo, 2011).

1.2.1 Epidemiología de la DI

A nivel mundial se señala que la DI es frecuente, con un alto impacto en el funcionamiento individual y una prevalencia aproximada de 1-4%. En Latinoamérica la prevalencia puede ser cuatro veces mayor debido a su asociación a factores como la desnutrición, las complicaciones obstétricas y perinatales, la prematurez, la intoxicación por plomo, las infecciones del sistema nervioso central (SNC) y la pobreza; factores que han sido superados en países desarrollados (Márquez-Caraveo, 2011).

En México no hay datos precisos acerca de RD/DI, aunque datos disponibles sobre DI en el país, los cuales provienen del INEGI (censo de población y vivienda), señalan que en el año 2010 la discapacidad alcanzó el 5.1% de la población total. En este censo se tomó en cuenta como persona con discapacidad: a las personas con alguna limitación para atender el cuidado personal, para caminar y moverse, para escuchar, para hablar o comunicarse, para poner atención, para ver y con alguna discapacidad mental. Según esta encuesta la discapacidad mental abarca cualquier problema de tipo mental como DI, alteraciones de la conducta o del comportamiento. De la población con alguna discapacidad en México, el 58.3% tiene una discapacidad motriz y el 8.5% algún tipo de discapacidad mental.

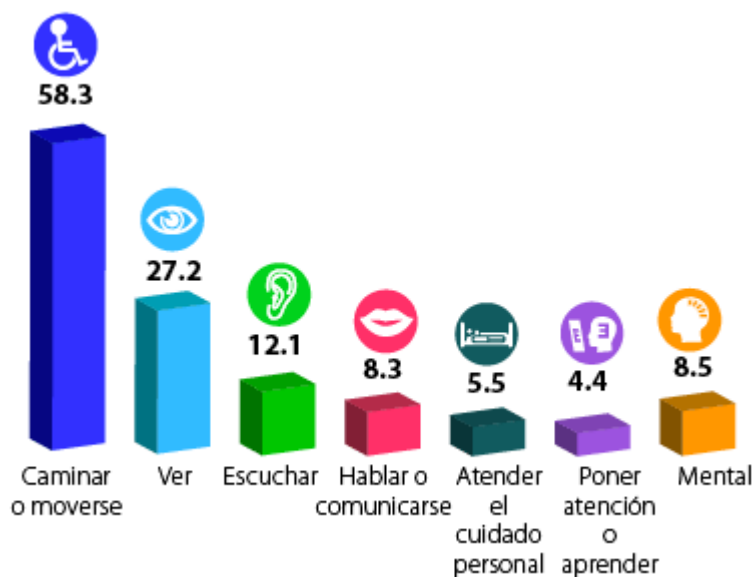


Figura 1. Gráfica de porcentaje de la población con discapacidad según dificultad en la actividad (Año 2010). La suma de porcentajes es mayor a 100% por la población con más de una dificultad.

Género

La prevalencia es notablemente superior en los varones en todos los niveles de DI, presentando un cociente de 1,7 hombres por cada mujer afectada. Esta situación se debe a que un porcentaje importante de síndromes de causa genética que cursan con DI van ligados al cromosoma X (Hera, 1993).

Edad

Por grupos de edad, el diagnóstico de DI es menos frecuente durante los primeros años de vida (antes de los 5 años se considera RD), aunque va aumentando a lo largo de la etapa escolar, en la medida en que se demanda un mayor rendimiento intelectual, hasta

alcanzar un pico máximo entre los 14 y los 15 años. En la edad adulta, desciende alrededor del 1% (Hera, 1993).

Clase Social

Los niveles de DI grave y profundo se distribuyen uniformemente entre todos los estratos sociales, pero la forma leve, en la que influyen factores ambientales como la desnutrición (que afecta al desarrollo cerebral) y la deprivación afectiva o cultural (que afecta al desarrollo intelectual y emocional), es más frecuente en las clases bajas (Hera, 1993).

1.2.2 Etiología de la DI

El RD/DI afecta aproximadamente del 2 al 3% de la población. La DI puede ser causada por factores ambientales (incluyendo agentes teratógenos, hipoxia perinatal, e infecciones), alteraciones metabólicas, así como por alteraciones genéticas tales como aberraciones cromosómicas, microdeleciones conocidas y mutaciones en genes ya conocidos asociados a DI (Engels et al., 2007). Los desordenes cromosómicos y genéticos se presentan aproximadamente de un 30–40% de los casos de DI de moderado a grave, los factores medioambientales pueden explicar de un 10–30%; en tanto que la causa es desconocida en un 40% de los casos. En los casos con DI leve, las causas genéticas y ambientales pueden explicar una proporción aproximadamente igual del 30%; en tanto que la causa es desconocida en el restante 70% de los casos (Knight et al., 1999; Moeschler et al., 2006).

1.3 Herramientas de Diagnóstico

A finales del siglo 19, se dieron los primeros pasos en el campo de la citogenética humana. La citogenética es el estudio de la estructura, función, y evolución de los cromosomas. La citogenética puede dividirse en citogenética clásica, citogenética molecular y citogenómica (Iourov et al., 2008).

La citogenética clásica se basa en técnicas de bandeo para visualizar los cromosomas y fueron las únicas técnicas para el estudio del cariotipo durante varias décadas del siglo pasado (Iourov et al., 2008). La citogenética molecular comprende un conjunto de las técnicas, que operan ya sea con el genoma completo o con secuencias específicas de ADN para estudiar la estructura del genoma y sus funciones a nivel cromosómico o subcromosómico (Yurov et al., 2008). Por otra parte, la citogenómica es la unión de los métodos citológicos con técnicas de genómica para analizar la estructura y organización de los genomas enteros en alta resolución (Lilly et al., 2001).

El cariotipo es el estándar de oro en el diagnóstico genético y es una técnica de citogenética clásica mediante la cual es posible visualizar los cromosomas por tamaño y posición del centrómero, siendo posible detectar alteraciones numéricas (aneuploidías y poliploidias) y estructurales (translocaciones, deleciones, inversiones) con una resolución aproximada de 5 a 10Mb, obteniendo entre 400-450 bandas (Smeets, 2004).

El método de bandeo más utilizado, es conocido como bandas G, se obtiene mediante una digestión enzimática (tripsina), seguida de tinción con Giemsa, con este método se obtiene un patrón de bandeo de 400 bandas para cada genoma haploide cuando se realiza un cultivo estándar y aproximadamente 850 bandas cuando se realiza un cultivo de alta

resolución. Cada una de estas bandas corresponde a 8.000 kb de ADN. Las bandas oscuras son regiones ricas en A-T de replicación tardía y las bandas claras corresponden a regiones ricas en G-C de replicación temprana y se consideran como regiones genéticamente activas. Cada cromosoma presenta un patrón de bandas específico (De Vries et al., 2005).

Las alteraciones cromosómicas de un tamaño < 3-5 Mb o las reorganizaciones complejas, son muy difíciles de identificar mediante las técnicas de citogenética clásica, por lo que las nuevas técnicas de citogenética molecular intentan disminuir esa limitación. Además, que para realizar algunas de estas técnicas ya no es necesario utilizar células en cultivo, como MLPA y aCGH.

Dentro de la citogenética molecular se encuentran técnicas como FISH (incluyendo sus variantes), la hibridación genómica comparativa (CGH, por sus siglas en inglés) y la amplificación multiplex por sonda dependiente de ligación (MLPA, por sus siglas en inglés). La técnica de FISH utiliza sondas de cromosoma o locus específicos, las cuales permiten el diagnóstico de síndromes de microdelección comunes tales como DiGeorge / síndrome velocardiofacial (DG/VCFS), síndrome de Wolf-Hirschhorn (4p-), y síndrome de Cri-du-chat (5p-) en pacientes con rasgos dismórficos y/o MM (Lu et al., 2008) MLPA es una técnica que utiliza ADN como muestra y permite la detección de cambios en el número de copias de varias regiones cromosómicas, por lo que ha sido útil para la detección de diferentes síndromes de microdelección/microduplicación en un solo ensayo (Cho et al., 2009). Sin embargo, es importante mencionar que las sondas utilizadas para FISH y MLPA son diseñadas y aplicadas para un diagnóstico específico, por lo tanto no

se pueden detectar alteraciones nuevas. A pesar de esta limitación ha sido posible detectar pequeños reordenamientos en regiones subteloméricas en aproximadamente el 5% de los niños afectados con DI, realizando un análisis regional mediante FISH o MLPA (Smeets, 2004; De Vries et al., 2005).

La técnica de hibridación genómica comparativa (CGH, por sus siglas en inglés) permite detectar desequilibrios en el genoma, usando cromosomas metafásicos y en una única hibridación. CGH fue la primera técnica combinada de citogenética e hibridación fluorescente in situ que permite hacer un análisis genómico global. Inicialmente se utilizó para el analizar el número de copias en tumores, y posteriormente se utilizó para el análisis de desequilibrios cromosómicos constitucionales (Shaikh, 2007). Estas pruebas y el desarrollo temprano de la hibridación genómica comparativa se desempeñaron como peldaños en la evolución de los microarreglos de hibridación genómica comparativa (aCGH) (Stankiewicz & Beaudet, 2007).

1.3.1 Microarreglos genómicos

La llegada de la tecnología de alta resolución de microarreglos ha facilitado en gran medida la investigación de los trastornos cromosómicos. Los microarreglos basados en el análisis genómico del número de copias son una prueba genética clínica frecuente para pacientes con MM y/o RD/DI en países desarrollados. Esta tecnología se conoce también como microarreglos cromosómicos (CMA), microarreglos de hibridación genómica comparativa (aCGH, por sus siglas en inglés) o cariotipo molecular (Vissers, et al., 2005).



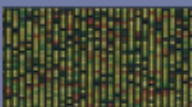
Los aCGH identifican las variaciones del número de copias (ya sean ganancias o pérdidas) en el genoma completo con una alta resolución. Esta tecnología combina las técnicas de fluorescencia con las plataformas de microarreglos y permite la comparación del contenido de ADN en dos genomas diferencialmente marcados: un genoma de ensayo (paciente) y un genoma de referencia (control). Estas plataformas, también permiten el uso de miles de secuencias individuales de ADN de todo el genoma, proporcionando precisión en la formación en un solo experimento acerca de las ubicaciones de las aberraciones detectadas (Sagoo et al., 2009). Los microarreglos genómicos realizan un análisis genómico global con una resolución variable que va desde 700 pb-1 Mb, la cual depende del número de sondas presentes, así como el diseño del mismo (Affymetrix, 2010).

La utilidad de esta herramienta ya se ha verificado en diversos estudios, por ejemplo, Menten et al (2006), utilizaron microarreglos de 1Mb y detectaron desequilibrios cromosómicos submicroscópicos en 28 de 140 pacientes (20%) con MM y DI, los cuales habían presentado un cariotipo normal. Con esto, confirmaron que un alto porcentaje de casos de MM y RD/DI considerados como idiopáticos son causados por desequilibrios cromosómicos submicroscópicos, así como que el uso de microarreglos genómicos de mayor resolución pueden revelar un mayor número de desequilibrios cromosómicos pequeños.

En el 2007, Lu et al., realizaron un estudio con 2513 pacientes (MM y RD/DI) en busca de determinar el rendimiento diagnóstico de esta técnica para su implementación como prueba de rutina, con este estudio se encontró que el rendimiento diagnóstico aumenta

cuando el paciente presenta MM o dismorfias, simultáneamente con RD/DI (X. Lu et al., 2007). Sagoo et al., (2009) realizaron un meta-análisis de 19 estudios en pacientes con MM y/o RD/DI y un cariotipo normal, determinando que aCGH es capaz de identificar anomalías genéticas causales en este tipo de pacientes y mostrando, que el rendimiento de falsos positivos es bajo (7%, 95% IC: 5%, 10).

Cariotipo y microarreglos genómicos

	Cariotipo (bandas G) 	Microarreglos genómicos 
Método	Visualización directa de cromosomas	Comparación de genoma problema con un genoma de referencia
Detecta	<ul style="list-style-type: none"> •Aneuploidías •Alteraciones estructurales •Translocaciones balanceadas y desbalanceadas 	<ul style="list-style-type: none"> •Aneuploidías •Alteraciones cromosómicas cripticas •Translocaciones desbalanceadas •CNVs •LOH •UDP
Rendimiento diagnóstico en ACM y RD/DI	~3%	~20% aCGH ~30% aCGH-SNPs
Resolución	5-10 Mb	700pb-5Kb
Ventajas	La mayoría de las alteraciones detectadas son patogénicas.	Incrementa el rendimiento diagnóstico
Limitaciones	Bajo rendimiento diagnóstico	Variantes de significancia clínica incierta Alto costo

Palmer, E., Palani, S. & Savard, D. Chromosome microarrays in clinical genetics: practical issues. *Journal of Medical Genetics* 49: 121-131 (2012).
Sagoo, S. S. et al. Array CGH in patients with learning disabilities: identification and segregation analysis of clinical cytogenetic rearrangements. *Journal of Medical Genetics* 46: 118-124 (2009).
Jain, S. et al. Array CGH in patients with learning disabilities: identification and segregation analysis of clinical cytogenetic rearrangements. *Journal of Medical Genetics* 46: 118-124 (2009).
Savard, D. et al. Molecular diagnosis of human congenital cytogenetic abnormalities. *Clinical Genetics* 87: 139-141 (2015).

Tabla 2. Comparación del cariotipo y microarreglos genómicos (Palmer et al., 2012).

1.4 Variaciones en el número de copias

En el 2004, se publicaron dos estudios clave de individuos sanos que mostraron que cambios de número de copias que involucran a cientos de miles de pares de bases de ADN fueron inesperadamente comunes en todo el genoma humano (Iafrate et al., 2004;

Sebat et al., 2004). Estudios posteriores, que utilizaron métodos más sensibles, extendieron estos resultados, proporcionando evidencia de variación sutil en grandes porciones del genoma humano.

Las variaciones en el número de copias (CNV) se definen como segmentos de ADN > 1 kb de longitud pero menor a 5 Mb, cuyo número de copias varía con respecto a un genoma de referencia. El tamaño de CNV es menor al nivel de resolución de las técnicas citogenéticas. Aunque los CNV son menos frecuentes que los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), afectan a una mayor proporción del genoma debido a su tamaño. Se cree que aproximadamente el 12% del genoma es variable en número de copias y que un 10-60% de estas variaciones abarcan genes. Estos segmentos de número de copias variable contribuyen a la extensa diversidad fenotípica entre humanos y se ha asociado con susceptibilidad a enfermedades (Vucic et al.,2010).

Algunos CNV se han asociado a trastornos neurológicos como DI y a MM. Sin embargo los CNV también se identifican comúnmente en individuos sanos. Por lo tanto es crucial tanto para aplicaciones de diagnóstico y de investigación poder distinguir entre los CNV que causan enfermedad y los CNV benignos que se producen como variación genómica normal. La separación de estos dos tipos de CNV puede tomar ventaja de las diferencias significativas en su contenido génico. Por ejemplo, los CNV benignos son ricos en secuencias repetitivas. Por el contrario, CNV asociados a diversas enfermedades tienden a contener una alta densidad de elementos funcionales.

En el presente proyecto se creó una base de datos CNV benignos identificados en individuos sanos y afectados, que sirvió de apoyo para poder distinguir los CNV

patogénicos de los benignos, aplicado en el análisis del escaneo genómico de 6 pacientes que presentan MM y/o DI.

1.5 JUSTIFICACIÓN

En México los estudios en MM y RD/DI se han limitado a técnicas como cariotipo de mediana resolución, FISH y MLPA (para síndromes definidos), pasando por alto muchas alteraciones cromosómicas crípticas. Así, la aplicación de plataformas de estudios genómicos de alta resolución como microarreglos de alta densidad para la caracterización molecular de alteraciones genéticas permitirá establecer correlaciones genotipo-fenotipo más precisas a través de la identificación de alteraciones de genes susceptibles a dosis, cooperar con la identificación de genes asociados a la etiología de MM y/DI, así como también orientar el consejo genético. Por otra parte, la existencia de CNV aparentemente benignos en diferentes poblaciones, suelen confundir el diagnóstico molecular por microarreglos cuando no se tiene conocimiento de la naturaleza de tales variantes en una población dada, por lo que su descripción a partir del mayor número posible de sujetos (sanos o afectados) en nuestra población será valiosa y servirá para: a) diferenciar entre CNV benignas y patogénicas en el presente proyecto y b) apoyar futuros estudios relacionados a variantes genómicas poblacionales. Para nuestro conocimiento, el presente trabajo es uno de los primeros en nuestro país en aplicar el escaneo genómico por microarreglos enfocado a un set de pacientes con alteraciones congénitas y/o RD/DI.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar molecularmente las alteraciones genómicas en pacientes con DI y MM mediante técnicas de alta resolución.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Crear una base de datos interna de CNV benignos en sujetos sanos y afectados.
- 2) Identificar alteraciones genómicas patogénicas mediante microarreglos genómicos de alta densidad.
- 3) Validar las alteraciones encontradas según sea el caso.
- 4) Asociar las alteraciones genómicas con las características clínicas de los pacientes.

CAPÍTULO 3

DISEÑO METODOLÓGICO

3.1 Diseño de estudio

Observacional, transversal, retrospectivo con seguimiento y analítico.

3.2 Universo de estudio

El universo de estudio estuvo constituido por individuos con MM y RD/DI de etiología desconocida. Esta muestra se obtuvo de pacientes que acudieron a la consulta de genética del Centro de Investigación Biomédica de Occidente del IMSS en Guadalajara, Jalisco, así como de un paciente que acudió a la consulta de genética en el Hospital Regional Materno Infantil de Nuevo León.

3.3 Muestra de estudio

Pacientes captados en el periodo comprendido entre Abril de 2011-Diciembre 2012, así como los padres biológicos de los pacientes.

3.4 Criterios de inclusión

- ✓ Pacientes con MM y/o RD/DI referidos por las instituciones participantes.
- ✓ Cariotipo Normal ó cariotipo alterado sin delineación de la alteración.
- ✓ Que cuenten con evaluación clínica integral (diferentes especialistas y/o abordajes):
Que se hayan descartado factores extrínsecos, como agentes teratógenos, infecciones y exposición a tóxicos como causantes del fenotipo.
- ✓ Padres firmen consentimiento informado.

3.5 Criterios de no inclusión

Pacientes con MM y RD/DI asociado a un síndrome conocido.

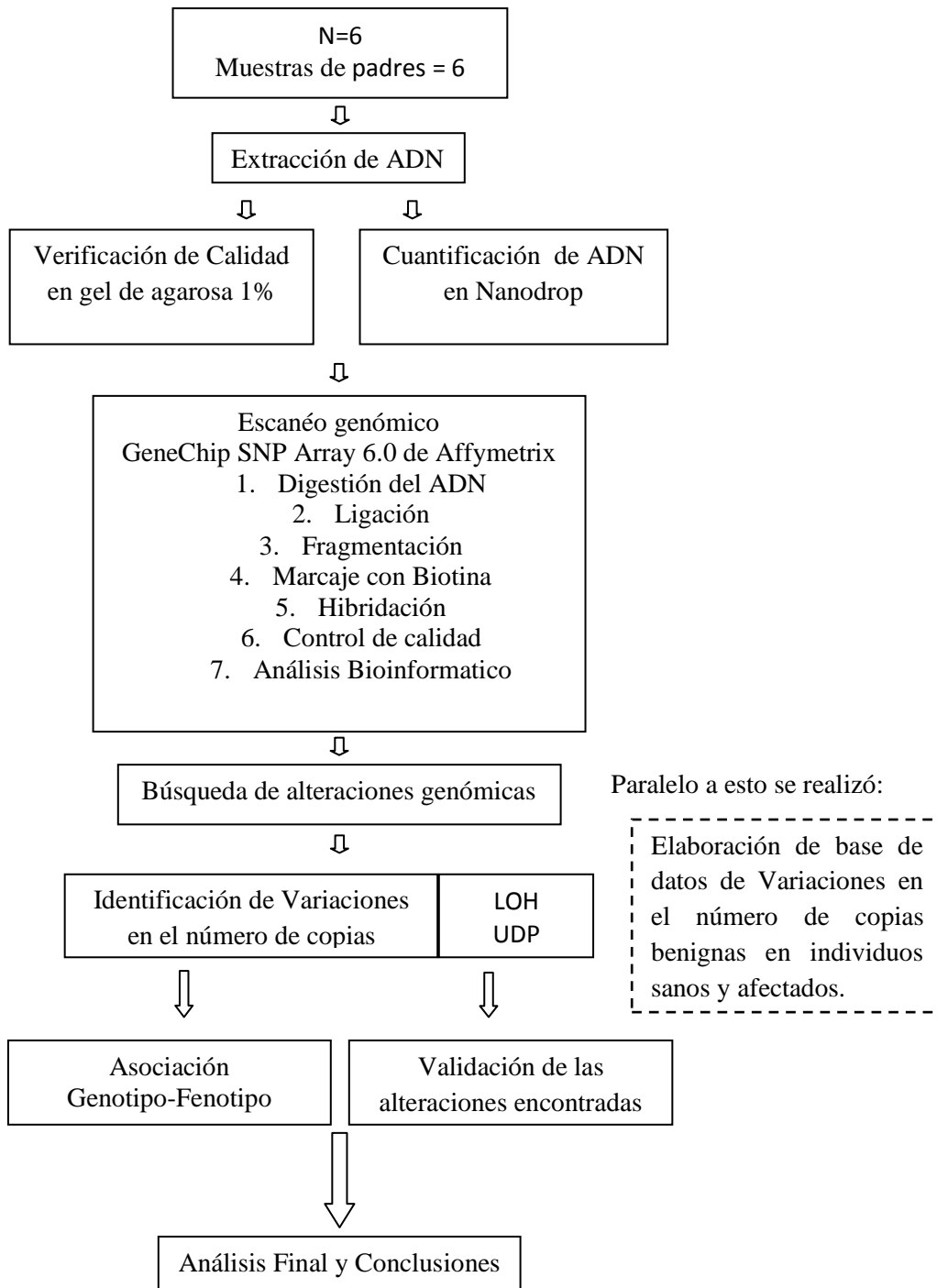
3.6 Criterios de exclusión

Muestras de mala calidad o cantidad insuficiente para realizar el análisis.

CAPÍTULO 4

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Estrategia General



4.2 MATERIALES

4.2.1 Reactivos

Extracción de DNA

- Kit Genra Puregene Blood de QIAGEN.

Electroforesis

- Agarosa grado Biología Molecular marca BioRad
- Marcador de peso molecular EZ load(50µg/ml) marca BioRad
- Buffer de carga GelPilot 5X de QIAGEN

Microarreglos genómicos

- Genome-Wide Human (CGH/SNP) SNP Array 6.0 Affymetrix
 - Affymetrix® Genome-Wide Human SNP Nsp/Sty Assay Kit 6.0
- Agilent SurePrint G3 Hmn (CGH+SNP) 4x180K
 - Kit SureTag Complete DNA labeling
 - Kit de hibridación Agilent
 - Kit de lavado Agilent
- NimbleGen CGX-3 3x720k
 - Kit Dual-Color DNA labeling
 - Kit de hibridación NimbleGen
 - Kit de lavado NimbleGen

Microarreglos de metilación

- Nimblegen 3x720K CpG RfSeq Promoter Array

Enzima *MseI* (10 000 U/ml) New England, BSA (50mg/ml) Invitrogen, Protein A agarose (5 ml) Invitrogen, Glycogen (20mg/ml), Anticuerpo Anti 5-Methyl Cytidine (Abcam 1mg/ml), Proteinasa K(20mg/ml)QIAGEN, Kit PCR purification QIAGEN, kit WGA2 de sigma, kit de marcaje Dual Color y kit de hibridación marca NimbleGen.

4.2.2 Material Biológico

Se utilizaron 12 muestras de sangre periférica en tubos con EDTA como anticoagulante.

4.2.3 Equipo

Cámara de electroforesis marca BIO-RAD, fotodocumentador GelDoc XR BIO-RAD, Espectrofotómetro NanoDrop 8000, termociclador Veriti, termociclador Geneamp 9700, centrifuga refrigerada 54178R marca eppendorf, centrifuga personal 5453 eppendorf, concentrador de vacío GeneVac, termo agitador comfort marca eppendorf, estación de microarreglos de Affymetrix (GenChip Scanner, Fluidics Station 450, GeneChip hybridization Oven 640), estación de microarreglos de NimbleGen (dryer, hybridization system y scanner).

4.2.4 Programas computacionales

- Genotyping Console Software 4.0
- NimbleScan v2.6 Software
- SignalMap v1.9 Software
- DEVA v1.0.2
- Feature Extraction software (Agilent)

- Agilent CytoGenomics software v2.5

4.3 MÉTODOS (ver anexos)

4.3.1 Escanéo Genómico

4.3.1.1 Naturaleza de la muestra

La muestra de trabajo fue sangre periférica recolectada en tubos Vacutainer con EDTA como anticoagulante. Se tomaron aproximadamente 4 ml de muestra en estas condiciones. La muestra se homogenizó por inversión y posteriormente se almacenaron a 4°C hasta su procesamiento.

4.3.1.2 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó por medio del kit comercial Gentra® Puregene Blood core (Qiagen) como se muestra en el anexo 2. Para este propósito, las células rojas sanguíneas fueron lisadas con buffer de lisis RBC, una vez lisadas las células rojas se llevaron a centrifugación para recuperar las células blancas sanguíneas en el sedimento, después se lisaron con buffer de lisis liberando el contenido citoplasmático y resultando una mezcla compuesta de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Se precipitaron las proteínas y posteriormente se centrifugaron para obtener una capa sólida de proteínas. Se recuperó posteriormente la fase acuosa que contiene el ADN. Finalmente se obtuvo el material genético mediante precipitación con isopropanol. Para eliminar el exceso de sales del ADN se lavó con etanol al 70%, se secó y se disolvió en la solución de hidratación de ADN del kit comercial.

4.3.1.3 Calidad de ADN por electroforesis y espectrofotometría

Se verificó la calidad de la extracción de ADN por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% con una alícuota de 4 μ L de ADN y 1 μ L de jugo azul. Las muestras se corrieron a 80 Volts durante 40 minutos. Posteriormente se llevó el gel a tinción con bromuro de etidio durante 10 minutos. Para visualizar el ADN se llevó el gel teñido al fotodocumentador Gel Doc 100 de Bio Rad (anexo 3).

El ADN se cuantificó en el equipo Nanodrop (Thermo Scientific), utilizando una alícuota de 1.5 μ L de ADN. Se verificó la calidad por medio de la relación 260nm/280nm, 260nm/230nm y la medición a 330nm. Los ácidos nucleicos (ADN y RNA) presentan su máximo de absorbancia a λ 260nm y las proteínas lo presentan a λ 280nm. La relación de absorbancias a estas longitudes de onda (260nm/280nm) se ha utilizado como una medida de la pureza tanto de ADN como de proteínas.

4.3.1.4 Microarreglos de genotipificación (anexo 4)

Brevemente, 250ng de ADN se sometieron a digestión por las enzimas de restricción StyI y NspI durante 2 horas a 37°C. Los productos digeridos fueron ligados posteriormente por un adaptador que reconoce extremos pegajosos y la enzima T4 ADN ligasa durante 3 hrs a 16°C y un paso posterior a 70°C por 20 minutos. Los fragmentos ligados se amplificaron utilizando un primer genérico que reconoce al adaptador. Se obtuvieron amplicones de 200-1200pb (considerado como primer punto de control de calidad) lo cual se verificó en gel de agarosa al 2%. Una vez que se verificó la obtención de los amplicones fueron purificados con Isopropanol (anexo 5). Los amplicones purificados fueron fragmentados posteriormente con la enzima *ADNasaI* durante 35

minutos a 37°C y un paso posterior de 15 minutos a 95°C. La fragmentación fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa al 4%, los productos de fragmentación se corrieron a 100V por 45 minutos (segundo punto de control de calidad), donde se obtuvo una distribución de los productos fragmentados <180 pb esperada. Posteriormente se procedió a realizar el marcaje con la enzima TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) durante 4 horas a 37°C. La hibridación se llevó a cabo en el horno de hibridación durante 18 hrs a 50°C y 60 rpm, el microarreglo utilizado fue GeneChip SNP Array 6.0. El microarreglo utilizado contiene 1, 852, 600 sondas, de las cuales 906,600 sondas son de SNPs y 946,000 sondas de CNVs con un espacio intermarcador de 696 pb. Una vez terminada la hibridación se llevó el chip al lavado y tinción en la estación de fluidos (GeneChip Fluidics Station 450-Affymetrix). La tinción se llevó a cabo utilizando una solución de Streptavidina-Ficoeritrina (SAPE) y un anticuerpo anti-streptavidina. Tanto el lavado como la tinción utilizan el software Affymetrix GeneChip Command Console (AGCC). Los arreglos fueron digitalizados mediante el GeneChip Escáner de Affymetrix. Los datos escaneados fueron colectados y extraídos por el Software Affymetrix GeneChip Command Console (AGCC). El análisis de la información de los arreglos se llevó a cabo con el software Genotyping Console v4.0, con el cual se obtienen 4 tipos de archivos 1) Archivo .ARR, en el cual se encuentran los datos del ensayo (como ID, sexo, edad, etc.), 2) Archivo .DAT, el cual es una imagen de las señales encontradas, 3) Archivo .CEL, el cual es la versión computarizada del archivo .DAT y proporciona los valores de intensidad de las señales y 4) Archivo .CHP, el cual proporciona información acerca de la cantidad de llamadas al genotipo para cada sonda representada en el arreglo.

4.3.1.4 Control de calidad del escanéo genómico en plataforma Affymetrix

A partir del archivo .CEL generado se realizó el control de calidad, la corrida con un porcentaje de 85-100% se considera de buena calidad, sin embargo en este trabajo se tomo como punto mínimo de calidad un valor de QC del 90%.

4.3.1.5 Algoritmo Birdseed y Algoritmo Canary

El algoritmo Birdseed se utilizó para la detección de SNPs por medio de las llamadas al genotipo. Es decir, se considera una señal A y una B para cada uno de los alelos y de esta manera se asigna el genotipo. Cuando no se detecta señal no hay llamada al genotipo. El Algoritmo Canary se utilizó para identificar los CNV o polimorfismos en el número de copias (CNP).

4.3.2 Identificación de alteraciones genómicas

4.3.2.1 Variaciones en el número de copias (CNV)

Para analizar los resultados se utilizó el software Genotyping Console 4.0, se utilizó el constructo NCBI 36/hg18. Se realizó una interpretación individual de ganancias o pérdidas del número de copias. Las CNV se clasificaron en tres categorías de acuerdo a los lineamientos del ISCA: CNV benignas, patogénicas y de significancia clínica incierta (SCI). Se utilizaron las bases de datos DECIPHER, OMIM, DGV y una base de datos interna. La base de datos interna se realizó tomando en cuenta el tamaño del CNV, los puntos de ruptura, número de sondas que incluye la región, el tipo de CNV (deleción o duplicación), la citobanda, así como los genes involucrados.

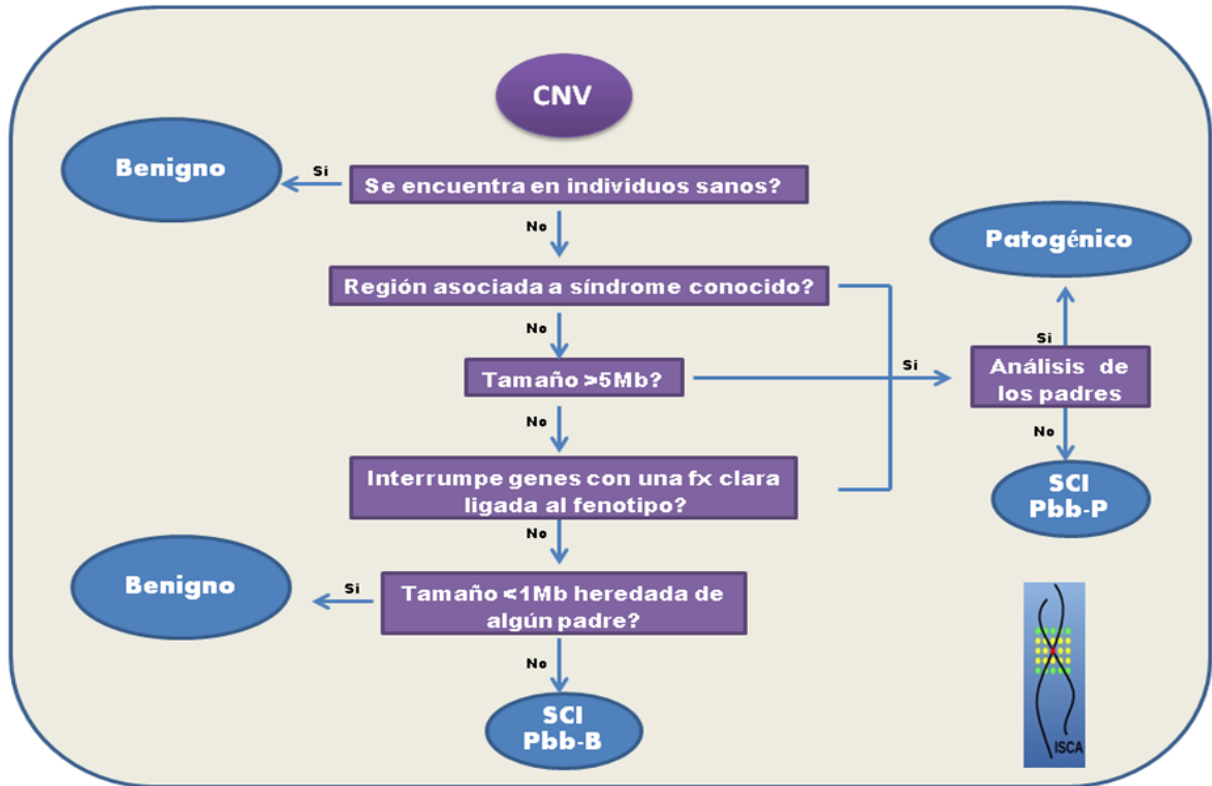


Figura 2. Algoritmo para la clasificación de CNV según los lineamientos del ISCA. Pbb-P(probablemente patogénico), Pbb-B(Probablemente benigno).

4.3.2.2 Identificación de LOH

La pérdida de heterocigocidad (LOH, por sus siglas en inglés) se detectó con las 906,600 sondas para SNP, la pérdida de heterocigocidad de copia neutral (CN-LOH, por sus siglas en inglés) se demuestra porque no hay pérdida o ganancia en el número de copias. Por lo tanto, cuando una constelación homocigota de llamadas al genotipo se combina con número diploide de copias, se puede establecer el diagnóstico de CN-LOH.

4.3.3 Validación de las alteraciones encontradas

4.3.3.1 Validación de alteraciones cromosómicas por plataforma de microarreglos de NimbleGen

El microarreglo utilizado fue el Nimblegen 3x720K CGX para corroborar las alteraciones, cuando fuera necesario, en aquellos pacientes que presentaron alteraciones en el número de copias en la plataforma de Affymetrix. La búsqueda de la alteración por una segunda plataforma es requerida para confirmar los resultados obtenidos y, al menos en nuestro estudio, fue más práctico utilizar otra plataforma que otra metodología alternativa. Para esta plataforma se partió de 0.5µg de ADN problema y ADN control de alta calidad, los cuales fueron marcados con Cy3 y Cy5 respectivamente durante 2 horas a 37°C con el fragmento Klenow (3'→5'exo-). Se detuvo la reacción, se precipitó con isopropanol, para purificar posteriormente con etanol, el ADN se seco con vacío protegido de la luz y se rehidrató con 25µL de agua grado PCR. Posterior a esto se cuantificaron las muestras de ADN y se colocaron en un mismo tubo 31µg de la muestra, así como del control. Las mezclas ADN problema-control se secaron con vacío protegidos de la luz y se resuspendieron con 5.6 µL de solución STC (Sample Tracking Control) y se llevó a 20 µL con solución de hibridación, se incubó a 95°C por 5 minutos, se colocaron los tubos a 42° C y se cargaron en el arreglo 18 µL de la solución. La hibridación se llevó a cabo durante 72 horas a 42°C. Posterior a esto se llevó a cabo el lavado y secado del chip, así como el escaneo. El análisis de datos se realizó utilizando los software NimbleScan v2.6 y SignalMap v1.9.

4.3.4 Búsqueda de patrones de metilación

4.3.4.1 Preparación de la muestra (anexo 6)

Brevemente, 6 µg de ADN de alta calidad se sometieron a digestión con la enzima *MseI* durante 15 horas a 37°C. Posterior a este tiempo se detuvo la reacción por calentamiento

de las muestras a 65°C por 20 min. Las muestras se sometieron entonces a purificación con el kit QIAquick PCR purification de Qiagen (anexo7), en este paso el ADN es retenido en el filtro de una columna por afinidad y posteriormente se libera del filtro por elución con buffer. El ADN purificado se cuantificó en espectrofotómetro NanoDrop 8000 y se corrieron 300 ng de ADN en gel de agarosa al 2% para verificar la presencia de los fragmentos esperados (200-1000 pb). Una vez que se verificó la presencia de los fragmentos, 1.25 µg de este ADN digerido se desnaturalizaron por calor durante 10 minutos a 95°C, posteriormente 60 µl de este ADN se almacenaron para utilizar como ADN control. Al resto del ADN se le agregó 1µg de anticuerpo monoclonal de ratón anti-5 metilcitidina, este anticuerpo se une a las islas CpG del ADN, lo cual ayuda al enriquecimiento de las muestras. La mezcla ADN-Anticuerpo se incubó toda la noche en plataforma con rotación a 4°C. La mezcla ADN-Anticuerpo se llevó a una solución con perlas de agarosa-proteína A, el anticuerpo de la mezcla se une a la proteína A, posteriormente se incubó en rotación por 2h a 4°C. Las perlas se lavaron 3 veces y se centrifugaron para descartar el sobrenadante, después se sometió a las perlas a una reacción de digestión, se agregó proteinasa k y se incubó toda la noche a 55°C. El ADN de las perlas se purificó con fenol y se midió la concentración de ADN, el rendimiento obtenido fue de 1500-1650 ng (50-55ng/µl).

4.3.4.2 Microarreglos de Metilación

El microarreglo utilizado fue el Nimblegen 3x720K CpG RfSeq Promoter Array para apoyar la validación del mecanismo patogénico sospechado en las pacientes del caso#3. Estos arreglos cubren las islas CpG, así como los promotores de los genes RefSeq bien caracterizados. Las regiones ubicadas 3.88 kb corriente arriba y 0.97 kb corriente abajo

de los promotores están cubiertas, así como 15,600 transcritos, 15,287 promotores y 15,790 islas CpG. Las regiones repetitivas fueron excluidas y las regiones intra e intergénicas no CpG no son cubiertas. La longitud de las sondas va de 50-75 mers. Para llevar a cabo este ensayo se partió de 1µg de muestra problema y control, los cuales fueron marcados con Cy5 y Cy3 respectivamente durante 3 horas a 37°C con el fragmento Klenow (3'→5'exo-). Se detuvo la reacción, se precipitó con isopropanol, para purificar posteriormente con etanol, el ADN se seco con vacío protegido de la luz y se rehidrató con 25µL de agua grado PCR. Posterior a esto se cuantificaron las muestras de ADN y se colocaron en un mismo tubo 15µg de la muestra, así como del control. La mezcla ADN problema-control fueron secados con vacío protegidos de la luz y se resuspendieron con 5.6 µL de solución STC y se llevó a 20 µL con solución de hibridación, se incubó a 95°C por 10 minutos, se colocaron los tubos a 42° C y se cargaron en el arreglo 18 µL de la solución. La hibridación se llevó a cabo durante 18 horas a 42°C. Posterior a esto, se realizó el lavado y secado del chip, así como su escanéo.

4.3.4.3 Análisis de microarreglos de metilación

La información de las imágenes obtenidas con el escáner se extrajo con el software NimbleScan. Para lo anterior, se realizó el alineamiento simultáneo de las imágenes (Cy3 y Cy5) del arreglo y se generó el reporte métrico experimental, el cual proporciona los datos de control de calidad del ensayo. Este software también generó los archivos GFF (.gff). Un archivo GFF (General Feature Format) es un formato de intercambio para los datos de base genómica. Un archivo GFF de metilación del ADN contiene datos

a escala de log₂-ratio. El software SignalMap v1.9 fue posteriormente utilizado para observar gráficamente la información.

4.3.5 Análisis de RFLPs

Se analizó el polimorfismo rs9333613 del gen *SHH* en el paciente del caso#4 y 20 individuos control aparentemente sanos a través de ensayo de RFLPs (del inglés, Restriction Fragment Length Polymorphism). Este polimorfismo se caracteriza por tres diferentes genotipos: el homocigoto wild type A/A, la variante heterocigota A/G y la variante homocigota G/G. La variante G, se ha asociado a comportamientos homosexuales en varones chinos. Para llevar a cabo este ensayo primero se diseñaron los iniciadores con el programa OLIGO 4.0. Los iniciadores utilizados fueron: forward SHHF 5'-ATC GTC ATC TGT GCC AGT TCC-3' y el reverso SHHR 5'CTT CCT CCG CTC TTG TGT TCT T-3', los cuales generan un producto amplificado de 401 pb. Se estandarizaron las condiciones de reacción para llevar a cabo la PCR utilizando un gradiente de temperatura (ver anexos). Para realizar el corte se utilizó la enzima de restricción *BanII* la cual reconoce el alelo variante (G) en la secuencia GRG^CY^C. Para la reacción de restricción se utilizó 1 µg del producto amplificado de la PCR, buffer de corte, la enzima y agua grado BM, y se incubó esta mezcla por 1 hora a 37°C, los fragmentos obtenidos fueron analizados en geles de agarosa al 2% (ver anexos).

4.3.6 Asociación del fenotipo con las alteraciones genómicas

Una vez obtenidos los resultados del escaneo genómico y la validación de las alteraciones genómicas, se realizó un análisis individual de cada caso con el apoyo de bases de datos como DGV (Database of Genomic Variants) la cual proporciona un resumen exhaustivo de la variación estructural en el genoma humano (individuos sanos), la base de datos DECIPHER (Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources) que incorpora un conjunto de herramientas diseñadas para ayudar a la interpretación de desequilibrios cromosómicos submicroscópicos, mejora el diagnóstico clínico mediante la recuperación de información de una variedad de recursos de bioinformática relevantes para el desequilibrio encontrado en el paciente, muestran los cambios de número de copias comunes en poblaciones sanas y se resaltan los genes de importancia clínica reconocida, la base de datos OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) que proporciona información acerca de genes humanos y desordenes genéticos, y la base de datos UCSC Genome Browser, la cual ofrece la información integrada en gráficos de las bases de datos antes mencionadas. También se utilizó el programa STRING 9.0 con el cual se pueden establecer vías funcionales de interacción *in silico* de los genes involucrados en las pérdidas/ganancias/interrupciones. La red asume una similitud funcional entre proteínas conectadas así como asociaciones de interacción proteica (ej., unión, activación, inhibición o co-expresión). Al mismo tiempo se llevó a cabo la búsqueda de evidencia basada en revisión con el propósito de destacar la importancia clínica de las CNV encontrados. La evidencia basada en la revisión, es un sistema de clasificación que

enumera las pruebas para apoyar o refutar la sensibilidad a dosis para los genes individuales y regiones.

4.3.6 Consideraciones éticas

La participación de todos los individuos en el proyecto fue respaldada con la firma de un consentimiento informado por escrito (anexo1). Los investigadores responsables del proyecto les dieron por escrito los resultados de los estudios moleculares a los médicos genetistas responsables de cada paciente para que los anexen en el expediente clínico. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con las normas de conducta éticas para el Instituto Mexicano del Seguro Social, el Reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud y con la declaración de Helsinki y sus enmiendas, así como los códigos y normas vigentes para las buenas prácticas de la investigación clínica. Los padres/tutores de cada paciente fueron informados de los objetivos y metas del mismo por parte de los genetistas y responsables del proyecto. Los colaboradores aseguraron que la participación de los individuos fuese en forma libre y no discriminatoria. Las muestras y los datos generados por la participación de cada individuo serán almacenados y manejados confidencialmente. Previo a la firma de consentimiento informado, se les pidió autorización a los padres/tutores para que se almacene el material genético de su hijo(a) para investigaciones futuras (ver carta de consentimiento informado en la sección de anexos).

CAPÍTULO 5

RESULTADOS

5.1. Captación de pacientes

Se lograron captar 6 pacientes con MM y RD/DI de etiología desconocida, 4 de los pacientes cuentan con un cariotipo normal y 2 con alteración en cariotipo. Se contó con muestras de los padres para 3 de los casos (caso#1, #3 (dos hermanas) y #5), el número total de muestras fue de 12. Nota: se manejan como 5 casos por corresponder el caso # 3 a dos hermanas, aunque son 6 pacientes en total.

A todos los pacientes así como a sus padres se les realizó un escaneo genómico a través de microarreglos genómicos de alta y mediana densidad, para lo cual se utilizaron 3 diferentes plataformas.

5.2 Descripción de casos

Caso #1

Masculino 4 años de edad, segunda gesta de padres no consanguíneos y aparentemente sanos, el cual presenta dismorfias faciales, hirsutismo dorsal, escoliosis moderada y postura erecta anormal, fístula traqueo-esofágica, linfopenia y neumonías frecuentes, déficit del lenguaje y ligero retraso psicomotor. El paciente presentó un cariotipo normal.

Caso#2

Masculino de 7 años de edad, estudiado desde el primer año de vida por RD grave y ACM. Puesto que es adoptado, se desconocen antecedentes familiares. Acude a primera

cita con habitus progeroide, talla baja y marcado retraso en el desarrollo. A la exploración física se aprecian peso, talla y perímetro cefálico en percentiles menores a 3, facies progeroide, escaso cabello, el presente, rizado. Manos con braquidactilia y pliegues redundantes, con ligera hiper-elasticidad. Sus radiografías con marcado retraso en edad ósea, metáfisis ensanchadas y epífisis pequeñas o ausentes. Se consideró el diagnóstico inicial de síndrome Hallerman Streiff. Se rehabilita desde entonces con mejoría relevante en el área motora y fina. No convulsiona desde hace dos años. Presentó cariotipo normal.

Caso#3

P1: Paciente de sexo femenino y 22 años de edad ,la cual presenta retraso psicomotor, discapacidad intelectual grave, problema cardiaco que remitió espontáneamente, anquiloglosia, prognatismo, dismorfias faciales, hipertrichosis, talla baja ,retraso en la edad ósea, retraso en el desarrollo sexual secundario, así como marcado déficit del lenguaje y problemas para socializar.

P2: Paciente de sexo femenino y 12 años de edad, hermana de P1. La cual presenta rasgos similares a P1. Ambas cariotipo Normal.

Caso#4

Paciente masculino de 22 años de edad, el cual presento defecto cardiaco remitido, hipospadias glandular y criptorquidia derecha, ligero retraso psicomotor, miopía, hábitus grácil, nariz prominente, fosetas coccígeas y múltiples cicatrices postquirúrgicas. El paciente presentó un CI de 95. Otro rasgo fenotípico que llama la atención es su claro perfil homosexual. El cariotipo de este paciente fue 46,XY, del(3)(p26).

Caso#5

La paciente, una niña de 1 año de edad, fue el segundo hijo de padres sanos no consanguíneos. En el tercer trimestre del embarazo se detectó retraso en el crecimiento fetal, fémur corto y calcificación de la placenta. Nació por cesárea a las 35 semanas de gestación debido riesgo fetal incrementado. El peso al nacer fue de 2.300 g (<percentil 3), la talla fue de 43 cm (<tercera percentil) y la única puntuación de Apgar referida fue 8. Se detecto glaucoma congénito bilateral y fue tratado por trabeculectomía en dos intervenciones diferentes. La paciente todavía permanece con la presión intraocular elevada. La resonancia magnética cerebral reveló un aumento del espacio subaracnoideo, el proceso de mielinización alterado y edema del nervio óptico bilateral. A la edad de siete meses, su peso fue de 4.300 g y la talla fue de 57,3 cm (<percentil 3). Mostró ojos grandes, escleras azules, fontanelas amplias, cejas prominentes, orejas de implantación baja , fisuras palpebrales oblicuas ascendentes, aparente telecanto, punta de la nariz bulbosa, aparente aumento de la distancia entre la base nasal y labio superior, paladar blando hendido, micrognatia, pliegue palmar único bilateral y clinodactilia bilateral de quinto dedo (Fig. 13). Además, presentó foramen oval y persistencia del conducto arterioso. A los 12 meses, aún no controlaba su cabeza. Su reacción a los estímulos auditivos es pobre, pero sigue a estímulos luminosos. Actualmente, ella ha estado sufriendo infecciones respiratorias recurrentes. Su cariotipo fue reportado como 46,XX, del(7)(q22q22).

5.3 Obtención de ideogramas

Se obtuvieron los ideogramas tanto de los pacientes como de sus padres, en los cuales se señala con azul las ganancias de material genético y en rojo las pérdidas.

CASO#1

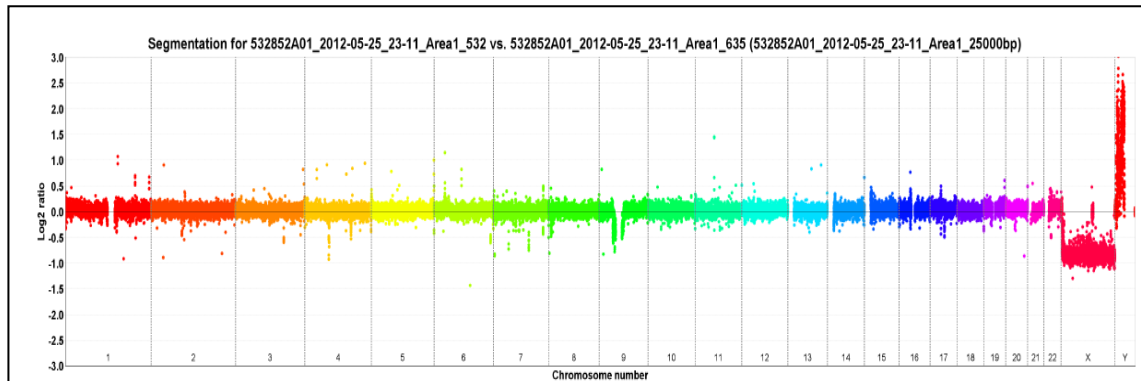


Figura 3. Gráfica de segmentación log2 del caso # 1 vs Control femenino. Plataforma de microarreglos NimbleGen. .

CASO#2

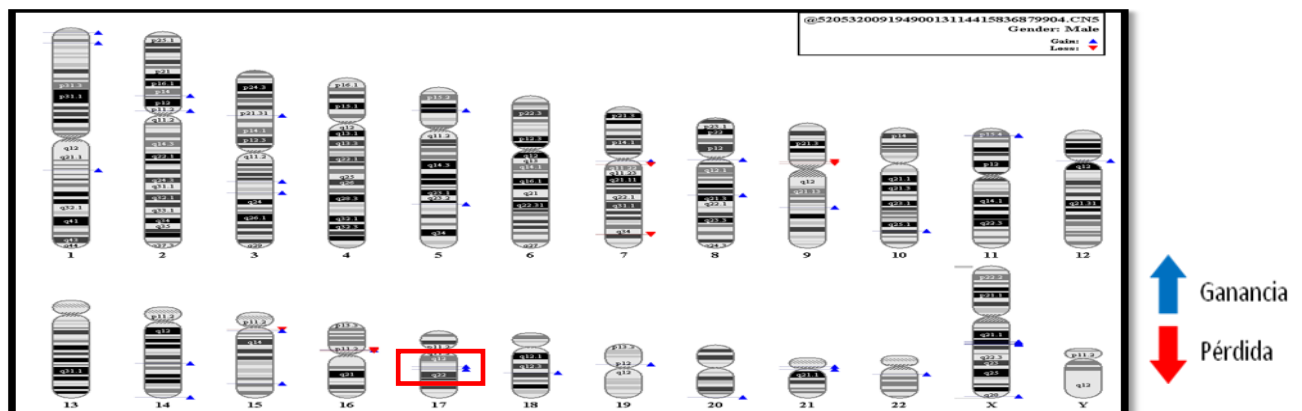


Figura 4. Ideograma del caso# 2 a partir de la plataforma Affymetrix. El recuadro rojo indica un CNV de SCI identificado en el paciente. Los padres no estuvieron disponibles para el análisis.

CASO #3

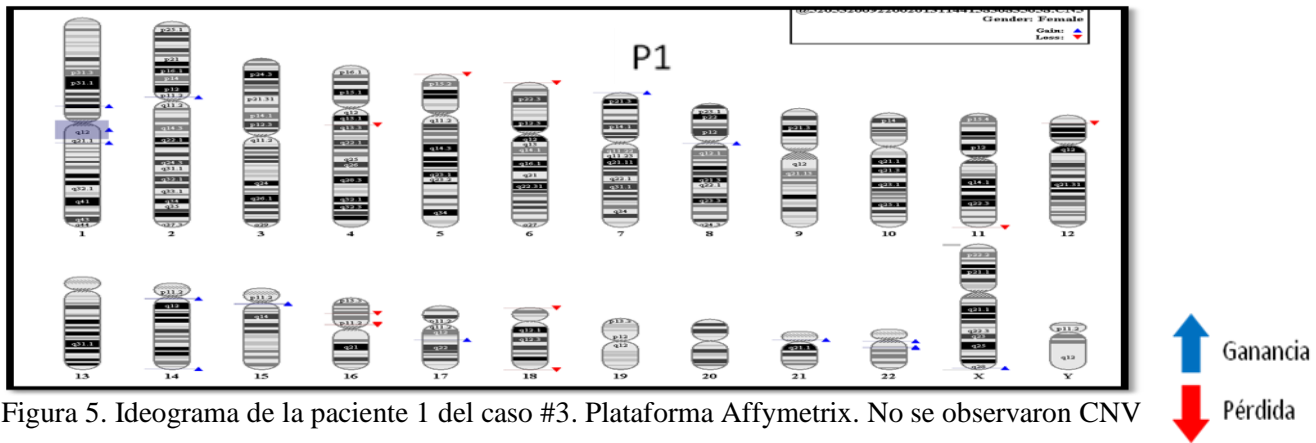


Figura 5. Ideograma de la paciente 1 del caso #3. Plataforma Affymetrix. No se observaron CNV de significancia clínica. El resultado en los padres fue normal.

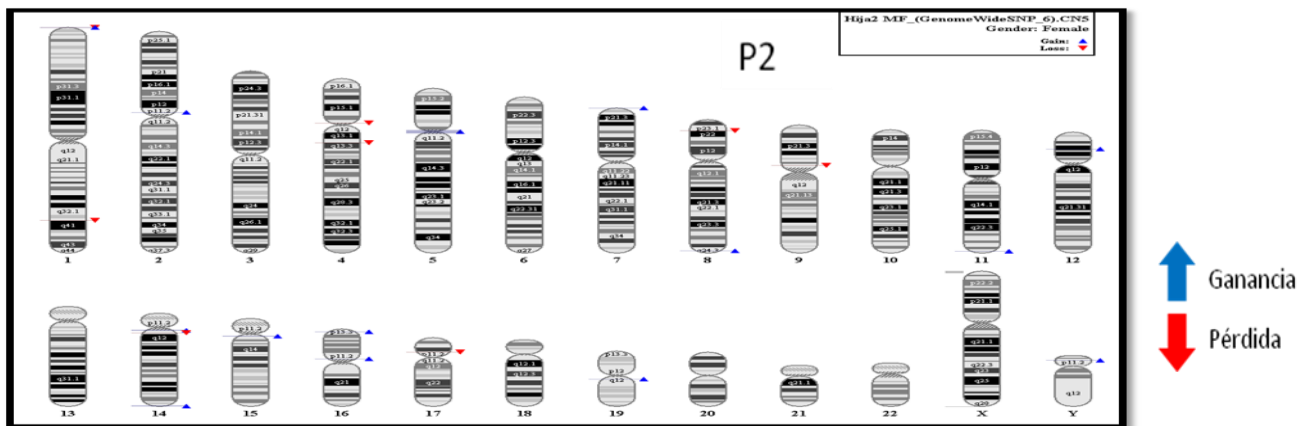


Figura 6. Ideograma de la paciente 2 del caso #3. Plataforma Affymetrix. No se observaron CNV de significancia clínica. El resultado en los padres fue normal.

CASO#4

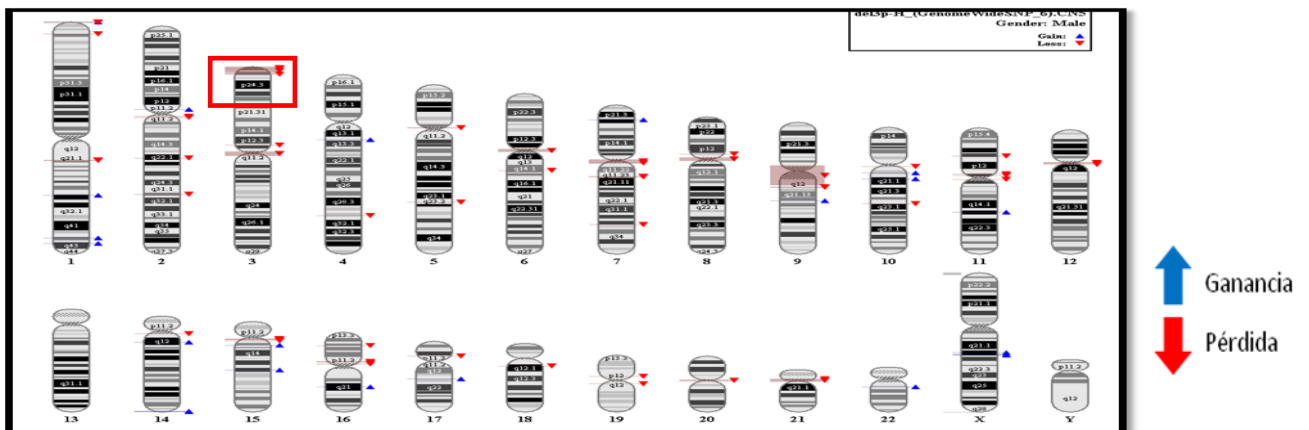


Figura 7. Ideograma del caso#4. Plataforma Affymetrix. El recuadro rojo indica la deleción identificada en el paciente.

CASO #5



Figura 8. Ideograma de la paciente del caso#5. Plataforma Agilent. El rectángulo rojo indica una deleción identificada en la paciente. El análisis de los padres fue normal.

5.4 Identificación de CNV

Se identificaron las CNV de los pacientes, así como de sus padres y se clasificaron en tres categorías de acuerdo a las recomendaciones del ISCA en benignos, patogénicos y de SCI. Al mismo tiempo se construyó una base de datos de CNV naturales en 20 individuos sanos, la cual es de utilidad como base de datos interna para el análisis de datos.

Tabla 3. Resultados de identificación de CNV en los pacientes

Caso	Total CNV	CNV aparentemente benignos	CNV SCI	CNV Patogénicos	Genes (Posición genómica)
#1	48	Duplicaciones: 32 Deleciones: 16	0	0	-----
#2	39	Duplicaciones: 31 Deleciones: 8	0	0	-----
#3-P1	22	Duplicaciones :15 Deleciones : 7	0	0	-----
#3-P2	20	Duplicaciones: 13 Deleciones: 7	0	0	-----
#4	65	Duplicaciones :15 Deleciones : 49	0	1	Chr3:35,333-8,122,718
#5	22	Duplicaciones 18 Deleciones : 3	0	1	Chr7:96,742,140-109,246,085

5.5 Identificación de alteraciones genómicas

Tabla 4. Alteraciones genómicas encontradas en los pacientes.

Caso	Alteración genómica	Origen
#1	No detectada	-
#2	Duplicación de SCI en 17q21.33(44,914,459-45,027,944) Incluye 2 genes Tamaño:113 kb	-
#3	CN-LOH- Chr 19 P1: 9.83 Mb ,236 genes P2:10.23Mb, 258 genes	De novo
#4	Deleción en 3p26 (35,333-8,122,718) Incluye 15 genes Tamaño: 8.1 Mb	De novo
#5	Deleción en 7q21.3q31.1(96,742,140-109,246,085) Incluye 229 genes Tamaño: 12.5 Mb	De novo

Caso#1

En el paciente del caso#1 no se observaron alteraciones clínicamente significativas.

Caso#2

Por medio del análisis del número de copias se identificó una duplicación de tamaño 113 kb de SCI en el paciente del caso#2, la cual incluyó los genes *NGFR* y *NXP3*. Esta variante traslapa en ~70% con la variante 5016 de DGV. No se encontraron variantes conocidas para el gen *NXP3* en sujetos (datos DGV). Sin embargo se encontraron 2 casos reportados en DECIPHER e ISCA, las cuales traslapan con la región duplicada en el paciente y coinciden en 2 rasgos clínicos con estos casos. Sin embargo debido a que no se pudo realizar el análisis a los padres, este CNV se clasificó como de SCI.

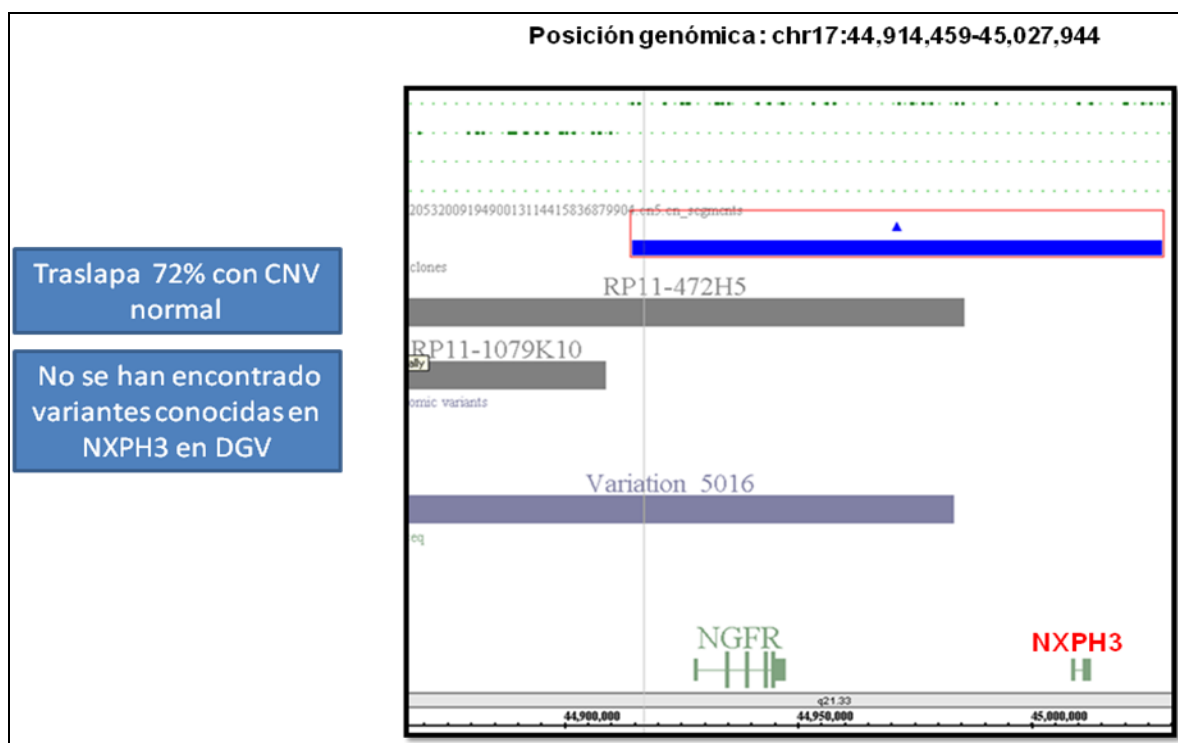


Figura 9. CNV de SCI identificado en el paciente del caso#2. En esta figura se observa que la duplicación identificada en el paciente traslapa un 72% con un CNV benigno (variante 5016).

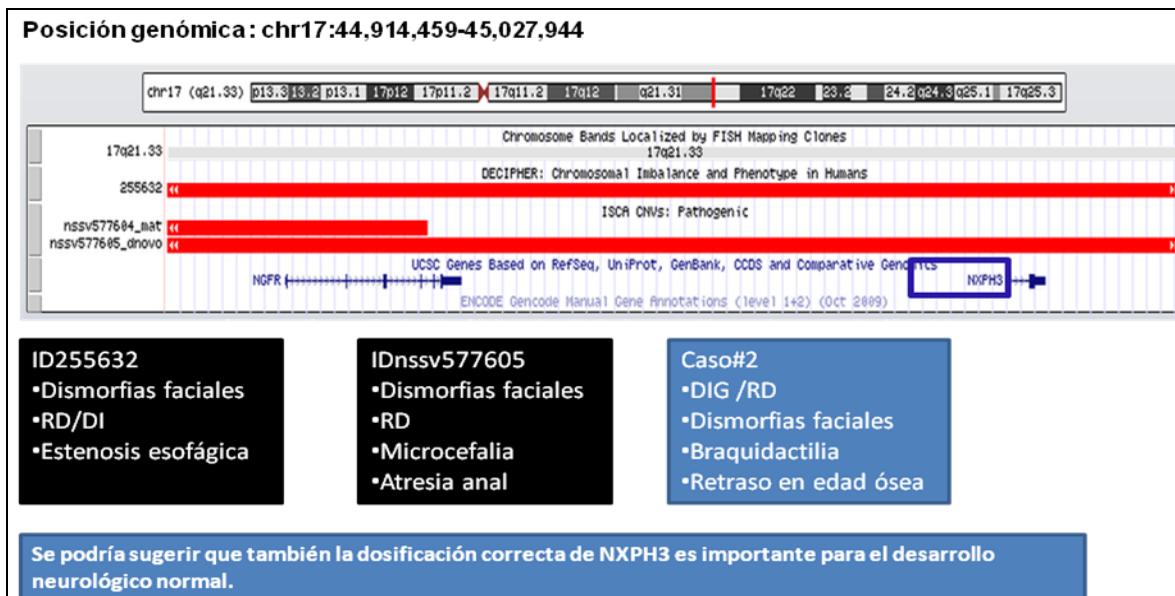


Figura 10. Casos reportados en la posición genómica de la duplicación identificada en el paciente del caso#2. Las líneas rojas indican deleciones reportadas en las bases de datos DECIPHER (ID255632) e ISCA (IDnssv577605), las cuales fueron consideradas como patogénicas, estas traslapan con la región de la duplicación identificada en el paciente.

Caso#3

En las pacientes del caso#3 no se encontraron alteraciones en el número de copias clínicamente significativas; sin embargo, se identificó un región de CN-LOH de ~10 Mb en ambas pacientes. La posición genómica de CN-LOH para la paciente 1 es: chr19:36, 713,905-46, 545,925, en esta región se encuentran 243 genes. La posición genómica de la paciente 2 es: chr19:36, 715,020-46, 952,402, la cual contiene 257 genes (Ver anexos). En ambos casos se utilizó el constructo NCBI 36/hg18.

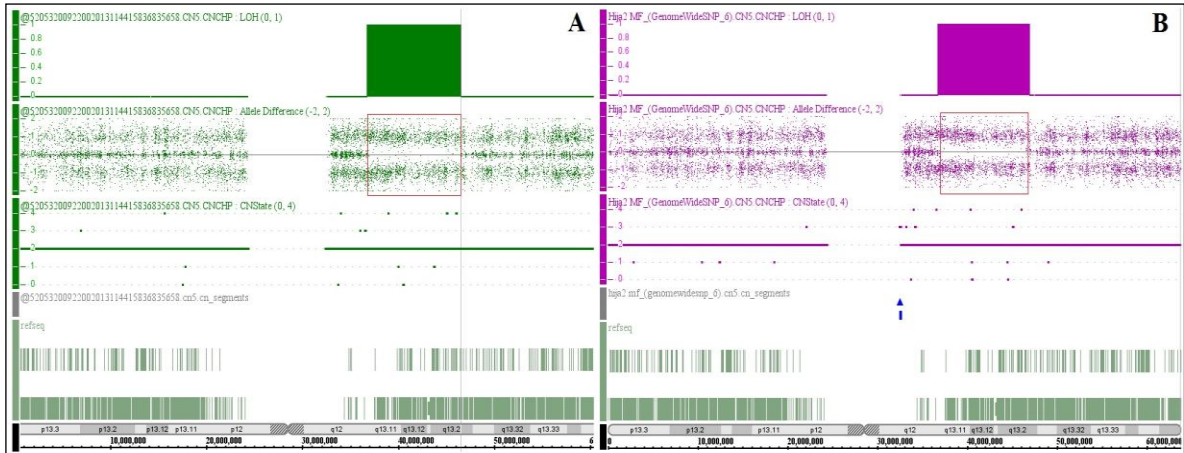


Figura 11. Gráficos de CN- LOH de las pacientes del caso#3. Plataforma Affymetrix. En este gráfico se observa la regiones de LOH identificadas en las pacientes del caso#3 (A: Paciente1, B: Paciente 2). Los bloques en verde y en fucsia indican la LOH en ambas pacientes. Plotting de sondas (en medio) para SNP indican la diferencia alélica determinada por genotipificación; los recuadros rojos en ambos segmentos indican una clara LOH. En la parte inferior, las barras horizontales en verde y fucsia indican el número de copias (2) para el cromosoma 19; no se observan deleciones equivalentes a las regiones de LOH. El análisis de los padres fue normal.

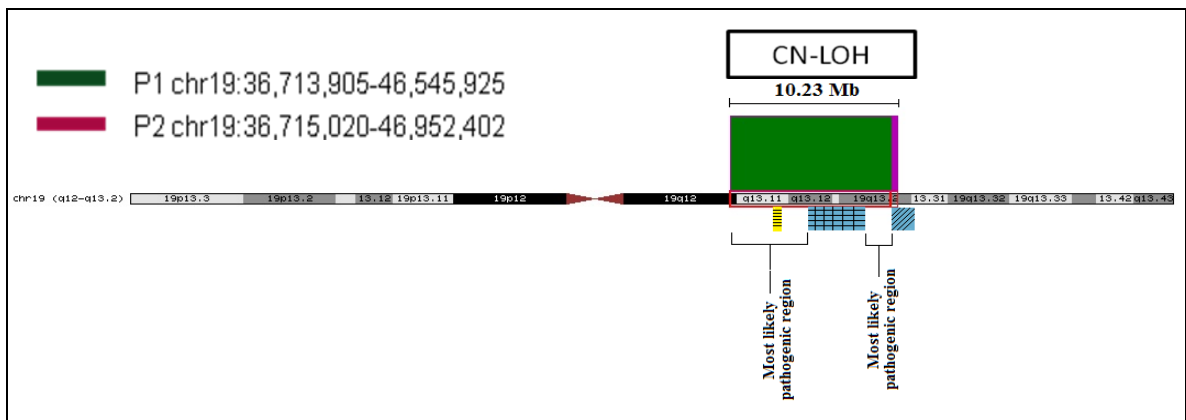


Figura 12. Representación (no a escala) del traslape de LOH ambas en las pacientes. En verde, la paciente 1 y en fucsia la paciente 2. En azul, se encuentran las regiones de LOH reportadas

hasta ahora en esa región en sujetos sanos, las cuales se podrían considerar como no patogénicas. En amarillo se encuentra la región crítica del síndrome de microdelección 19q13. Las regiones restantes señaladas son las regiones candidatas para contener el o los genes asociados al fenotipo de ambas pacientes.

Análisis de LOH

	P2	P	M				
AA	NoCall	NoCall	rs484001	19	37422222	C	T
BB	BB	BB	rs510757	19	37422302	C	T
BB	BB	BB	rs547483	19	37441365	C	T
NoCall	NoCall	NoCall	rs826305	19	37443625	G	T
NoCall	AB	AB	rs826306	19	37445258	A	T
BB	BB	BB	rs528504	19	37447348	A	G
AA	AA	AA	rs569371	19	37453997	A	G
BB	AB	AB	rs7251087	19	37455903	C	T
BB	AB	AB	rs523979	19	37456405	A	C
AA	AA	AA	rs472226	19	37458713	A	C
BB	AB	AB	rs17707101	19	37461850	G	T
AA	AB	AB	rs1375476	19	37465175	A	G
AA	AB	AB	rs17639910	19	37467129	C	T
AA	NoCall	NoCall	rs1667337	19	37467512	C	T
AA	AB	AB	rs1623097	19	37473242	A	G
AA	AB	AB	rs1644666	19	37475486	C	T
AA	NoCall	NoCall	rs1612652	19	37477640	A	G
BB	AB	AB	rs1667351	19	37478027	A	T
AA	AB	AB	rs1644673	19	37478711	A	G
AA	AB	AB	rs1667353	19	37481153	C	T
AA	AB	AB	rs1667354	19	37482151	C	T
BB	BB	BB	rs8106386	19	37503899	C	T
BB	BB	BB	rs703536	19	37507234	A	G
AA	AA	AA	rs2562587	19	37510259	C	T
BB	BB	BB	rs8108214	19	37516086	C	T
BB	BB	BB	rs2562599	19	37516374	A	C
BB	BB	BB	rs10414107	19	37522193	A	G
AA	AA	AA	rs7248948	19	37547219	G	T
AA	AA	AA	rs10408199	19	37547659	C	G
AA	AA	AA	rs12327654	19	37556673	A	C
BB	AB	AB	rs1234288	19	37561087	A	T
BB	BB	BB	rs7245882	19	37580415	A	G
AA	AA	AA	rs8102196	19	37582204	A	G
AA	AA	AA	rs2385374	19	37583017	C	G
BB	BB	BB	rs1770744E	19	37583042	C	G
BB	BB	BB	rs4806407	19	37588751	A	G
BB	BB	BB	rs6510588	19	37597395	G	T
AA	AA	AA	rs7258360	19	37605917	C	T
BB	NoCall	NoCall	rs1246079E	19	37617436	G	T
AA	AA	AA	rs1246227E	19	37617456	C	T
AA	AA	AA	rs1402468	19	37620248	A	T
BB	NoCall	NoCall	rs1298445E	19	37629091	A	G

Pérdida de heterocigidad

Alelos no informativos

Figura 13. Análisis de LOH en las pacientes del caso#3; segmento de Excel que muestra los genotipos analizados en la región de LOH. La flecha azul indica regiones de LOH real, la flecha roja indica una región con alelos no informativos debido a que tanto P2 como sus padres presentan el mismo genotipo.

Se delinearón las alteraciones previamente encontradas con cariotipo para los pacientes del caso#4 y caso#5.

Caso#4

En el paciente de caso#4 se delineó una alteración previamente reportada como 46,XY, del(3)(p26)dn, sin embargo, con el estudio de aCGH fue posible delinear/delimitar la posición genómica de la deleción 3p26.1-26.3 (chr3:35,333-8, 122,718, NCBI36/hg18), así como determinar su tamaño, el cual fue de 8.1 Mb e incluyó 15 genes: *CHL1*, *CNTN6*, *CNTN4*, *IL5RA*, *TRNT1*, *CRBN*, *SUMF1*, *LRRN1*, *SETMAR*, *ITPR1*, *EGOT*, *BHLHE40*, *ARL8B*, *EDEMI* y *GRM7*. Esta deleción no incluyó el gen *SRGAP3* candidato para el fenotipo de DI.

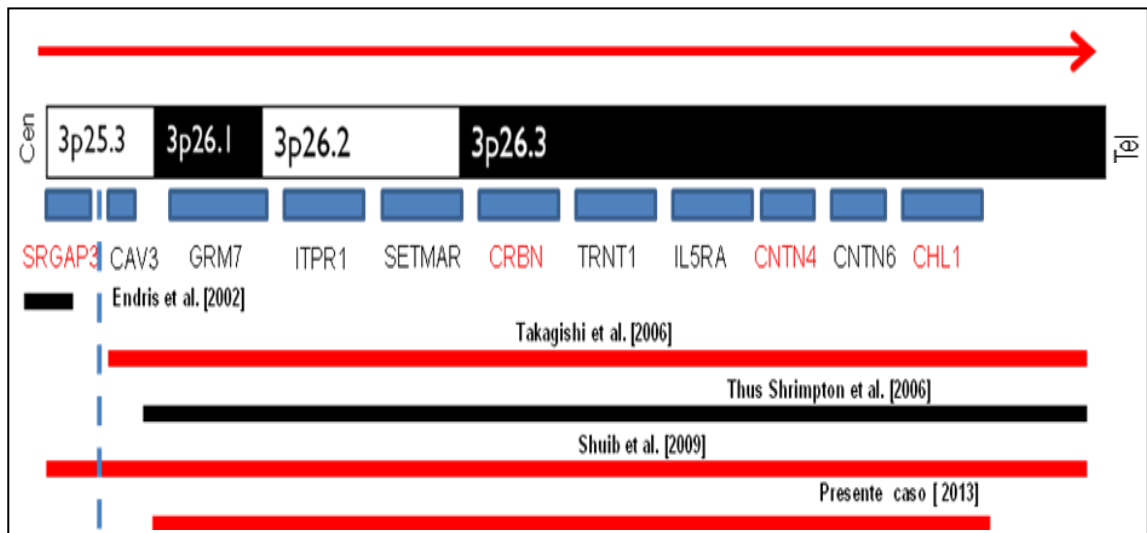


Figura 14. Esquema de la deleción en 3p26.1-p26.3 del caso#4. Las líneas rojas indican deleciones y las líneas negras translocaciones. La línea punteada indica el punto de ruptura en el que se excluye al gen *SRGAP3* potencialmente asociado a DI en pacientes con deleción en 3p. Takagishi et al. (2006), Thus Shrimpton et al. (2006) y el presente caso reportan pacientes sin DI.

Caso#5

La paciente de este caso fue previamente reportada como 46,XX,del (7)(q22q22)dn; una vez que se realizó el aCGH el resultado fue 46,XX,arr 7q21.3q31.1(96,742,140-109,246,085)x1 dn. El análisis de microarreglos reveló una región deletada de 12,5 Mb, aproximadamente 88kb corriente abajo de la región crítica para ectrodactilia. En la región deletada se identificaron 229 genes incluyendo mirnas y proteínas hipotéticas.

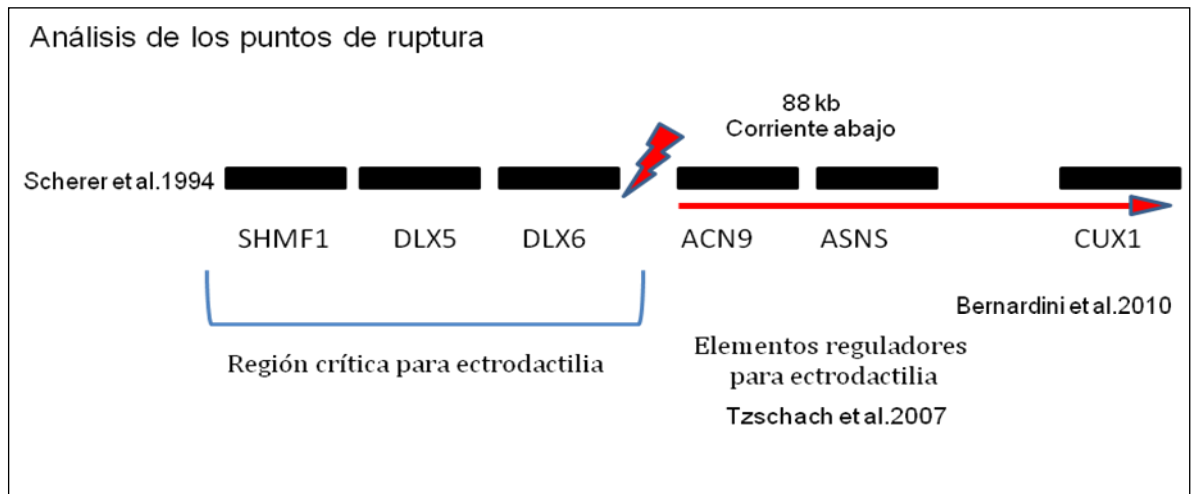


Figura 15. Análisis de los puntos de ruptura de la paciente del caso#5. Uno de los puntos de ruptura de la deleción identificada en la paciente del caso#5, se ubica a tan solo 88 kb corriente debajo de la región crítica para ectrodactilia e incluye genes asociados a este fenotipo.

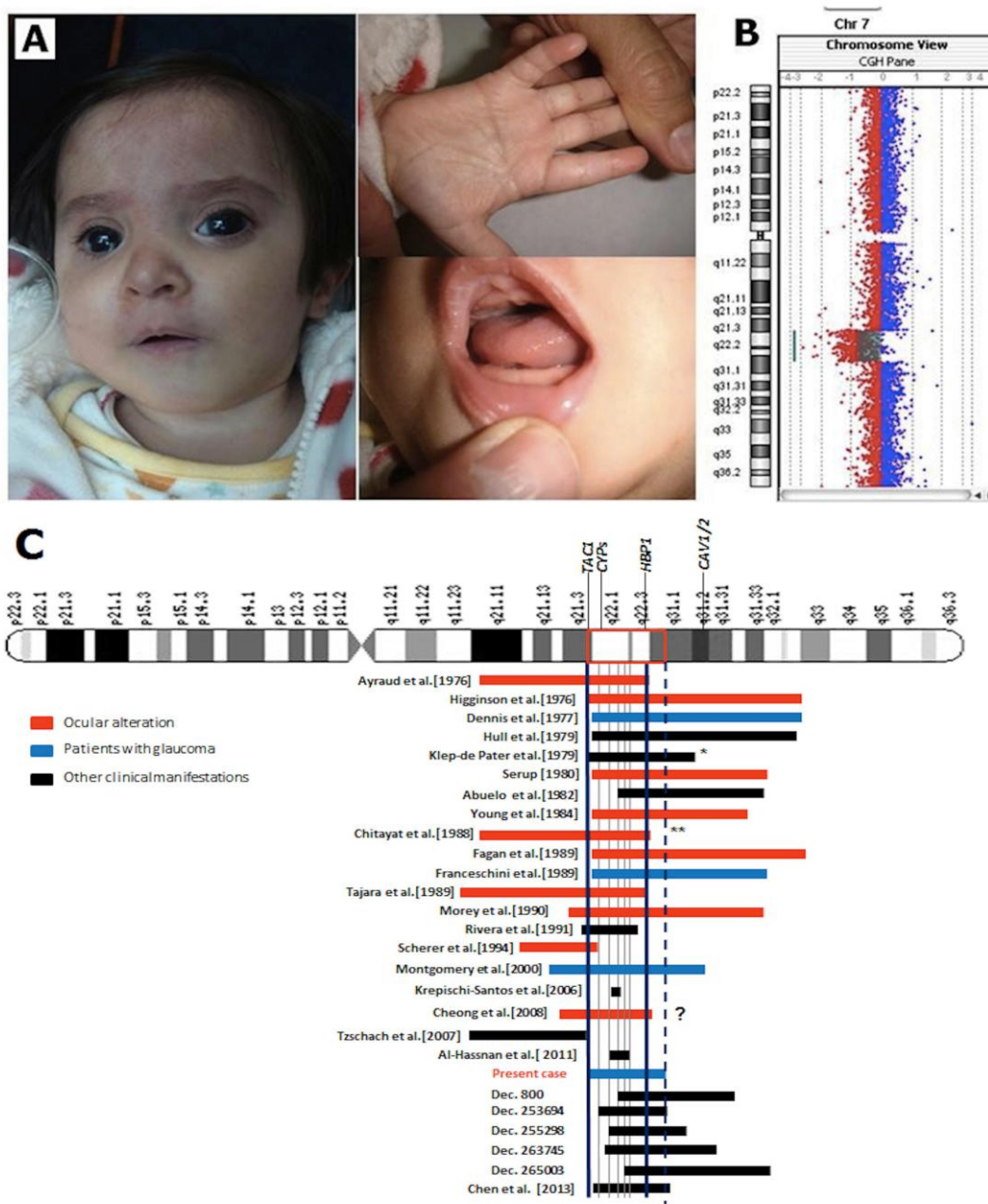


Figura 16. Caso#5. (A) Características craneofaciales, de la mano y la boca de la paciente. (B) análisis del perfil de pérdida indicada por la relación log₂ (trazado y línea) en la visualización del software Agilent CytoGenomics v.2.5. (C) Diagrama (no a escala) que caracteriza los casos con o sin una anomalía ocular y portadores de una deleción 7q que traslapa con 7q21.3q31.1.

Tabla 5. Genes deletados en 7q21.3q31.1 potencialmente relacionados a algunas características clínicas frecuentemente observadas en otros casos con deleciones similares

Relacionado a	Gen/proteína	Referencias
Cerebro/RD/DI	<i>ACHE, ATXNL7, BHLHA15, COG5, GPC2, MLL5*</i> , <i>NPTX2, NRCAM, PNPLA8, RELN, SRPK2, SYPL1, TAC1, THAP5, TMEM130, VGF, NYAPI**</i>	UCSC Genome browser; Al-Hassnan et al. [2011]; Rymen et al. [2012]; DECIPHER ID 263273; Vincent et al. [2008]; Uliana et al. [2010]
Alteraciones craneofaciales	<i>MLL5*</i> , <i>PLOD3***</i> , <i>RELN</i>	Al-Hassnan et al. [2011]; Salo et al. [2008]
Sordera /perdida de la audición	<i>GJC3, LHFPL3, MLL5*</i> , <i>PLOD3***</i> , <i>SLC26A4, SLC26A5</i>	UCSC Genome browser; ID 263273; Salo et al. [2008]; Albert et al. [2006]
Alteraciones oculares	<i>CLDN15, CYP3A4, CYP3A43, CYP3A5, CYP3A7, HBP1, NRCAM, TAC1, TMEM130</i>	EMBL-EBI; Volotinen et al. [2011]; Lee et al. [2012]; Demyanenko et al. [2011]; Kennedy et al. [2012]
Corazón/defectos cardíacos	<i>MOSPD3, NPTX2, PNPLA8, SRPK2, THAP5</i>	UCSC Genome browser; Pall et al. [2004]
Alteraciones gastrointestinales/retraso en el crecimiento/corta estatura	<i>CLDN15, MUC3A, MUCB, MUC17, MOGAT3</i>	UCSC Genome browser; Wada et al. [2012]

Estas asociaciones se realizaron de acuerdo a las funciones y ubicaciones de expresión de los genes. Tenga en cuenta que algunos genes pueden estar relacionados con más de una característica clínica. De hecho, algunas lesiones monogénicas parecen ser responsables de diversas características clínicas (por ejemplo *MLL5** o *PLOD3****). **Deletado en un caso de microdelección en ISCA (ID nssv578204).

Table 6. Características clínicas de casos de delección reportados en 7q21q32 pero con un aparente traslape mayor en la región 7q21.3q31.1.

Características clínicas	Casos/referencias																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15*	16	17	presente caso
Generales																		
Bajo peso al nacer	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
DI/RD	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Retraso en el crecimiento /corta estatura	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+
Retraso del habla	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?	+
Hipotonía	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
EEG anormal/convulsiones	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Infecciones recurrentes	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Cabeza/periorbital																		
Frente amplia/prominente	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Microcefalia	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-
Inclinada hacia arriba	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
Pliegue epicanto	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
Cejas prominentes	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Hipertelorismo/telecanto	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	A
Oídos/audición																		
Implantación baja	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+
Malformaciones	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
Sordera/perdida de audición	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	A
Nariz																		
Puente nasal amplio/plano	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Punta bulbosa	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
Anomalías oculares																		
	+	+	G	-	-	+	-	+	+	+	G	+	+	G	?	-	-	G
Boca																		
Grande	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Labio superior delgado	-	-	-	+	-	-	-	+	-	?	?	-	?	-	-	-	-	+
Filtrum largo	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	A
Paladar estrecho/alto/hendido	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+
Micrognatia	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+
Problemas de alimentación	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	leve ^c
Cuello																		
Corto	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Extremidades/manos																		
Clinodactilia del quinto dedo	-	+	-	-	-	-	leve	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Splithand/splitfoot	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
Pliegue palmar anormal	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
Cardiovascular																		
DSA/DSV	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
PCA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Estenosis pulmonar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
Otros	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+ ^e
Gastrointestinal																		
Hernia	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Urogenital																		
Anomalías genitales	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-

¹ Ayraud et al. [1976]; ² Higginson et al. [1976]; ³ Dennis et al. [1977]; ⁴ Hull et al. [1979]; ⁵ Klep-de Pater et al. [1979]; ⁶ Serup [1980]; ⁷

Abuelo and Padre-Mendoza [1982]; ⁸ Young et al. [1984]; ⁹ Chitayat et al. [1988]; ¹⁰ Fagan et al. [1989]; ¹¹ Franceschini et al. [1978]; ¹² Tajara et al. [1989]; ¹³ Morey and Higgins [1990]; ¹⁴ Montgomery et al. [2000]; ¹⁵ Cheong et al. [2008]; ¹⁶ ID 253694; ¹⁷ ID 255298. ND = no disponible; G = glaucoma; ? = desconocido/impreciso; A= aparentemente. * Feto de 22 semanas y no disponible para evaluaciones adicionales.^a Sugerido por nosotros (muerte prematura).^b Sugerido por los autores (muerte prematura).^c Inicialmente succión pobre.^d Este paciente presentó polidactilia pre-axial en las manos.

Después de esta revisión, una deleción muy similar a nuestro caso fue descrita en un feto de 24 semanas, el feto que presentó labio y paladar hendido, hipertelorismo, puente nasal ancho, micrognatia, orejas de implantación baja, micropene y criptorquidia [Chen et al., 2013] . A partir de esta tabla, las características presentadas en > 30% de los casos son: DI / RD (~ 18/18), anomalías oculares (12/18), bajo peso al nacer (10/18), malformaciones del oído (10/18), defectos cardiacos (9/18), boca grande (9/18), problemas de alimentación (9/18), orejas de implantación baja (8/18), retraso del crecimiento / estatura baja (8/18), hipotonía (6/18) , microcefalia (6/18), micrognatia (6/18), pliegues palmares anormales (6/18), y anomalías genitales (6/18). La característica 'llanto débil "o" grito inusual "no fue incluida en el presente cuadro, pero estaba presente en ~ 5 pacientes, incluyendo la actual.

5.6 Validación de las alteraciones encontradas

La duplicación de SCI identificada en el paciente del caso #2, fue validada por una segunda plataforma de microarreglos NimbleGen con un chip de 3x720k y para el análisis se utilizó el software SignalMap v1.9 así como la aplicación bioinformática CGHweb.

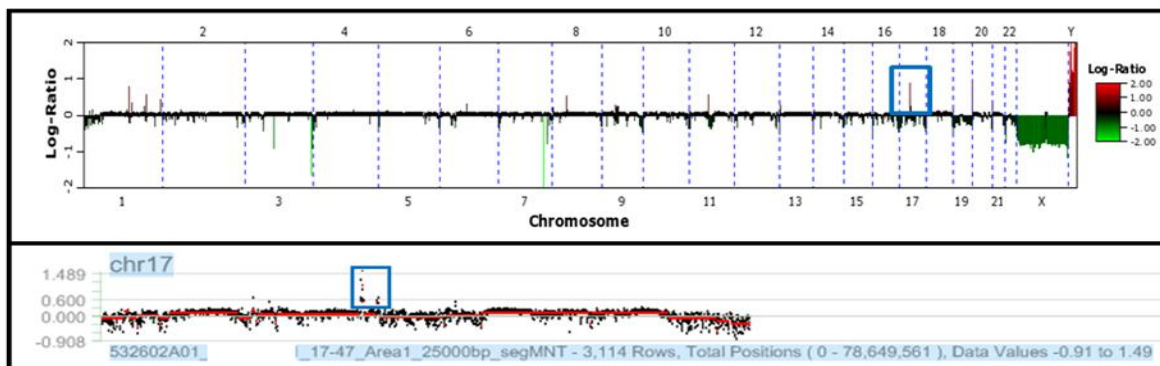


Figura 17. Gráficas de segmentación \log_2 del caso#2. En la parte superior, se muestra el gráfico obtenido a partir de CGHweb. En la parte inferior se observa el gráfico proporcionado por el software SignalMap v1.9. El recuadro azul indica la duplicación en el cromosoma 17

identificada en el paciente del caso#2. Se puede observar que la duplicación de SCI está presente al realizar el análisis con esta plataforma.

5.7 Microarreglos de metilación

Con los microarreglos de metilación se realizó un análisis global del estado de metilación para analizar la región de LOH del cromosoma 19. Se observó un estado de metilación en varios de los genes implicados en la región; sin embargo, aparentemente no hubo diferencias en los patrones de metilación de la paciente y sus padres.



Figura 18. Patrón de metilación de la paciente 1 y sus padres. Se observaron algunas diferencias en los patrones de metilación de la paciente y sus padres.

5.8 Análisis de RFLPs

La temperatura óptima de alineamiento fue 57.5°C de acuerdo al gradiente de temperatura. Se obtuvieron fragmentos de 401 pb como resultado de la PCR para la muestra del paciente como para los controles. No se observó corte con la enzima *BanII*.

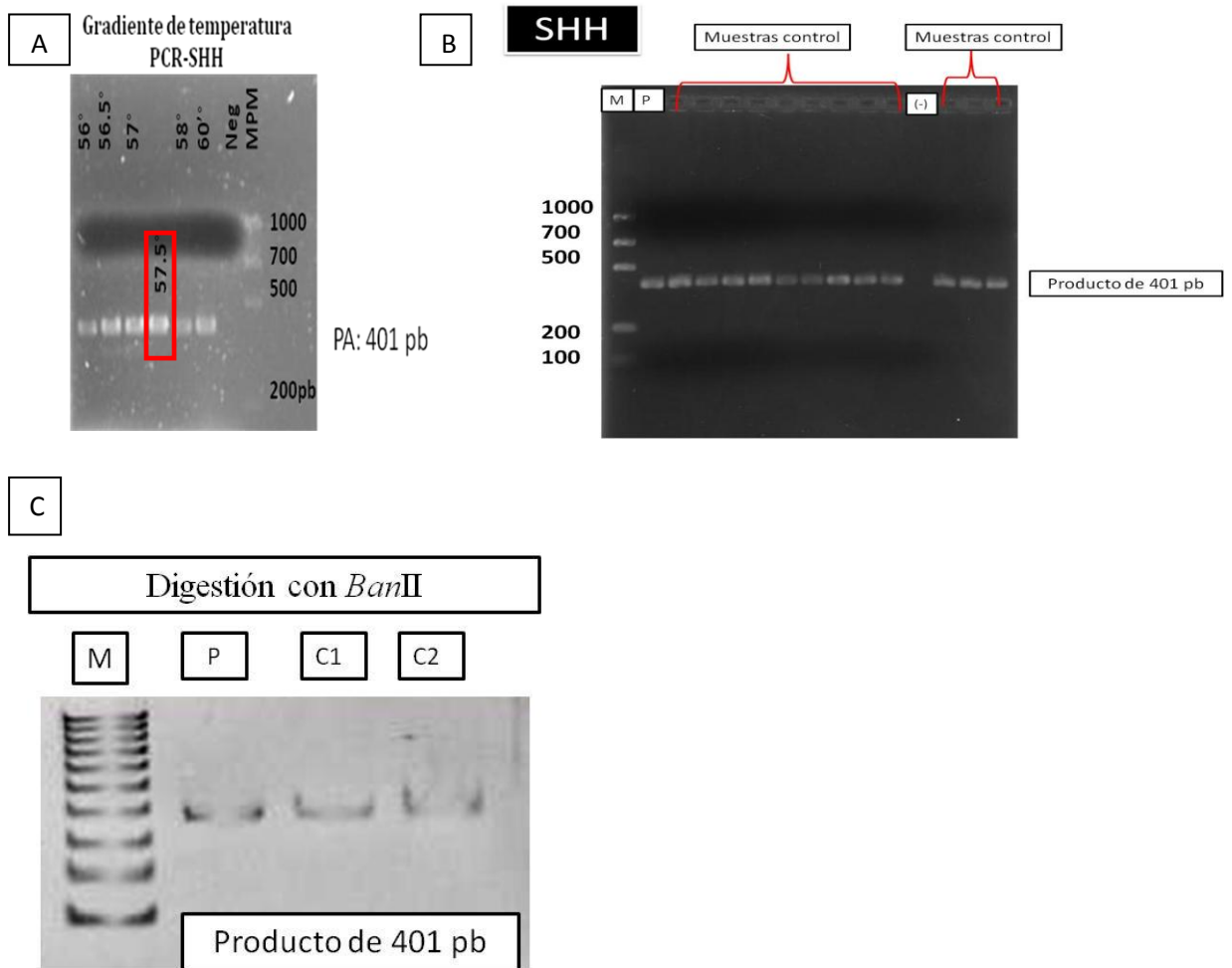


Figura 19. Resultados del análisis de RFLPs. (A) Gradiente de temperatura para PCR de SHH, el cuadro rojo indica la temperatura de alineamiento óptima para esta reacción. (B) Resultados de la PCR en el paciente, muestras control y control negativo, el fragmento esperado fue de 401 pb. (C) Resultados de la digestión con la enzima *BanII*, solo se observan los resultados del paciente y dos controles, los cuales muestran un genotipo A/A.

CAPÍTULO 6

DISCUSIÓN

Desde su implementación, el cariotipo ha sido considerado como un estándar de oro para el diagnóstico genético en pacientes con MM y DI; sin embargo, esta técnica de citogenética clásica cuenta apenas con una resolución de 5 a 10 Mb y un rendimiento diagnóstico cercano al 3%. En la última década, con los avances en la investigación genómica, ha sido posible desarrollar e implementar técnicas citogenómicas más potentes con una mayor resolución y cobertura que puede ir desde 700 pb a 5 Kb. Estas técnicas de alta resolución permiten detectar reordenamientos genómicos submicroscópicos, siendo esto crucial para el descubrimiento de nuevos síndromes de microdelección y microduplicación. Más aún, las variantes en el número de copias juegan un papel muy importante en la llamada era postgenómica (Shaffer et al., 2007).

6.1 Identificación de CNV

La secuenciación del genoma humano permitió el descubrimiento de CNV de secuencias génicas/genómicas. De hecho, una vez finalizado el primer borrador del genoma humano, se encontró que alrededor del 5% de nuestro código genético constaba de segmentos redundantes en diferentes lugares de todo el genoma, los cuales se denominaron duplicaciones segmentarias (Bailey et al., 2002). Hoy en día, estas secuencias duplicadas se reconocen como puntos calientes para la formación de CNV y son directa o indirectamente la base para la mayoría de CNV asociados con algunas enfermedades. Estas duplicaciones de segmentos actúan como mediadores en el evento

de recombinación homóloga no alélica, el cual conduce a la formación de microdeleciones y/o microduplicaciones (Kitsiou-Tzeli et al., 2012).

En el análisis realizado aquí, se identificaron un total de 216 CNV en todos los pacientes, de los cuales 214 fueron clasificadas como benignas (99.07%); de estas CNV benignas, 124 fueron duplicaciones (57.94%) y 90 deleciones (42.05%). Los criterios usados para considerar tales CNV como benignas, fueron que ya han sido descritas para otras poblaciones (de acuerdo con la base de datos DGV de Toronto), están presentes en individuos sanos de nuestra base de datos interna (refinada en el presente proyecto) o fueron heredadas de padres aparentemente sanos. Además, en el primer tamizaje se identificaron 6 CNV de SCI, los cuales fueron posteriormente reclasificados como benignos una vez que se observaron también en los padres aparentemente sanos del caso en cuestión (caso#3).

6.2 Caso #1

El paciente del caso #1 quien presentó un cariotipo normal, fue referido por el genetista con sospecha de síndrome de DiGeorge; sin embargo, una vez que se realizó el escaneo genómico con la plataforma de NimbleGen no se encontraron alteraciones en esta región. En el tamizaje inicial se encontró una deleción de ~260 kb aparentemente patogénica, ubicada en 17q21.31 (posición genómica 41,533,854-41,788,311; NCBI36/hg18) que incluyó los genes *KANSL1*, *LOC644246*, *LOC51326*, *LRRC37A*, *ARL17P1* y *ARL17*, frecuentemente deletados en una proporción de casos con síndrome de microdeleción 17q21.31 (Kitsiou-Tzeli et al., 2012). No obstante, a diferencia de la mayoría de las deleciones reportadas en 17q21.31, la deleción identificada aquí no

incluyó a los genes *MAPT* y *STH*. Esta aparente discrepancia nos hizo realizar un análisis más detallado de la región deletada en el paciente. Con base en las frecuentes CNV observadas en sujetos aparentemente normales, se ha definido la mínima región crítica que participa en el síndrome de microdelección 17q21.31; esta región es de aproximadamente 424 kb y abarca al menos seis genes incluyendo a *C17orf69*, el gen del receptor 1 de la hormona liberadora de corticotropina (*CRHRI*), el gen de la proteasa intramembrana 5 (*IMP5*), el gen de la proteína tau asociada a microtúbulos (*MAPT*), el gen *saitohina* (*STH*) y el gen *KANSL1* ó *KIAA1267* (Al., 2012). Aunque cuando la delección en el presente caso abarca parcialmente al gen *KANSL1* el análisis de la base de datos interna identifico que 11 individuos aparentemente sanos (controles), portaban una duplicación que incluye dicho gen total o parcialmente lo que hace sospechar que los controles (Promega, male y female) usados por la plataforma de Nimblegen portan tal duplicación. Así, tal diferencia en el número de copias, en realidad no indicó que el caso #1 tuviese una delección, sino que el genoma utilizado como referencia tenía una copia de más; por lo que este CNV fue reclasificado como benigno en el presente caso. El resto de los CNV fueron clasificados como benignos.

En conclusión, el resultado del escaneo genómico por microarreglos para este paciente fue normal y representa un buen candidato para realizar un análisis genómico más profundo como la secuenciación de su exoma, lo cual proveerá mayor información acerca del origen de su fenotipo.

6.3 Caso #2: CNV de SCI

El caso#2 presentó un cariotipo normal. Una vez que se le realizó el escaneo genómico con la plataforma de Affymetrix se identificaron 38 CNV benignos de los cuales 30 corresponden a duplicaciones y 8 a deleciones. También se logró identificar una interesante duplicación de 113 Kb localizada en 17q21.33; esta duplicación incluyó los genes *NGFR* y *NXPH3* y traslapa en un 72% con un CNV común el cual incluye sólo al gen *NGFR* (ver figura 9). El gen *NXPH3* pertenece a la familia de neurexofilinas de las cuales se conocen *NXPH1*, *NXPH2*, *NXPH3* y *NXPH4*. Estas neurexofilinas son moléculas de señalización que asemejan a neuropéptidos, específicamente *NXPH3* actúa por la unión a alfa-neurexina y posiblemente a otros receptores, es alta y específicamente expresada en cerebro. Beglopoulos et al. (2005) realizaron un estudio con ratones KO para *NXPH3* y encontraron que este gen se expresa en la región cortical y el cerebelo, además demostraron la importancia funcional de este gen, ya que estos ratones mostraron alteraciones funcionales en la coordinación motora y sensorial.

NXPH3 actúa por unión a la neurexina1-alfa (*NRXN1-alfa*); las neurexinas son receptores de superficie celular que se unen a neuroliginas para formar un complejo en las sinapsis del SNC, lo que es requerido para la neurotransmisión eficiente y está implicado en la formación de contactos sinápticos (Reissner et al., 2008). Diferentes alteraciones como CNV y mutaciones puntuales en *NRXN1-alfa* han sido asociadas a esquizofrenia, autismo, DI, retraso psicomotor, hipotonía, convulsiones y dismorfias faciales. Debido a esto los investigadores consideran que la dosificación correcta de *NRXN1-alfa* es importante para el desarrollo neurológico normal.

Una búsqueda en la base de datos DGV, no mostró variantes para el gen *NXP3*. Sin embargo, se encontraron 2 alteraciones que incluyen este gen en la base de datos DECIPHER (ID255632 y IDnssv577605), estas alteraciones corresponden a deleciones y comparten 2 características con el paciente que son la presencia de dismorfias faciales y DI (ver figura 10). Por lo que se podría sugerir que, al igual que con la *NRXNI-alfa*, la dosificación correcta de *NXP3* también es importante para el desarrollo neurológico normal.

Siguiendo los lineamientos del ISCA para la clasificación de las CNV, debido a que la presente duplicación no se ha descrito en individuos sanos, no se ubica en una región asociada a síndrome, es menor de 5 Mb e incluye un gen probablemente ligado al fenotipo y no fue posible realizar el análisis en sus padres biológicos, este CNV se clasificó como de SCI probablemente patogénico. A pesar de que esta alteración fue validada por una segunda plataforma de microarreglos (ver figura 17), sería interesante realizar un análisis genómico más extenso como la secuenciación de exoma, para buscar una posible alteración que sea más consistente con el fenotipo del paciente.

6.4 Caso#3: CN-LOH

Este caso estuvo integrado por dos pacientes hermanas con un fenotipo similar y cariotipo normal, las cuales fueron referidas para este estudio debido a que el cuadro clínico que presentan no parecía corresponder con alguna entidad conocida. Una vez que se realizó el escaneo genómico no se detectaron CNV patogénicos; sin embargo, un análisis más detallado mostró una amplia región de pérdida de heterocigocidad (LOH) (ver figura 11). La LOH es un evento genético en el que se produce una pérdida alélica,

quedando solo uno de los dos alelos disponibles. Este evento puede ser debido a una pérdida alélica resultando en hemicigosidad o ser producido sin pérdida alélica (homocigosidad) así, el primer evento es conocido comúnmente como delección, y el segundo evento como pérdida de heterocigosidad de copia neutral (CN-LOH, por sus siglas en inglés) (Pfeifer et al., 2007). La CN-LOH ha sido clásicamente subdividida en CN-LOH telomérica, cuando la LOH termina a nivel del telómero y en CN-LOH intersticiales, aquellas producidas por dos reordenamientos dentro del mismo brazo cromosómico. La CN-LOH se puede producir por disomía uniparental (UDP) o por autocigosidad. La UDP es la herencia de dos cromosomas o regiones homólogas de un mismo progenitor, mientras que la autocigosidad ocurre cuando un mismo segmento cromosómico es heredado a un descendiente a través de sus padres, quienes a su vez lo heredaron de un ancestro en común. La autocigosidad generalmente se observa en individuos relacionados o en una población con endogamia (Li et al., 2006). De la misma manera que las CNV, las regiones de LOH ocurren de forma natural y polimórfica; así, en la población general también es posible encontrar regiones de LOH polimórfica. Por ello, para llevar a cabo nuestro análisis de LOH, se realizó un análisis en una población control de 20 individuos sanos y a la vez se realizó una búsqueda de alteraciones semejantes en la literatura. Los datos de LOH observados en la población control sana se utilizaron para filtrar los datos de LOH observados en nuestro caso. La región de CN-LOH encontrada en nuestro caso no fue detectada en los controles de la base datos interna (no eran polimórficas). La literatura señala que existen segmentos de CN-LOH en individuos sanos, en estos estudios se encontraron regiones de LOH mayores a 1Mb en los cromosomas 1, 2, 3, 4, 5, 8, 14, 16 y 18; sin embargo, a la fecha

no hay reportes de tramos largos de LOH en el cromosoma 19 (Li et al., 2006). Se cree que los tramos pequeños (1.5 Mb) de CN-LOH son el resultado de autocigocidad, en particular en grupos étnicos endogámicos. Sin embargo, la causa de las grandes regiones de CN-LOH visto en proporciones significativas de controles sanos no relacionados estudiados en varios proyectos no se ha identificado con precisión y el tamaño de las regiones de CN-LOH se espera que se hagan más pequeños con la naturaleza de las poblaciones humanas urbanas. Varios factores pueden influir en la longitud, la abundancia y ubicación de los tramos homocigotos incluyendo la tasa de mutación, estructura poblacional, UPD, la selección natural, recombinación, así como los patrones de desequilibrio de ligamiento (LD) (Gibson et al., 2006). De hecho se ha hipotetizado que una reducción en el proceso de recombinación (tal vez originada por el tamaño pequeño del cromosoma, según nuestra hipótesis) perpetúa los grandes segmentos de CN-LOH (Gibson et al., 2006).

Los algoritmos actuales para la definición de LOH, se basan en la diferencia entre las frecuencias observadas y esperadas de SNPs homocigotos, que debe ser de aproximadamente 1 a 30 SNPs consecutivos probados. Por consiguiente, entre más larga sea una región de LOH, mayor es el número de SNPs homocigotos y con ello la improbabilidad estadística de encontrarse con esta situación por casualidad aumenta. Por lo tanto, cuando una constelación homocigota de llamadas al genotipo se combina con un número diploide de copias, se puede establecer el diagnóstico de CN-LOH (O’Keefe et al., 2010).

La región de CN-LOH identificada en las presentes pacientes son de aproximadamente 9.83 Mb (P1) y 10.23 Mb (P2) y abarca 236 y 258 genes respectivamente. Interesantemente, esta región de LOH traslapa con la región crítica del síndrome de microdelección 19q13. El síndrome de microdelección en 19q13 fue recientemente descrito, presentando hasta el momento 6 casos reportados; este síndrome se caracteriza por defecto cardíaco con remisión espontánea, dismorfias faciales, DI, deficiencia en el crecimiento, microcefalia, dificultades de alimentación, habitus delgado y piel seca. De estas características las pacientes descritas aquí presentaron interesantemente defecto cardíaco que remitió espontáneamente, dismorfias faciales, DI y deficiencia en el crecimiento (ver figura 12).

La pérdida de heterocigosidad es muy importante por sus implicaciones en la enfermedad, estas regiones de CN-LOH son muy importantes ya que pueden exponer o evidenciar mutaciones recesivas o enfermedades asociadas a impronta y puede influenciar las funciones celulares con efectos anormales. Debido a la importancia de la LOH e impronta genómica observada en algunos casos con síndromes como Prader-Willi/Angelman, se llevó a cabo un análisis global de metilación en la P1 y ambos padres, sin embargo, no fue posible realizar el análisis de la P2 debido a que no se contó con cantidad suficiente de muestra para completar el proceso.

Los resultados del análisis de metilación mostraron algunas diferencias en los patrones de metilación de la paciente y sus padres (ver figura 18). Analizando el patrón de metilación de los genes que se ubican en la región crítica del síndrome de microdelección 19q13, se observó que 3 de los 6 genes involucrados se encuentran metilados (región

promotora), estos genes son *WTIP* y los genes *ZNF302* y *ZNF30*, los cuales actúan como factores de transcripción en el desarrollo neuronal y se han asociado a las funciones cognitivas por lo que se han considerado como candidatos para producir el fenotipo del síndrome de microdelección 19q13 (Forzano et al., 2012). Sin embargo, para comprobar que la metilación de estos genes puede estar relacionada con el fenotipo de las pacientes será necesario realizar análisis de metilación con enzimas de restricción para saber si la metilación se lleva a cabo en uno o en los dos alelos, y si está presente en ambas hermanas.

Aunque aún falta revelar el mecanismo que origino la LOH, es probable que se deba a consanguinidad de ambos padres aunado a un mecanismo llamado autocigoidad. Por otra parte, con la información obtenida hasta el momento la CN-LOH puede ser considerada como un nuevo mecanismo para generar el fenotipo de las pacientes.

6.5 Delineación de alteraciones identificadas con cariotipo

Los microarreglos de hibridación genómica comparativa, han resultado ser una herramienta muy valiosa no solo en el diagnóstico de MM y RD/DI con cariotipo normal; por medio de esta tecnología es posible definir los puntos de ruptura de las alteraciones detectadas previamente con cariotipo, lo que nos permite identificar los genes involucrados en dichas alteraciones y realizar una asociación genotipo-fenotipo más precisa.

6.6 Caso#4: Delección intersticial en 3p26.1p26.3

Las deleciones del extremo distal del brazo corto del cromosoma 3 han sido generalmente correlacionadas con un conjunto consistente de características clínicas lo

que dio lugar a clasificar esa región como un síndrome (Takagishi & Rauen, 2006). El síndrome de delección 3p (OMIM #613792), es un síndrome de genes contiguos poco común causado por deleciones de diferentes tamaños en la región 3p25-pter. Se caracteriza por retraso en el crecimiento, RD, DI, dismorfias, microcefalia y ptosis, aunque el fenotipo de los individuos con estas deleciones ha mostrado una gran variabilidad fenotípica la cual puede ir de normal a grave (Pohjola et al., 2010).

El paciente del caso #4 fue previamente reportado como 46,XY, del(3)(p26)dn; sin embargo, con el estudio de aCGH fue posible delimitar la posición genómica de la delección como 3p26.1-26.3 (posición genómica 35,333-8, 122,718; NCBI/hg19), así como determinar su tamaño exacto, el cual fue de 8.1 Mb e incluyó los genes: *CHLI*, *CNTN6*, *CNTN4*, *ILRA5*, *TRNT1*, *CRBN*, *SUMF1*, *LRRN1*, *SETMAR*, *ITPR1*, *EGOT*, *BHLHE40*, *ARL8B*, *EDEMI* y *GRM7*. Tres de estos genes (*CHLI*, *CNTN4*, *CRBN*) deletados en el paciente se han asociado previamente al síndrome de delección 3p. El gen *CHLI* codifica para una molécula de reconocimiento neural que puede estar implicada en la transducción de señales; la delección de una copia de este gen puede ser responsable de defectos mentales en pacientes con síndrome de delección en 3p. El gen *CNTN4* es una molécula de adhesión celular que tiene una importante función en la formación de la red neuronal; la delección de este gen se ha asociado al síndrome de delección 3p así como a trastornos del espectro autista. El gen *CRBN* juega un papel muy importante en el desarrollo del cerebro y mutaciones en este gen se han asociados con retraso mental no sindrómico autosómico recesivo (UCSC genome browser).

Con el empleo de técnicas de alta resolución como microarreglos, ha sido posible identificar los puntos de ruptura de las alteraciones genómicas así como su contenido génico, lo que ha llevado a la identificación de las regiones críticas para presentar un fenotipo determinado. Takagishi et al., (2006) reportaron un caso de madre-hija con una deleción 3p25.3-3pter, quienes presentaron efectos clínicos leves sin DI. Mientras que Wide et al., (2007) describieron 3 pacientes con deleción intersticial en esta región, los cuales presentaron graves efectos fenotípicos. En el 2009, Shuib et al., analizaron un grupo de 14 pacientes con deleción en 3p25, de estos pacientes, 13 presentaron deleción terminal y uno presentó deleción intersticial; 12 de ellos presentaron DI (incluye al paciente con deleción intersticial) y solo cinco, defectos cardiacos. Shuib et al., (2009) realizaron microarreglos para delinear la alteración. Por medio de este estudio asignaron una región crítica candidata para DI, la cual ubicaron en un intervalo de ~1 Mb y contiene sólo el gen *SRGAP3*, los genes *CHLI*, *CNTN4*, *CRBN*, (genes importantes para el desarrollo neurológico) e *ITPR1* se excluyeron de la región crítica. Por otro lado, Pohjola et al., (2010) realizaron un estudio de correlación genotipo-fenotipo de deleciones 3p terminales en dos familias y concluyeron que una pequeña deleción 3p terminal que abarca sólo el gen *CHLI* puede causar sólo DI leve, dificultad leve de aprendizaje, microcefalia y retraso del crecimiento, pero no puede ser relacionado con DI profunda y dismorfismos.

A pesar de la variabilidad fenotípica presente en las deleciones de 3p, en la gran mayoría de los pacientes se ha observado DI de leve a profunda. Sin embargo, al menos 3/30 pacientes han presentado un fenotipo normal sin DI (Rivera H, Domínguez MG, 2006). Lo anterior resulta interesante debido a que el paciente de nuestro caso de estudio, a

pesar de que en su infancia presentó retraso psicomotor, a la fecha según las evaluaciones neuropsicológicas, tiene un CI rondando lo normal. Esto indirectamente apoya lo reportado por Shuib et al., (2009), quienes sugieren que el gen *SRGAP3* es un determinante importante de DI en el síndrome de deleción 3p y el presente paciente no presenta deleción de este gen. Con lo anterior se podría apoyar que los genes causantes de las alteraciones mentales se ubican en la región proximal a 3p25 y los genes que causan alteraciones orgánicas funcionales se ubican en 3p26 (Rivera et al., 2006). Por lo tanto, el análisis genético molecular de la región lleva a la conclusión de que la presentación clínica es secundaria a la ubicación del punto de ruptura y por lo tanto al tamaño del segmento eliminado y su contenido génico.

El paciente de este caso, representa el sexto caso con deleción en 3p sin DI. Nuestros resultados apoyan la hipótesis propuesta por Shuib et al. (2009), quienes proponen una región crítica para DI en 3p25.3 que incluye solo el gen *SRGAP3*, excluyendo los principales genes propuestos para esta característica (*CNTN4*, *CRBN* y *CHLI*).

Por otra parte, en contraste con el comportamiento heterosexual de un caso reportado de un paciente con CI normal y deleción en 3p, el presente paciente presenta un claro comportamiento homosexual. Sin embargo, este fenotipo parece ser un encuentro fortuito, la complejidad de las vías subyacentes, sugieren que la haploinsuficiencia para uno o pocos genes deletados en el paciente como *CNTN6*, *CNTN4* e *ILRA5* pueden estar operando. De hecho, este último codifica para la subunidad beta de una proteína heterodimérica requerida para las actividades biológicas de la *IL5*, tales como la unión a sintetina, un paso crucial en la activación del factor de transcripción *SOX4* relacionado

al sexo. Casualmente *SOX4* y *SHH* parecen ser modulados durante las etapas equivalentes en la neurogénesis del ratón y son preferencialmente expresados en ciertos subtipos celulares. Parece ser significativo que un polimorfismo en el gen *SHH* fue asociado con homosexualidad en más de 300 varones chinos (Wang et al., 2012). Este polimorfismo se analizó tanto en el paciente como en 20 sujetos control, todos presentaron aparentemente el genotipo silvestre A/A (ver figura 17). Se llevó a cabo un análisis de los productos digeridos con la enzima *BanII* mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida para descartar la posible digestión parcial del fragmento analizado, con lo que se comprobó que no hubo digestión parcial. Sin embargo, la falta de un control positivo para la reacción de restricción nos limita a obtener los genotipos concretos.

6.7 Caso#5: Deleción intersticial en 7q21.3-q31.1

Diferentes alteraciones genómicas han sido reportadas a través del brazo largo del cromosoma 7, como duplicaciones, translocaciones, inversiones y deleciones. Las deleciones intersticiales son las alteraciones más comunes en esta región (7q) y se han dividido en tres clases de acuerdo con la región cromosómica involucrada: q11-q21, q21-q31 y q32-q34, todas estas alteraciones comparten como característica común la presencia de RD. Las deleciones constitucionales en 7q son bastante comunes, pero heterogéneas; de hecho, casi todas las regiones de ese brazo cromosómico se han sometido a desequilibrios de número de copias (DECIPHER). A la fecha, derivado de algunos de estos desequilibrios se han descrito seis síndromes reconocibles: Síndrome de Shwachman-Bodian-Diamond (7q11.21), Síndrome de Williams-Beuren (7q11.23), SHMF (ectrodactilia) (7q21.3), Síndrome de Pendred (7q22.3), Síndrome Coffin-Siris

(7q32-q34), y el Síndrome de dispersión de pigmento (7q35-q36) (McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, n.d.).

En particular, las deleciones recurrentes en 7q21-q32 se han asociado sistemáticamente, además de ectrodactilia, a múltiples características clínicas como RD/DI, anomalías del oído externo/orejas de implantación baja, bajo peso al nacer, problemas de alimentación, llanto inusual, microcefalia, micrognatia, defectos cardiacos y del paladar, infecciones recurrentes, pliegues palmares anormales y a anomalías oculares (Cheong et al., 2008; Fagan et al., 1989; Bernardini et al., 2008; Montgomery et al., 2000; Scherer et al., 1994; van Silfhout et al., 2009; Young et al., 1984). Esta coherencia fenotípica junto con la aparente superposición de sus regiones deletadas, incluso ha sugerido que puede representar un síndrome de deleción reconocible (Fagan et al., 1989). Sin embargo, algunos reportes sobre las deleciones dentro de este intervalo cromosómico carecen de una delineación fina y no han sugerido una región o loci específicos para la mayoría de las características clínicas mapeados en el mismo, incluyendo glaucoma.

La paciente del caso#5 quien presentó, retraso psicomotor, glaucoma congénito bilateral grave, paladar hendido y defecto cardiaco, entre otras características (ver descripción clínica de la paciente en la sección de resultados), fue previamente reportada como 46XX,del (7)(q22q22); pero una vez que se realizó el aCGH el cariotipo final basado en la ISCN (2013) se describe como 46,XX.arr 7q21.3q31.1(96,742,140-109,246,085)x1 dn. De esta manera, el análisis de microarreglos reveló una región deletada de 12.5 Mb, la cual abarca 500 marcadores y 229 genes (incluidos miRNAs y proteínas hipotéticas),

siendo *ACN9* el gen más proximal y *C7orf66* el más distal (GRCh37/hg19); por lo tanto, se observó una monosomía parcial de 7q21.3-q31.1.

A la fecha se han reportado 3 casos de delección en 7q en los cuales se presenta Glaucoma (Dennis et al., 1977; Montgomery et al., 2000; Franceschini et al., 1978). El glaucoma, es una condición clínica y genéticamente heterogénea, caracterizada por la pérdida de las células ganglionares de la retina y la atrofia del nervio óptico (Izzotti et al., 2011; Mookherjee et al., 2012). Lo cual, conduce a una pérdida progresiva de la visión y puede llevar a ceguera irreversible. En la mayoría de los casos el glaucoma se desencadena por un aumento en la presión intraocular (IOP, por sus siglas en inglés). El principal criterio clínico del aumento de la IOP generalmente resulta de la resistencia de la red trabecular al humor acuoso (Kennedy et al., 2012). La red trabecular se localiza alrededor de la base de la córnea y desempeña un papel importante en la regulación del flujo de salida del humor acuoso (Mookherjee et al., 2012). Las alteraciones en la red trabecular con frecuencia se han encontrado en pacientes con glaucoma congénito. De hecho, el gen *TAC1*, el cual está deletado en la paciente, está relacionado con la vía funcional de gen *MYOC* que es una glicoproteína inducida por condiciones de estrés en la red trabecular. Además, la expresión de *TAC1* también se ha observado alterada en células mutantes de *MYOC* (Kennedy et al., 2012). El gen *TAC1* codifica para los precursores de hormonas que actúan como neurotransmisores (UCSC genome browser), y ha sido identificado como un gen mecanosensible en la red trabecular humana (Kennedy et al., 2012). Por lo que recientemente se ha sugerido a *TAC1* como un posible biomarcador fisiológico para la lesión glaucomatosa.

El gen *HBPI*, también deletado en la paciente, es un represor transcripcional que participa en la vía WNT y se expresa en retina, córnea, y cuerpos ciliares (bases de datos GeneCards EMBL-EBI y). Interesantemente, la vía WNT se ha asociado a la regulación de la IOP [Kennedy et al., 2012]. De hecho, *HBPI* es semejante al gen *HMGB1* (del inglés, High-mobility group protein B1) que se sabe es una molécula endógena para la señalización de daño en la retina y estrés inflamatorio (Lee et al., 2012).

Un pequeño grupo de genes del citocromo P450 en 7q22.1 (*CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP3A7*, *CYP3A43*) se encuentran deletados en nuestro paciente. Sorprendentemente, *CYP3A43* fue encontrado diferencialmente expresado en tejido de córnea humana (Turner et al, 2007). En general, los miembros de la subfamilia 3A se han encontrado expresados en iris humano, cuerpos ciliares y la córnea (Zhang et al., 2008; Volotinen et al., 2011). Esto resulta interesante ya que uno de los primeros genes asociados a glaucoma es el gen *CYP1B1* (2p22.2), el cual se ha relacionado con glaucoma congénito primario y con metabolitos citocromo-P450-dependientes que regulan transparencia de la córnea y la secreción del humor acuoso (OMIM # 231300). Además, se ha encontrado subexpresado a *CYP1B1* y sobreexpresado a *CYP26B1* en células de red trabecular humana con mutaciones en el gen *MYOC* (Kennedy et al., 2012). Estos hechos sugieren que otros genes de la familia del citocromo P450 podrían estar relacionados también a lesiones glaucomatosas.

En la región deletada en la paciente, también se encuentran una gran cantidad de genes asociados a daño neurológico como *RELN*, la cual codificada para una proteína de

matriz y participa en el proceso de adhesión celular; la delección de *RELN* también ha sido asociada a anomalías faciales (Al-Hassnan et al., 2011). En esta región, también se encuentran genes asociados a alteraciones craneofaciales, defectos cardiacos, defectos gastrointestinales y retraso en el crecimiento (ver tabla 5).

Se realizó un análisis de las características clínicas presentes en los casos reportados que traslapan con la región 7q21.3-q31.1, encontrando que hay características clínicas presentes en más del 30% de los casos (ver figura 16 y tabla 6).

Este caso representa el cuarto paciente descrito hasta ahora con glaucoma y una delección que abarca o traslapa en la región 7q21.3-q31.1 y así, confirma la presencia de un locus o loci relacionados con esta característica clínica. Según nuestros resultados (ver figura 16), la propensión a defectos oculares secundarios a deleciones intermedias en 7q, podrían depender de la co-delección de los genes *TAC1*, *HBPI*, y un pequeña grupo de genes del citocromo P450 (subfamilia 3A). Aún cuando la mayoría de los casos con defectos oculares y deleciones en la región de estudio fueron reportados antes de que fueran disponibles las técnicas de alta resolución, parece factible que al menos en 9 de los pacientes, sus respectivas deleciones involucren los genes mencionados.

Por otra parte, tomando en cuenta que esta paciente presenta varias características clínicas relacionadas con las deleciones recurrentes en 7q21-q32, nuestros resultados y observaciones ofrecen un panorama general del contenido de genes de las deleciones/fenotipos que traslapan en 7q21.3-q31.1. Uno de los puntos de ruptura de esta delección se ubica apenas 88 kb corriente abajo de la región crítica para ectrodactilia propuesta por Scherer et al.,(1994) e incluye los genes *ACN9*, *ASNS* propuestos por

Tzscach et al., (2007) como elementos reguladores, así como el gen *CUX1* por Bernardini et al., (2008), para explicar la ectrodactilia presente en sus pacientes. Debido a que la paciente no presenta ese fenotipo e incluye los genes propuestos, se puede confirmar que los loci distales a los genes *DLX* incluyendo el gen *CUX1* y los potenciales elementos reguladores corriente abajo de *DLX5* no están relacionados con ectrodactilia (ver figura 15).

CAPÍTULO 7

CONCLUSIÓN

- La base de datos interna, permitió identificar 13 CNV comunes en la población estudiada, así como reclasificar un CNV como benigno en el paciente del caso#1,
- Se logró identificar alteraciones genómicas patogénicas en 3 de los 5 casos analizados.
- El éxito en la detección de alteraciones genómicas se debe en parte a la cobertura y tipo de tipo de microarreglo utilizado, al análisis exhaustivo y a la búsqueda de evidencia basada en la revisión, así como a la selección de los pacientes.
- La falta de análisis de las muestras de los padres disminuye el rendimiento diagnóstico de aCGH debido a que estos CNVs permanecen como de SCI.
- Se demostró que el rendimiento diagnóstico aumenta en pacientes con cariotipo normal, cuando presentan un fenotipo más severo (MM y DIG), como en el caso #3.
- Con los resultados obtenidos del caso#4, se apoyan la hipótesis propuesta por Shuib et al., 2009, acerca de la función de SRGAP3 en la DI.
- Con la información obtenida del caso#5, se sugiere un locus o loci para alteraciones oculares en 7q21.3q31.1. Además, nuestros resultados y observaciones ofrecen un panorama general del contenido de genes de las deleciones / fenotipos que traslapan en 7q21.3-q31.1, así como sugieren la

presencia de un síndrome de deleción en esta región. Se escribió un artículo para este caso y fue aceptado en la revista *Molecular Syndromology*.

- Los aCGH son una herramienta muy valiosa tanto en el diagnóstico de pacientes con MM y RD/DI con cariotipo normal; como en pacientes con alteraciones previamente identificadas con cariotipo, ya que es posible definir los puntos de ruptura de las alteraciones así como identificar los genes involucrados en dichas alteraciones y realizar una asociación genotipo-fenotipo más precisa.

CAPÍTULO 8

PERSPECTIVAS

- Realizar un análisis genómico más extenso como la secuenciación de exoma, para buscar una posible alteración que sea más consistente con el fenotipo de los pacientes de los casos 1 y 2.
- Realizar análisis de metilación específico para los genes *WTIP*, *ZNF302* y *ZNF30* en las pacientes del caso#3, así como análisis de expresión de los mismos.
- Secuenciar la región afectada por CN-LOH en las pacientes del caso#3 para saber si se está desenmascarando una enfermedad recesiva.

BIBLIOGRAFÍA

- Affymetrix. (2010). A solution for molecular cytogenetics The Affymetrix SNP Array 6 . 0 : A solution for cytogenetics.
- Al-Hassnan, Z. N., Al-Bakheet, A., Abu-Dheim, N., Al-Younes, B., Colak, D., & Kaya, N. (2011). A novel interstitial microdeletion of 7q22.1-7q22.3 detected by array comparative genomic hybridization. *American journal of medical genetics. Part A*, 155A(12), 3128–31. doi:10.1002/ajmg.a.34298
- Al., D. A. K. et. (2012). Mutations in the chromatin modifier gene KANSL1 cause the 17q21.31 microdeletion syndrome. *Nature Genetics*, 44, 639–641 (2012).
- Barboza-Argüello M, U.-S. L. (2008). Original Análisis de diez años de registro de malformaciones congénitas en Costa Rica (Ten year analysis of the national registry of congenital. *AMC*, 50(4), 221–229.
- Cheong, M.-L. J., Tsai, M.-S., Cortes, R. a, & Harrison, M. R. (2008). Intermediate interstitial deletion of chromosome 7q detected by first-trimester Down’s syndrome screening. *Fetal diagnosis and therapy*, 24(4), 340–4. doi:10.1159/000161115
- Cho, E. H., Park, B. Y. N., Cho, J. H., & Kang, Y. S. (2009). Comparing two diagnostic laboratory tests for several microdeletions causing mental retardation syndromes: multiplex ligation-dependent amplification vs fluorescent in situ hybridization. *The Korean journal of laboratory medicine*, 29(1), 71–6. doi:10.3343/kjlm.2009.29.1.71
- De Vries, B. B. a, Pfundt, R., Leisink, M., Koolen, D. a, Vissers, L. E. L. M., Janssen, I. M., Reijmersdal, S. Van, et al. (2005). Diagnostic genome profiling in mental retardation. *American journal of human genetics*, 77(4), 606–16. doi:10.1086/491719
- Dennis NR, Neu RL, B. R. (1977). A partial 7q monosomy in an infant with multiple anomalies. *Am J Hum Genet*, 29(37A).
- Engels, H., Brockschmidt, a, Hoischen, a, Landwehr, C., Bosse, K., Walldorf, C., Toedt, G., et al. (2007). DNA microarray analysis identifies candidate regions and genes in unexplained mental retardation. *Neurology*, 68(10), 743–50. doi:10.1212/01.wnl.0000256367.70365.e0
- Fagan, K., Gillt, A., Henryt, R., Wilkinsont, I. A. N., & Carey, B. (1989). A summary of 7q interstitial deletions and exclusion mapping of the gene for - B glucuronidase. *Journal of Medical Genetics*, 26(January), 619–625.
- Forzano, F., Napoli, F., Uliana, V., Malacarne, M., Viaggi, C., Bloise, R., Coviello, D., et al. (2012). 19q13 microdeletion syndrome: Further refining the critical region. *European journal of medical genetics*, 55(6-7), 429–32. doi:10.1016/j.ejmg.2012.03.002
- Gibson, J., Morton, N. E., & Collins, A. (2006). Extended tracts of homozygosity in outbred human populations. *Human molecular genetics*, 15(5), 789–95. doi:10.1093/hmg/ddi493
- Hera, J. D. E. L. A. S. (1993). Etiopatogenia del retraso mental. *Revista Complutense de Educación*, 4(2), 53–65.

- Iourov, I. Y., Vorsanova, S. G., & Yurov, Y. B. (2008). Molecular cytogenetics and cytogenomics of brain diseases. *Current genomics*, 9(7), 452–65. doi:10.2174/138920208786241216
- Kennedy, K. D., Anithachristy, S. A., Buie, L. K., & Borra, T. (2012). Cystatin A , a Potential Common Link for Mutant Myocilin Causative Glaucoma. *PloS one*, 7(5), 1–21. doi:10.1371/journal.pone.0036301
- Kitsiou-Tzeli, S., Frysira, H., Giannikou, K., Syrmou, A., Kosma, K., Kakourou, G., Leze, E., et al. (2012). Microdeletion and microduplication 17q21.31 plus an additional CNV, in patients with intellectual disability, identified by array-CGH. *Gene*, 492(1), 319–24. doi:10.1016/j.gene.2011.10.023
- Knight, S. J., Regan, R., Nicod, a, Horsley, S. W., Kearney, L., Homfray, T., Winter, R. M., et al. (1999). Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet*, 354(9191), 1676–81. doi:10.1016/S0140-6736(99)03070-6
- Laura Bernardini, 1* Chiara Palka, 1, 2 Caterina Ceccarini, 1 Anna Capalbo, 1, 2 Irene Bottillo, 1, 2, & Rita Mingarelli, 1 Antonio Novelli, 1, 2 and Bruno Dallapiccola. (2008). Complex Rearrangement of Chromosomes 7q21. 13- • q22. 1 Confirms the Ectrodactyly- • Deafness Locus and Suggests New Candidate Genes. *American journal of medical genetics. Part A*, 146, 238–244. doi:10.1002/ajmg.a
- Li, L., Ho, S., Chen, C., & Wei, C. (2006). Long contiguous stretches of homozygosity in the human genome. *Human mutation*, 27(11), 1115–1122. doi:10.1002/humu
- Lilly, J. W., Havey, M. J., Jackson, S. a, & Jiang, J. (2001). Cytogenomic analyses reveal the structural plasticity of the chloroplast genome in higher plants. *The Plant cell*, 13(2), 245–54. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=102240&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Lu, X., Shaw, C. a, Patel, A., Li, J., Cooper, M. L., Wells, W. R., Sullivan, C. M., et al. (2007). Clinical implementation of chromosomal microarray analysis: summary of 2513 postnatal cases. *PloS one*, 2(3), e327. doi:10.1371/journal.pone.0000327
- Lu, X.-Y., Phung, M. T., Shaw, C. a, Pham, K., Neil, S. E., Patel, A., Sahoo, T., et al. (2008). Genomic imbalances in neonates with birth defects: high detection rates by using chromosomal microarray analysis. *Pediatrics*, 122(6), 1310–8. doi:10.1542/peds.2008-0297
- McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, M. (n.d.). Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Retrieved from <http://omim.org/>
- Moeschler, J. B., & Shevell, M. (2006). Clinical genetic evaluation of the child with mental retardation or developmental delays. *Pediatrics*, 117(6), 2304–16. doi:10.1542/peds.2006-1006
- Montgomery TL, Wyllie J, O. C. (2000). Ectrodactyly and glaucoma associated with a 7q21.2-q31.2 interstitial deletion. *Clin Dysmorphol*, 9(4), 235–239.
- Mookherjee, S., Acharya, M., Banerjee, D., Bhattacharjee, A., & Ray, K. (2012). Molecular Basis for Involvement of CYP1B1 in MYOC Upregulation and Its Potential Implication in Glaucoma Pathogenesis. *PloS one*, 7(9), 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0045077

- Márquez-Caraveo, M. (2011). Epidemiología y manejo integral de la discapacidad intelectual. *Salud mental*, 34(5), 443–449. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-33252011000500008&script=sci_arttext&lng=pt
- OMS. (2010). Defectos congénitos. 63.^a ASAMBLEA MUNDIAL DE LA SALUD, 1–7.
- O'Keefe, C., McDevitt, M. a, & Maciejewski, J. P. (2010). Copy neutral loss of heterozygosity: a novel chromosomal lesion in myeloid malignancies. *Blood*, 115(14), 2731–9. doi:10.1182/blood-2009-10-201848
- P. Franceschini 1 *, M. Cirillo Silengo I, G. E Davi ~, M. A. Santoro 2, G. Prandi 2, and C. F. 2. (1978). Interstitial Deletion of the Long Arm of Chromosome 7 46,XX,del(7)(pter~q2200 : : q3200~qter). *Hum. Genet.*, 44, 345–348.
- Palmer, E., Peters, G., & Mowat, D. (2012). Chromosome microarray in Australia: A guide for paediatricians. *Journal of Paediatrics and ...*, 48(2), E59–67. doi:10.1111/j.1440-1754.2011.02081.x
- Pohjola, P., De Leeuw, N., Penttinen, M., & Kääriäinen, H. (2010). Terminal 3p deletions in two families - correlation between molecular karyotype and phenotype. *American journal of medical genetics. Part A*, 152A(2), 441–6. doi:10.1002/ajmg.a.33215
- Rivera H, Domínguez MG, M. E. (2006). Follow-up of an intelligent odd-mannered teenager with del(3)(p26). Remarks on authorship and ethical commitment. *Genet Couns*, 17(4), 401–5.
- Sagoo, G. S., Butterworth, A. S., Sanderson, S., Shaw-Smith, C., Higgins, J. P. T., & Burton, H. (2009). Array CGH in patients with learning disability (mental retardation) and congenital anomalies: updated systematic review and meta-analysis of 19 studies and 13,926 subjects. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 11(3), 139–46. doi:10.1097/GIM.0b013e318194ee8f
- Scherer, S., Poorkaj, P., & Allen, T. (1994). Fine mapping of the autosomal dominant split hand/split foot locus on chromosome 7, band q21. 3-q22. 1. *Am.J. Hum. Genet.* 55:12-20, 1994, 55, 12–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1918243/>
- Shaffer, L. G. (2005). American College of Medical Genetics guideline on the cytogenetic evaluation of the individual with developmental delay or mental retardation. *Genetics in Medicine*, 7(9), 650–654. doi:10.1097/01.gim.0000186545.83160.1e
- Shaffer, L. G., Theisen, A., Bejjani, B. a, Ballif, B. C., Aylsworth, A. S., Lim, C., McDonald, M., et al. (2007). The discovery of microdeletion syndromes in the post-genomic era: review of the methodology and characterization of a new 1q41q42 microdeletion syndrome. *Genetics in Medicine*, 9(9), 607–616. doi:10.1097/GIM.0b013e3181484b49
- Shaikh, T. H. (2007). Oligonucleotide arrays for high-resolution analysis of copy number alteration in mental retardation/multiple congenital anomalies. *Genetics in Medicine*, 9(9), 617–625. doi:10.1097/GIM.0b013e318148bb81
- Smeets, D. F. C. M. (2004). Historical prospective of human cytogenetics: from microscope to microarray. *Clinical biochemistry*, 37(6), 439–46. doi:10.1016/j.clinbiochem.2004.03.006

- Stankiewicz, P., & Beaudet, A. L. (2007). Use of array CGH in the evaluation of dysmorphology, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation. *Current opinion in genetics & development*, 17(3), 182–92. doi:10.1016/j.gde.2007.04.009
- Takagishi, J., & Rauen, K. (2006). Chromosome 3p25 deletion in mother and daughter with minimal phenotypic effect. *American Journal of Medical Genetics*, 140A, 1587–1593. doi:10.1002/ajmg.a
- Van Silfhout, A. T., Van den Akker, P. C., Dijkhuizen, T., Verheij, J. B. G. M., Olderode-Berends, M. J. W., Kok, K., Sikkema-Raddatz, B., et al. (2009). Split hand/foot malformation due to chromosome 7q aberrations(SHFM1): additional support for functional haploinsufficiency as the causative mechanism. *European journal of human genetics : EJHG*, 17(11), 1432–8. doi:10.1038/ejhg.2009.72
- Vissers, L. E. L. M., Veltman, J. a, Van Kessel, A. G., & Brunner, H. G. (2005). Identification of disease genes by whole genome CGH arrays. *Human molecular genetics*, 14 Spec No(2), R215–23. doi:10.1093/hmg/ddi268
- Vucic, E. A., Thu, K. L., Williams, A. C., Lam, W. L., & Coe, B. P. (n.d.). Copy Number Variations in the Human Genome and Strategies for Analysis (Vol. 628, pp. 103–117). doi:10.1007/978-1-60327-367-1
- Wang, B., Zhou, S., Hong, F., Wang, J., Liu, X., Cai, Y., Wang, F., et al. (2012). Association analysis between the tag SNP for sonic hedgehog rs9333613 polymorphism and male sexual orientation. *Journal of andrology*, 33(5), 951–4. doi:10.2164/jandrol.110.012849
- Young, R. S., Weaver, D. D., Kukolich, M. K., Heerema, N. a, Palmer, C. G., Kawira, E. L., & Bender, H. a. (1984). Terminal and interstitial deletions of the long arm of chromosome 7: a review with five new cases. *American journal of medical genetics*, 17(2), 437–50. doi:10.1002/ajmg.1320170207
- Yurov, Y. B., Liehr, T., Shaffer, L. G., Iourov, I. Y., & Vorsanova, S. G. (2008). A new open access journal for a rapidly evolving biomedical field: introducing Molecular Cytogenetics. *Molecular cytogenetics*, 1, 1. doi:10.1186/1755-8166-1-1

ANEXOS

ANEXO 1

Carta de consentimiento informado

Lugar y fecha: Monterrey, Nuevo León ade..... 20

Por medio de la presente
yo..... doy mi consentimiento
para participar o para que mi
hijo(a).....participe
como paciente en el proyecto de investigación titulado “**Caracterización molecular por aCGH de alteraciones genómicas en pacientes con discapacidad intelectual y malformaciones múltiples de etiología desconocida**” registrado ante el comité local de investigación en salud y bioética con el número.....El objetivo del estudio será la búsqueda de alteraciones genéticas que puedan explicar las causas de la enfermedad en los pacientes. Se me ha explicado que mi participación o la de mi hijo(a) consistirá en dar una muestra de 5.0 ml de sangre que se usará para los análisis moleculares del presente estudio. Declaro que el investigador o el médico genetista responsables me han informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias o beneficios derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes: a) información y asesoría con respecto al estado del paciente, b) entiendo que el procedimiento antes mencionado puede implicar alguna molestia en el sitio de la punción y c) el material obtenido de mi o mi hijo(a) podrá ser almacenado para investigaciones futuras; además se han comprometido a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que tenga sobre lo anterior o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con mi tratamiento. Entiendo que tengo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que yo lo desee, sin que mi decisión afecte la atención médica que recibo. El o los investigador(es) principal(es) me ha(n) dado seguridades de que mis datos serán manejados con privacidad. También se ha(n) comprometido a decirme la información nueva que se obtenga durante el estudio, y si esta información me causa una molestia tengo el derecho de retirarme o retirar a mi representado(a) cuando lo desee. Nota: por falta de espacio se omitieron las líneas de nombre y firma de los responsables de investigación y genetista.

ANEXO 2

Extracción de DNA genómico con Kit Gentra® Puregene QIAGEN

1. Colocar 900 μ L de solución de lisis RBC en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL.
2. Agregar 300 μ L de sangre total y mezclar por inversión 10 veces.
3. Incubar 1 min a temperatura ambiente (15–25°C). Invertir al menos una vez durante la incubación. *Para sangre fresca (colectada dentro de 1 h antes de iniciar el protocolo) incrementar el tiempo de incubación 3 min para asegurar la lisis completa de las células rojas.
4. Centrifugar 20 s a 13,000–16,000 x g para sedimentar las células blancas de la sangre.
5. Cuidadosamente descartar el sobrenadante con pipeta o decantando, dejando aproximadamente 10 μ L de líquido residual y las células blancas sanguíneas sedimentadas.
6. Vórtex al tubo vigorosamente para resuspender el sedimento en el líquido residual. *El vórtex facilita la lisis celular en la siguiente etapa. El sedimento debe estar completamente disperso después del vórtex.
7. Agregar 300 μ L de la solución de lisis celular, y agitar con pipeta hacia arriba y hacia abajo para lisar las células o agitar vigorosamente durante 10 s. *Usualmente la incubación no es requerida; sin embargo si las células son visibles, incubar a 37 °C hasta que la solución sea homogénea.*Las muestras son estables en solución de lisis celular por al menos dos años a temperatura ambiente.
8. Opcional: si es requerido DNA libre de RNA, agregar 1.5 μ L de solución de RNasa y mezclar por inversión 25 veces. Incubar 15 min a 37°C. Después incubar 1 min en hielo rápidamente para enfriar la muestra.
9. Agregar 100 μ L de solución de precipitación de proteínas, y llevar a vórtex vigorosamente por 20 s a alta velocidad.
10. Centrifugar 1 min a 13,000–16,000 x g. * Las proteínas precipitadas deben formar un compacto y oscuro sedimento marrón. Si el pellet de proteína no está compacto, incubar en hielo durante 5 minutos y repetir la centrifugación.
11. Colocar 300 μ L de isopropanol en un tubo de 1.5 mL limpio y añadir el sobrenadante del paso anterior cuidadosamente. Asegúrese de que el pellet de proteína no se desplace durante el vertido.
12. Mezclar suavemente por inversión 50 veces hasta que el ADN pueda ser visualizado como hilos o precipitado ligero.

13. Centrifugar durante 1 min a 13.000 -16.000 xg.

*El ADN puede ser visible como un pequeño precipitado blanco.

14. Con cuidado, descartar el sobrenadante, y drenar el tubo por inversión en una hoja limpia de papel absorbente, teniendo cuidado de que el pellet se mantenga en el tubo.

15. Añadir 300 µL de etanol al 70% e invertir varias veces para lavar el sedimento de ADN.

16. Centrifugar durante 1 min a 13.000-16.000 xg, 1 min a 2000 xg, o 1 min a 2000 x g.

17. Cuidadosamente, descartar el sobrenadante. Vacíe el tubo en un pedazo limpio de papel absorbente, teniendo cuidado de que el pellet se mantenga en el tubo. Deje secar al aire el precipitado durante 5 minutos, 5-10 minutos, o 5-10 minutos.

*La pastilla podría estar suelta y ser desplazada con facilidad.

*Evitar el exceso de secado del precipitado de ADN, ya que será difícil de disolver.

18. Añadir 100 µL, 300 µL, o 1 mL de solución de hidratación del ADN y vértex durante 5 s a velocidad media para mezclar.

19. Incubar a 65 ° C durante 5 min, 1 h, o 1 h para disolver el ADN.

20. Incubar a temperatura ambiente durante la noche con agitación suave. Asegúrese de que la tapa del tubo este herméticamente cerrada para evitar fugas. Las muestras se pueden centrifugar brevemente y transferir a un tubo de almacenamiento

ANEXO 3

Verificación de la extracción de DNA-Electroforesis en gel de agarosa.

1. Preparación del gel de agarosa al 1%.

1.1 Pesar .35 g de agarosa y agregar 35 ml de TBE 1X, calentar a ebullición en una placa de calentamiento hasta disolver la agarosa.

1.2 Verter la agarosa en el molde, asegurando que no queden burbujas y colocar el peine en las ranuras correspondientes del molde. Dejar solidificar.

1.3 Desmontar el molde y colocarlo en la cámara de electroforesis.

1.4 Agregar TBE1X a la cámara de electroforesis hasta que cubra completamente el gel.

2. Preparación de la muestra

2.1 Colocar 1µL de buffer de carga (jugo azul) en un molde para carga limpio y seco.

2.2 Agregar 5 µL de muestra (DNA) y mezclar bien.

2.3 Depositar en los pocillos del gel las muestras bien mezcladas siguiendo un orden previamente establecido.

3. Electroforesis

3.1 Conectar correctamente los cables de la cámara en la fuente de poder. El cable que se encuentra hacia el lado donde se aplicaron las muestras conectarlo al polo negativo (cátodo/color negro) y el cable del otro extremo, hacia donde migraran las muestras conectarlo al polo positivo (ánodo/color rojo).

3.2 Ajustar el voltaje a 85 volts por 45 minutos.

4. Tinción con bromuro de Etidio

4.1 Una vez que terminó el tiempo de corrida, colocar el gel en una solución de bromuro de etidio (0.5µg/ml). Es muy importante utilizar guantes ya que esta solución es toxica y potencialmente mutagénica. Dejar aproximadamente 10 minutos.

5. Fotodocumentación

5.1 Colocar cuidadosamente el gel en el fotodocumentador y obtener las imágenes.

ANEXO 4

Protocolo para microarreglos de genotipificación Affymetrix

Etapa 1: Digestión con *StyI* y *NspI*

1. Preparar placa de ADN genómico.
2. Preparar master mix de digestión con *StyI* y *NspI*, vortexear y centrifugar (spin).

Digestión con <i>StyI</i>	1X	1.5X	Digestión con <i>NspI</i>	1X	1.5X
Agua ° Biol. Mol.	11.55 µL	17.32 µL	Agua ° Biol. Mol.	11.55 µL	17.32 µL
NE buffer 3 (10X)	2.0 µL	3.0 µL	NE buffer 2 (10X)	2.0 µL	3.0 µL
BSA (100X; 10 mg/mL)	0.2 µL	0.3 µL	BSA (100X; 10 mg/mL)	0.2 µL	0.3 µL
<i>StyI</i> (10 U/ µL)	1.0 µL	1.5 µL	<i>NspI</i> (10 U/ µL)	1.0 µL	1.5 µL
Volumen total	14.75 µL	22.125 µL	Volumen total	14.75 µL	22.125 µL

3. Agregar 14.75 µL de master mix de digestión a cada pozo de la placa (uno para *StyI* y otro para *NspI*), agregar 5 µL de la muestra de ADN (50ng/µL) a cada pozo con master mix.

- A) Sellar la placa con etiquetas adhesivas, vortexear y centrifugar.
- B) Colocar la placa en el termociclador (Veriti) y correr el programa de digestión.

Programa de digestión GW5/6	
Temperatura	Tiempo
37°C	120 min
65°C	20 min
4°C	Infinito

Nota: Tanto la enzima *StyI* como *NspI* deben mantenerse a -20°C hasta que se vayan a agregar al master mix. Precalentar la tapa del termociclador a 105°C

Etapa 2: Ligación de productos digeridos con *StyI* y *NspI*.

1. Preparar master mix de ligación, vortexear y centrifugar (spin).

Ligación de productos digeridos con <i>NspI</i>	1X	1.5X	Ligación de productos digeridos con <i>StyI</i>	1X	1.5X
Buffer ligasa de ADN T4 (10X)	2.5 µL	3.75 µL	Buffer ligasa de ADN T4 (10X)	2.5 µL	3.75 µL
Adaptador <i>NspI</i> (50µM)	0.75 µL	2.25 µL	Adaptador <i>StyI</i> (50µM)	0.75 µL	2.25 µL
Ligasa de ADN T4(400 U/µL)	2.0 µL	3.0 µL	Ligasa de ADN T4(400 U/µL)	2.0 µL	3.0 µL
Volumen total	5.25 µL	7.875 µL	Volumen total	5.25 µL	7.875 µL

2. Agregar 5.25 µL de master mix de ligación a cada pozo de la placa con muestras digeridas.

- A) Sellar la placa con etiquetas adhesivas, vortexear y centrifugar.

B) Colocar la placa en el termociclador (Veriti) y correr el programa de ligación.

Programa de ligación GW5/6	
Temperatura	Tiempo
16°C	180 min
70°C	20 min
4°C	Infinito

3. Diluir las muestras ligadas agregando 75 µL de agua ° mol en cada pozo con muestra. Sellar la placa, vortexear y centrifugar. Para cada muestra de ligados *StyI* se realizarán 3 reacciones de PCR y 4 para muestras ligadas con *NspI*.

4. Transferir 10 µL de las muestras ligadas diluidas a una placa de PCR.

Nota: Descongelar el buffer ligasa sobre hielo. La ligasa T4 debe mantenerse a -20°C hasta que se vaya a agregar al master mix. Usar el adaptador correcto para cada enzima. Mantener las placas en cooler. Colocar los 10 µL de la muestra ligada diluida después de poner el master mix de PCR en la placa.

Etapa 3: PCR de productos ligados

1. Preparar master mix de PCR en un tubo de 1.5ml sobre hielo.

PCR de productos ligados con <i>NspI</i>		
Reactivo	1X	4.5X
Agua ° mol.	39.5 µL	177.75 µL
Buffer PCR Taq TITANIUM (10X)	10 µL	45 µL
GC-Melt (5M)	20 µL	90 µL
dNTP (2.5 mM c/u)	14 µL	63 µL
Primer PCR Nsp 002 (100 µM)	4.5 µL	20.25µL
Taq ADN pol TITANIUM 50X	2.0 µL	9.0 µL
Volumen total	90 µL	405µL

PCR de productos ligados con <i>StyI</i>		
Reactivo	1X	3.5X
Agua ° mol.	39.5 µL	138.25 µL
Buffer PCR Taq TITANIUM (10X)	10 µL	35 µL
GC-Melt (5M)	20 µL	70 µL
dNTP (2.5 mM c/u)	14 µL	49 µL
Primer PCR Sty 002 (100 µM)	4.5 µL	15.75µL
Taq ADN pol TITANIUM 50X	2.0 µL	7.0 µL
Volumen total	90 µL	315µL

2. En el área de preparación (campana), agregar 90 µL el master mix de PCR *Sty* a cada una de las muestras ligadas diluidas [de la(s) placa(s)].

A) Sellar la placa con etiquetas adhesivas, vortexear y centrifugar.

B) Colocar la placa en el termociclador AB-9700 y correr el programa de PCR (laboratorio principal).

Programa PCR GW5/6		
Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°C	3 min	-
94°C	30 seg	30X
60°C	45 seg	
68°C	15 seg	
68°C	7 min	-
4°C	Infinito	

Nota: Precalear la tapa del termociclador a 105° C. La Taq pol debe mantenerse a -20°C hasta que se vaya a agregar al master mix.

Etapa 4: Calidad y purificación de productos de PCR (*Sty-Nsp*)

1. Mezclar 3 µL de cada producto de PCR con 1.5-3 µL de jugo azul y correrlos en un gel de agarosa al 2-2.5%. La distribución de los productos de PCR deberá ser entre 200-1100 pb; por lo tanto se deberá correr a ~100V por 40 min. Utilizar un marcador de peso molecular de 100 pb.

2. Agrupar todos los productos de PCR en cada uno de los pozos correspondientes a cada muestra (no contaminar las muestras). Esto se debe realizar en una placa de pozos profundos.

3. Realizar la purificación con isopropanol.

Etapa 5: Fragmentación de productos purificados

1. Agregar 5 µL de buffer de fragmentación 10X a cada muestra.

2. Preparar el master mix de fragmentación sobre hielo, vortexear, centrifugar y mantener en hielo.

Reactivo	1X
Agua ° mol.	6.45 µL
Buffer de fragmentación 10X	0.75 µL
Reactivo de fragmentación (25 U/µL; DNasaI)	0.3 µL
Volumen total	7.5 µL

3. Agregar 5 µL del master mix de fragmentación a cada muestra. Sellar la placa y vortexear. Centrifugar a 4°C - 2000 rpm por 30 seg.

4. Precalear la tapa y bloque del termociclador a 37 °C; colocar la placa sellada en el termociclador y correr el programa de fragmentación.

Programa de fragmentación GW5/6	
Temperatura	Tiempo
37°C	35 min
95°C	15 min
4°C	Infinito

Nota: Checar la concentración del reactivo de fragmentación. Mantener el reactivo de fragmentación a -20°C y siempre tenerlo en el cooler. Todos los pasos de la fragmentación deberán realizarse en hielo.

5. Tomar 1.5 µL de cada producto fragmentado y correrlo en un gel de agarosa al 4%. La distribución de los productos fragmentados deberá ser en promedio <180 pb; por lo tanto se deberá correr a ~100V por 45 min.

Etapa 6: Marcaje de productos fragmentados

1. Preparar el master mix de marcaje, vortexear y centrifugar.

Reactivo	1X
Agua ° mol.	6.45 µL
Buffer de fragmentación 10X	0.75 µL
Reactivo de fragmentación (25 U/µL; <i>ADNasaI</i>)	0.3 µL
Volumen total	7.5 µL

2. Agregar 19.5 µL de master mix de marcaje a cada muestra. Sellar la placa, vortexear y centrifugar.

3. Precaentar el bloque del termociclador. Colocar la placa sellada en el termociclador y correr el programa de marcaje.

Programa de marcaje GW5/6	
Temperatura	Tiempo
37°C	4 hr
95°C	15 min
4°C	Infinito

Etapa 7: Hibridación

1. Precaentar el horno de hibridación durante 1 hr a 50°C y 60 rpm.

2. Sacar los chips para que se calienten a temperatura ambiente (20-35° C).

3. Preparar el master mix de hibridación en hielo, vortexear, centrifugar y mantener en hielo.

Reactivo	1X	1.5X
MES (12X; 1.25M)	12 µL	18µL
Solución de Denhardt (50X)	13 µL	19.5µL
EDTA (0.5M)	3 µL	4.5µL
ADN Herring sperm (10mg/mL)	3 µL	4.5µL
OCR, 0100	2 µL	3.0 µL
ADN Cot-1 Humano (1mg/mL)	3 µL	4.5 µL
Tween 20 (3%)	1 µL	1.5 µL
DMSO (100%)	13 µL	19.5 µL
TMACL (5M)	140 µL	210 µL
Volumen total	190 µL	285 µL

4. Agregar 190 µL de master mix de hibridación a cada muestra marcada. Sellar la placa firmemente, vortexear y centrifugar.

5. Colocar la placa en el termociclador y correr el programa GW5/6 de hibridación.

Programa de hibridación GW5/6	
Temperatura	Tiempo
95°C	10 min
49°C	infinito

6. Sin sacar la placa del termociclador, colocar 200 µL de cada una de las muestras en su chip correspondiente (previamente rotulado), y sellar los orificios de la parte posterior (por donde se mete la muestra) con etiquetas redondas.

7. Colocar los chips en el horno de hibridación a 50°C y 60 rpm durante 16-18 hrs.

Etapas 8: Lavado y tinción de chips

1. Preparar buffer de tinción

Reactivo	
Agua AccuGene	920 µL
SSPE 20X	414 µL
Tween 3%	4.5 µL
Solución Denhardt	27.5 µL
Total	1366 µL

2. Preparar solución de Anticuerpo y solución de Streptavidina-Ficoeritrina (SAPE)

Reactivo	
Buffer de tinción	594 µL
Ac anti Streptavidina	6 µL
Total	600 µL

Reactivo	
Buffer de tinción	594 µL
SAPE	6 µL
Total	600 µL

3. Preparar buffer holding array.

4. Encender PC y la estación de fluidos, colocar las soluciones de lavado A y B en sus posiciones a la mitad de sus reservorios, Realizar el PRIME 450.

5. Colocar las soluciones preparadas en las siguientes posiciones 1) SAPE, 2) Ac anti Streptavidina y 3) buffer holding array.

6. Sacar los chips del horno, extraer los 200 µL de muestra y regresarlos a la placa.

7. Agregar 270 µL de buffer holding array, no tapar los orificios de llenado y colocar los chips en la estación de fluidos.

8. Registrar el chip y escanear.

ANEXO 5

Purificación con isopropanol

1. Hacer un pool de 700 μ L con los productos de PCR (3 StyI y 4 NspI) en una placa de pozos profundos.
2. Agregar 12 μ L de EDTA 0.5M a cada pozo y mezclar de 5 a 10 veces con puntillas de 200 μ L.
3. Cubrir la placa e incubar 10 minutos a temperatura ambiente. Inspeccione la placa y asegurarse de que las muestras hayan pasado a un aspecto claro de un estado turbio. Si no, incubar 5 minutos.
4. Preparar master mix, 200 μ L de acetato de amonio 7.5 M y 700 μ L de isopropanol, para una sola muestra. Transferir 900 μ L del master mix a cada pool de productos de PCR y mezclar 5 veces con la misma puntilla.
5. Cubrir la placa y dejar a temperatura ambiente por 30 minutos. Encender la centrifuga y enfriar a 4°C.
6. Sellar la placa con una cubierta adhesiva. Centrifugar la placa a 2250 rcf por 30 minutos a 4°C. Nota: RCF no es lo mismo que RPM.
7. Remover el adhesivo de la placa y cuidadosamente descartar el sobrenadante por inversión sin afectar el pellet.
8. Colocar la placa hacia abajo en un papel absorbente por 2 minutos. No golpear la placa.
9. Lavar el pellet agregando 1.6 mL de etanol 75%. Pipetear directamente en el pellet para separarlo de la pared. Dejar la placa a temperatura ambiente por 2 minutos.
10. Sellar la placa con un adhesivo nuevo. Spin a las muestras a 2250 RCF por 5 minutos a 4°C.
11. Remover el adhesivo y cuidadosamente descartar el etanol por inversión de la placa sin afectar el pellet.
12. Colocar la placa hacia abajo en un papel absorbente (KimWipes) por 2 minutos. No golpear la placa. Asegurarse que no quede líquido en la placa.
13. Disolver el pellet con 55 μ L de buffer EB. Cuantificar.

ANEXO 6

Protocolo de preparación de muestra para microarreglos de metilación de DNA

Paso 1. Extracción de DNA

Paso 2. Digestión con *Mse I*

1. Digerir 6 μg de DNA genómico de alta calidad con 24U de *Mse I* y suplementar la reacción con 100 ng/ μL , dejar toda la noche (12-15h) a 37°C.
2. Para la reacción por calentamiento de las muestras a 65°C por 20 min.
3. Purificar las muestras utilizando el kit QIAquick PCR purification de Qiagen.
4. Cuantificar el DNA con espectrofotómetro.
5. Correr 300 ng de DNA digerido en gel de agarosa al 2% para verificar el tamaño del fragmento de 200-1000 pb.

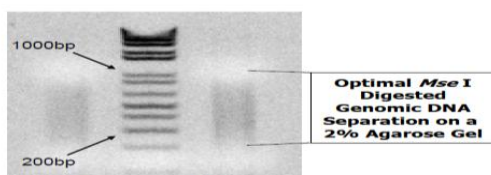


Figure 2. Example of Agarose Gel Electrophoresis for *Mse I* Digested Genomic DNA

Paso 3. Agregar el anticuerpo al DNA

Este procedimiento utiliza una proporción 1:1 de anticuerpo a DNA:

1. Diluir 1.25 μg de DNA digerido (del paso 2) a un volumen final de 300 μL en buffer TE (10Mm Tris HCl, pH7.5, 1mM de EDTA).
2. Desnaturalizar por calor durante 10 minutos a 95°C, y colocar inmediatamente en hielo por 5 min.
3. Remover 60 μL (200ng) y almacenar a -20°C para usar como DNA (Input) control.
4. A los 240 μL remanentes de DNA, agregar 60 μL de Buffer IP 5X.

Buffer IP 5X (almacenar a 4°C)	Volumen
Fosfato de sodio 100mM a pH7	50 ml
NaCl 5M	14ml
Tritón X-100 al 10%	2.5ml
Agua	33.5 ml
Total	100 ml

5. Agregar 1 μg de anticuerpo (monoclonal mouse anti 5-methyl citidine).

6. Incubar la mezcla DNA-Anticuerpo toda la noche en plataforma con rotación a 4°C. Girar a una velocidad lo suficientemente baja para evitar la formación de espuma.

Paso 4. Unión del DNA a las perlas: Mezcla de anticuerpo

1. Pre lavar 24 µL de perlas de agarosa proteína A.
 - a) Resuspender la botellas de perlas de agarosa por agitación.
 - b) Transferir 48 µL a un tubo de 1.5 ml y centrifugar a 6000 rpm por 2 min a 4°C. Remover el sobrenadante.
 - c) Agregar 600 µL de PBS-BSA al 0.1%(1ml de PBS+2 µL 50 mg/ml BSA).
 - d) Incubar 5 min en rotación a 4°C.
 - e) centrifugar a 6000 rpm por 2 min a 4°C. Cuidadosamente remover el sobrenadante. Sin afectar el pellet.
 - f) Repetir los pasos c-e
2. Resuspender las perlas en 24 µL de buffer IP 1X (Diluir el buffer IP 5X) para producir un 50% de liquido viscoso.
3. Agregar 48 µL de perlas (líquido viscoso 50%) a los 300 µL de la mezcla DNA-Anticuerpo.
4. Incubar en rotación por 2h a 4°C.

Paso 5. Lavado del DNA: Anticuerpo: Mezcla de perlas y agregar proteinasa K

1. Lavar las perlas 3 veces con buffer IP 1X:
 - a) Centrifugar la reacción del paso 3.4 a 6000 rpm por 2 min a 4°C.
 - b) Agregar 1 ml de buffer IP 1X.
 - c) Incubar 5 min a 4°C en rotación.
 - d) Centrifugar a 6000 rpm por 2 min a 4°C. Cuidadosamente remover el sobrenadante sin alterar el pellet.
 - e) Repetir los pasos b-d dos veces más.
2. Resuspender las perlas en 250 de buffer de digestión:

Buffer de digestión (almacenar a 4°C)	Volumen
Tris-HCl 1M a pH8	5 ml
0.5M EDTA	2ml
SDS 10%	5ml
Agua	88 ml
Total	100 ml

3. Agregar 7 μL de mix de proteinasa K (10mg/ml) a las perlas resuspendidas.
4. Incubar toda la noche a 55°C en rotación.

Paso 6. Purificación del DNA

1. Agregar 250 μL de fenol. Vórtex por 30 segundos y centrifugar a 14000 rpm por 5 min a temperatura ambiente. Las perlas formaran una capa entre el fenol y una capa acuosa. Remover el sobrenadante acuoso y transferir a un tubo de microcentrífuga.
2. Agregar 250 μL de cloroformo: alcohol isoamilico. Vórtex por 30 seg y centrifugar a 14000 rpm por 5 min a temperatura ambiente .Remover el sobrenadante acuoso y transferir a un tubo de microcentrífuga.
3. Agregar 1 μL de glicógeno y mezclar bien.
4. Agregar 20 μL de NaCl 5M y después 500 μL de etanol y mezclar bien.
5. Precipitar a -80°C por 30 minutos.
6. Centrifugar a 14000 rpm por 15 min a 4°C. Remover el sobrenadante cuidadosamente sin alterar el pellet.
7. Lavar el pellet con 500 μL de etanol al 70% frío.
8. Centrifugar a 14000 rpm por 15 min a 4°C. Remover el sobrenadante cuidadosamente sin alterar el pellet.
9. Secar las muestras completamente en el SpeedVac.
10. Resuspender en 30 μL de Tris-HCl (pH8.5)10mM. Medir la concentración de DNA. Esperando un rendimiento de 300-500 ng (10-15ng/ml).

Paso 7. Amplificación del DNA

Iniciar con 6 μg de DNA genómico requiere que el DNA IP y el DNA input sean amplificados antes de etiquetar e hibridar. Sin embargo, es posible escalar el experimento IP o realizar un pool con múltiples reacciones de IP para generar suficiente ADN para su uso conjunto sin más amplificación (utilizando los pasos anteriores), aunque será necesario utilizar más ADN genómico y anticuerpo.

1. Amplificar el DNA IP y el DNA input. Se utilizan 10 ng de DNA IP y de Input, respectivamente, para la amplificación con el kit WGA2. Seguir el protocolo del fabricante.

2. Purificar el ADN amplificado utilizando el Kit de Purificación de PCR Qiaquick de Qiagen de acuerdo con el protocolo del fabricante.
3. Almacenar todas las muestras a -20°C hasta que esté listo para su uso.

ANEXO 7

Purificación con kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN)

1. Agregar 5 volúmenes de buffer PB a 1 volumen de la reacción de PCR y mezclar.
2. Colocar una columna con su tubo colector.
3. Para la unión al DNA aplicar la muestra en la columna y centrifugar 30-60 s a 13000 rpm. Descartar el líquido y colocar la columna en el mismo tubo.
4. Para lavar, agregar 750 μL de buffer PE a la columna y centrifugar 30-60 s a 13000 rpm. Descartar el líquido y colocar la columna en el mismo tubo.
5. Centrifugar una vez más por 1 minuto para remover los residuos del buffer de lavado.
6. Colocar cada columna en un tubo limpio de 1.5 ml.
7. Para eluir el DNA, agregar 50 μL de buffer EB al centro de la membrana y centrifugar la columna por 1 min. Para incrementar la concentración de DNA, agregar 30 μL de buffer de elución al centro de la membrana, dejar en la columna por 1 min, y después centrifugar a 30-60 s a 13000 rpm.
8. Si el DNA purificado será analizado en gel, agregar 1 volumen de buffer de carga a 5 volúmenes de la muestra. Mezclar la solución por pipeteo antes de cargar el gel.

ANEXO 8

Amplificación con WGA2

Fragmentación

1. Preparar una solución de ADN de 1 ng / μL .
2. Añadir 1 μL de buffer de fragmentación 10X a 10 μl de ADN (1 ng / μL) de muestra en un tubo de PCR.

3. Coloque el tubo en un bloque térmico o en termociclador a 95 ° C durante exactamente 4 minutos. Tenga en cuenta que la incubación es muy sensible al tiempo. Cualquier desviación puede alterar los resultados.
4. Enfriar inmediatamente la muestra en hielo, centrifugar brevemente para consolidar el contenido.

Preparación de la librería

1. Añadir 2 µL de buffer de librería a cada muestra.
2. Añadir 1 µL de solución de Estabilización de librería. Vórtex y consolidar por centrifugación,
3. Colocar en el termociclador a 95 ° C durante 2 minutos.
4. Enfriar la muestra en hielo, consolidación la muestra por centrifugación, y volver al hielo.
5. Añadir 1 µL de la enzima de preparación de librería
6. Colocar la muestra en un termociclador e incubar como sigue:

16 ° C durante 20 minutos
24 ° C durante 20 minutos
37 ° C durante 20 minutos
75 ° C durante 5 minutos
4 ° C mantener

11. Retirar las muestras del termociclador y centrifugar brevemente. Las muestras pueden ser amplificadas inmediatamente o almacenado a -20 ° C durante tres días.

Amplificación

1. Preparar master mix mediante la adición de la siguientes reactivos a la reacción de 15 µL de paso 11:

7,5 µL de Master Mix de amplificación 10X
47,5 µL de agua, Reactivo de Biología Molecular
5 µL de WGA ADN polimerasa

2. Vórtex y centrifugar brevemente, y colocar en el termociclador con el siguiente programa;

1. Desnaturalización inicial 95 ° C durante 3 minutos
2. Realizar 14 ciclos de la siguiente manera:
3. Desnaturalizar 94 ° C durante 15 segundos
4. Extensión a 65 ° C durante 5 minutos
5. Después que los ciclos estén completos, mantener las reacciones a 4 ° C

3. Almacenar a -20 ° C hasta que estén listo para el análisis o purificación.

ANEXO 9

Condiciones de reacción análisis de RFLPs

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	1x	22.5X
Buffer	5X	1X	5 µL	112.5 µL
SHHF	10 µM	0.5 µM	1.25 µL	28.12 µL
SHHR	10 µM	0.5 µM	1.25 µL	28.12 µL
MgCl ₂	25 mM	1.5 mM	1.5 µL	33.75 µL
dNTPs	10 mM	0.3 mM	0.75 µL	16.875 µL
Taq polimerasa	5U/µL	0.025 U/µL	0.2 µL	4.5 µL
DNA	50 ng/ µL	250 ng	5 µL	-----
H ₂ O	-----	-----	10.05 µL	226.125 µL
Vol. Final			25 µL	562.5 µL

Master mix para PCR de SHH.

Pasos	T°	Tiempo	
1)	95°	5 min	
2)	94°	30 seg	
3)	56-60°	1 min	35 ciclos
4)	72°	1 min	
5)	72°	10 min	

Programa de termociclador para PCR de SHH.

Reactivo	Cantidad
DNA	1 µg
Buffer de corte	5 µL
Enzima BanII	1 µL
Agua°BM	A completar VF
Vol. Final	50 µL

Master mix para digestión con *Ban II*

ARTÍCULO ACEPTADO

Delineation of a de novo 7q21.3q31.1 Deletion by CGH-SNP Arrays in a Girl with Multiple Congenital Anomalies Including Severe Glaucoma

L. Martínez-Jacobo^a C. Córdova-Fletes^{a, b} R. Ortiz-López^{a, b} F. Rivas^c
C. Saucedo-Carrasco^d A. Rojas-Martínez^{a, b}

^aDepartamento de Bioquímica y Medicina Molecular, Facultad de Medicina, and ^bUnidad de Biología Molecular, Genómica y Secuenciación, Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, ^cHospital General de Occidente, Secretaría de Salud Jalisco, Guadalajara, and ^dConsultorio particular, Pediatría, ■■■, Mexico

© S. Karger AG, Basel
**PROOF Copy
for personal
use only**
ANY DISTRIBUTION OF THIS
ARTICLE WITHOUT WRITTEN
CONSENT FROM S. KARGER
AG, BASEL IS A VIOLATION
OF THE COPYRIGHT.

Key Words

Array-CGH · Candidate genes · Delineation del(7q) · Ectrodactyly region

Abstract

In this study, we present a female patient with a constitutional de novo deletion in 7q21.3q31.1 as determined by G-banding and CGH-SNP arrays. She exhibited, among other features, psychomotor retardation, congenital severe bilateral glaucoma, a cleft palate, and heart defect. Microarray assay disclosed a deleted 12.5-Mb region roughly 88 kb downstream the ectrodactyly critical region; thus, the patient's final karyotype was 46,XX,arr 7q21.3q31.1(96,742,140–109,246,085)×1 dn. This girl represents the fourth patient described so far with congenital glaucoma and a deletion encompassing or overlapping the 7q21.3q31.1 region, and confirms the presence of a locus or loci related to such a clinical feature. According to our results, the proneness to ocular defects secondary to 7q intermediate deletions could be caused by co-deletion of *TAC1*, *HBP1*, and a small cluster of cytochrome P450 genes (subfamily 3A). This conclusion is supported by their functional roles and expression locations

as well as because *TAC1* is related to the functional pathway of the *MYOC* gene whose mutations are linked to glaucoma. Moreover, given that this girl is clinically reminiscent of several phenotypes related to diverse deletions within 7q21q32, our results and observations offer a general overview of the gene content of deletions/phenotypes overlapping 7q21.3q31.1 and confirm that loci distal to *DLX* genes including the *CUX1* gene and potential regulatory elements downstream from *DLX5* are unrelated to ectrodactyly.

© 2013 S. Karger AG, Basel

Introduction

Constitutional 7q deletions are rather common but heterogeneous. Altogether, these deletions encompass the whole 7q (DECIPHER database) and usually are classified in proximal (q11→21), intermediate (q21→31/32) and terminal (q32→qter) [Gibson et al., 1982; Young et al., 1984; Cheong et al., 2008].

L.M.-J. and C.C.-F. contributed equally to this work.

KARGER

© 2013 S. Karger AG, Basel
1661–8769/13/0000–0000\$38.00/0

E-Mail karger@karger.com
www.karger.com/msy

Augusto Rojas-Martínez, PhD
Unidad de Biología Molecular, Genómica y Secuenciación
Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey 64460 (Mexico)
E-Mail arojasmtz@gmail.com

Diverse deletions within the 7q21q32 segment have often been associated with ectrodactyly and multiple clinical features, such as intellectual disability/developmental delay, ear/hearing anomalies, low birth weight, feeding problems, unusual cry, microcephaly, micrognathia, cardiac and palate defects, recurrent infections, abnormal palmar creases, and eye abnormalities [Young et al., 1984; Rivera et al., 1991; Scherer et al., 1994; Montgomery et al., 2000; Bernardini et al., 2008; Cheong et al., 2008; van Silfhout et al., 2009]. This phenotypic consistency along with the apparent overlapping of the deleted regions may indeed represent a recognizable deletion syndrome [Fagan et al., 1989]. Here, we report on a girl with a 7q21.3q31.1 deletion and congenital severe glaucoma (but not ectrodactyly) in order to refine the mapping of and provide further insights on ocular phenotypes related to intermediate (q21→31/32) deletions.

Patient Description

The patient, a 1-year-old girl, is the second child of healthy non-consanguineous parents. The family history was unremarkable. Foetal growth retardation, short femur and calcification of the placenta were detected in the third trimester; she was born by caesarean section at 35 weeks of gestation due to increased foetal risk. Birth weight was 2,300 g (<3rd percentile), length was 43 cm (<3rd percentile) and the only Apgar score referred to was 8. Congenital glaucoma was detected and treated by trabeculectomy in 2 different interventions. The patient still remains with elevated intraocular pressure. Brain magnetic resonance imaging revealed increased subarachnoid space, altered myelination process and bilateral optic nerve oedema. At the age of 7 months, her weight was 4,300 g (between 10 and 25th percentile) and length 57.3 cm (<3rd percentile). She presented with big eyes, blue sclerae, wide fontanelles, prominent eyebrows, low-set ears with overfolded helix, upslanting palpebral fissures, apparent telecanthus, bulbous nasal tip, hypoplastic nasal alae, short columella, apparently increased distance between nasal base and midline upper lip vermilion border, thin lips, marked Cupid's bow, cleft soft palate, micrognathia, bilateral single palmar crease, and bilateral fifth finger clinodactyly (fig. 1A). In addition, she had foramen ovale, patent ductus arteriosus and tricuspid regurgitation. At 12 months, she is still unable to control her head. Her reaction to auditory stimuli is poor, but she follows light stimuli. She has not developed any teeth, has a weak cry, and her weight, length and OFC were 5,500 g (<3rd percentile), 67.5 cm (<3rd percentile) and 42 cm (<3 percentile), respectively. An ophthalmological evaluation described bilateral primary congenital glaucoma characterised by buphthalmos, elevated intraocular pressure, thin and bluish anterior sclera, and corneal oedema with corneal opacification. Uveal structures, including iris, were apparently normal, although iris implantation could not be defined. Currently, she is recovering from episodes of recurrent respiratory infection.

Material and Methods

Chromosomal Analysis

Initial cytogenetic analyses of the patient and her parents were made on GTG-banded metaphase chromosomes obtained from 72 h lymphocyte cultures. Further blood samples from the patient and her parents, taken under informed consent, were used to perform the molecular studies.

Array CGH

Initially, genomic DNA from the patient and her parents was obtained from 3 ml of peripheral blood with the Qiagen Gentra® Puregene Blood core Kit. Medium-density microarray analysis was performed using the Agilent SurePrint G3 Hmn CGH+SNP 4x180K Microarray Kit (contains ~120,000 CGH probes and 60,000 SNP probes with median spacing of 25 kb). Briefly, genomic DNA (~1 mg) from the patient and her parents and from sex-matched controls was digested by *AluI* and *RsaI* restriction enzymes (Promega, Madison, Wisc., USA) for 2 h at 37°C. The digested products were labelled with Cy3-dUTP and Cy5-dUTP fluorochromes using the Sure tag DNA Labelling Kit (Agilent Technologies). The labelled products were purified, hybridised and washed according to Agilent protocols. Each slide was scanned on a Nimblegen MS 200 scanner (Roche), and the resulting images were converted by image conversion software and imaged by Feature Extraction software (Agilent technologies). Results were analysed using default analysis method – CGH+SNP v2 with the ADM-2 aberration algorithm by Agilent CytoGenomics software v.2.5.

Results

The patient's G-banded karyotype was 46,XX,del(7)(q22q22)dn; parental karyotypes were normal. The corresponding microarray assay disclosed a deleted 12.5-Mb region (genomic position 96,742,140–109,246,085), embracing 500 markers and 229 genes (including miRNAs and hypothetical proteins) with *ACN9* being the more proximal and *C7orf66* the more distal (GRCh37/hg19); thus, there was a partial monosomy for 7q21.3q31.1 (fig. 1B). This deletion overlaps with the ectrodactyly original critical region [Scherer et al., 1994], but did not include *DLX5* and *DLX6* genes, the major candidates for such clinical feature. No other remarkable genomic change was observed. Microarray results from the parents were normal. The patient's final karyotype was 46,XX,arr 7q21.3q31.1(96,742,140–109,246,085)×1 dn.

Discussion

In this study, the fourth patient described so far with congenital glaucoma related to a constitutional *de novo* deletion involving or overlapping the 7q21.3q31.1 region

Fig. 1. A Craniofacial, hand and mouth features of the patient. **B** Loss profile analysis indicated by log 2 ratio (plotting and line) visualisation from Agilent CytoGenomics software v.2.5. **C** Diagram (not to scale) denoting cases with or without an ocular abnormality and carriers of a 7q deletion overlapping 7q21.3q31.1. Most of all these chromosomal aberrations were not molecularly refined, so we are making an approximation from breakpoints originally assigned (i.e. we have placed the breakpoints in proximal or distal endings of bands, but not of subbands). Cases below 'present case' correspond to DECIPHER's cases with a major overlapping to the present deletion. Vertical blue lines indicate the potential minimum region for ocular abnormalities; both the first blue line (left) and the dotted line delimit the regions of overlap with our case. Grey lines delimit some sub-regions of overlapping. * This case reported neither ocular anomalies, nor ectrodactyly (the original breakpoints were 7q21q31). ** Imprecise breakpoints (no ectrodactyly). ? = Unknown ocular involvement, since the foetus was not autopsied. **D** UCSC browser screenshot containing all imbalance cases reported by DECIPHER and ISCA overlapping the 7q21.3q31.1 region (red = deletions, blue = amplifications). Two ISCA deletions (IDs nssv578163 and nssv582318) seem to span the region 7q21.3q31.1 completely, but actually they correspond to chromosome 7 monosomies.

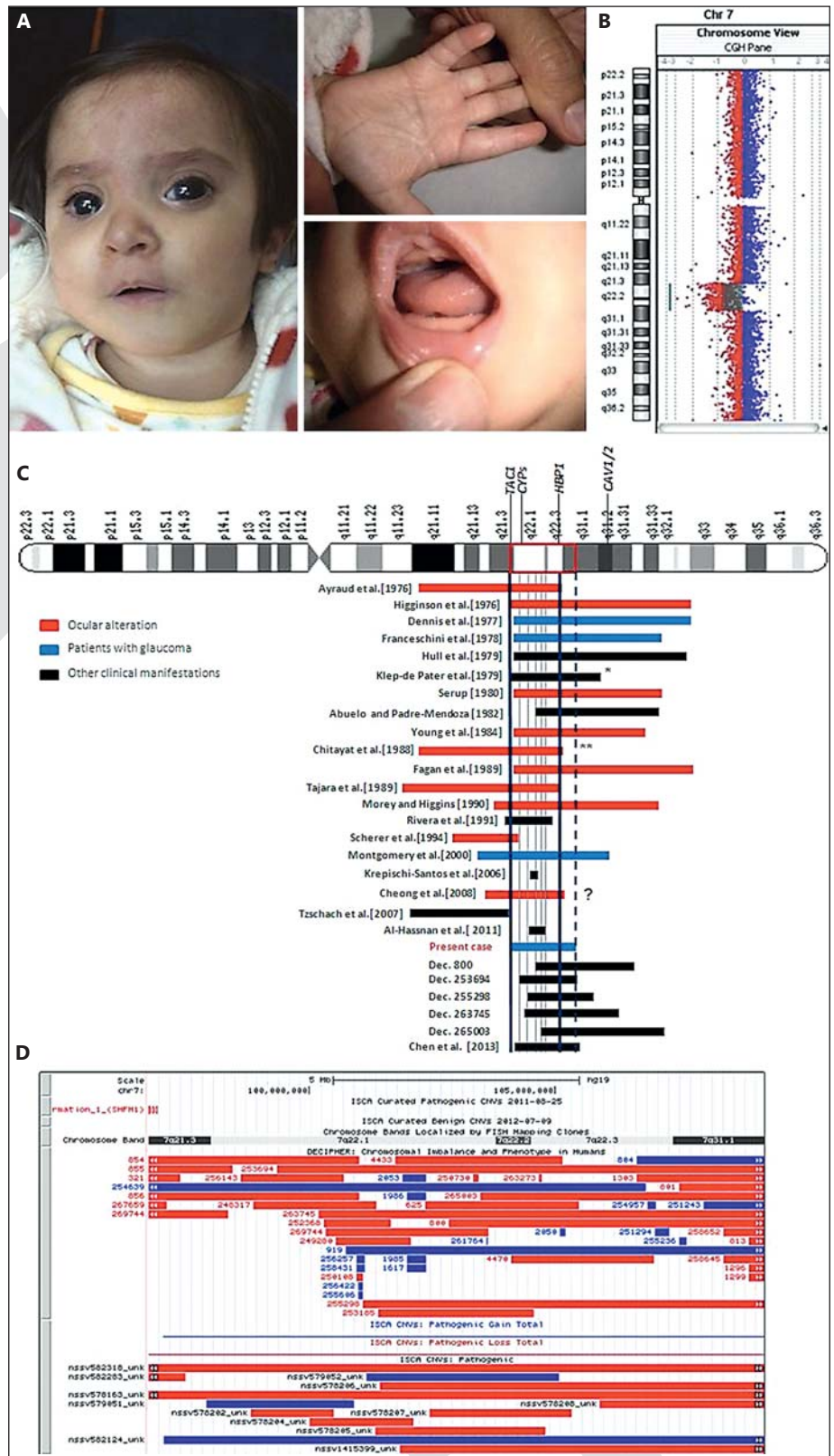


Table 1. Clinical features from deletion cases reported within 7q21q32 but with an apparent major overlapping to the 7q21.3q31.1 region

Clinical features	Cases/references																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15*	16	17	present case	
General																			
Low birth weight	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	
ID/DD	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+ ^a	+	+	+?	+ ^b	+	+	+	
Growth retardation/short stature	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	
Speech delay	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?	+	
Hypotonia	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	
Abnormal EEG/seizures	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
Recurrent infections	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
Head/periorbital																			
Broad/prominent forehead	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
Microcephaly	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	
Upward slant	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	
Epicanthic folds	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	
Prominent eyebrows	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
Hypertelorism/telecanthus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	apparently	
Ears/hearing																			
Low set	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	
Malformations	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	
Deafness/hearing loss	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	apparently	
Nose																			
Flat/broad nasal bridge	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
Bulbous nasal tip	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	
Eye anomalies																			
	+	+	G	-	-	+	-	+	+	+	G	+	+	G	?	?	-	G	
Mouth																			
Large	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	
Thin upper lip	-	-	-	+	-	-	-	+	-	?	?	-	?	-	-	-	-	+	
Long philtrum	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	apparently	
Cleft/high/narrow palate	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	
Micrognathia	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	
Feeding problems	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	mild ^c	
Neck																			
Short	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
Extremities/hands																			
Fifth finger clinodactyly	-	+	-	-	-	-	mild	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
Splithand/splitfoot	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	
Abnormal palmar creases	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	
Cardiovascular																			
ASD/VSD	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	
PDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
Pulmonar stenosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	
Other	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+ ^e	
Gastrointestinal																			
Hernia	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
Urogenital																			
Genital abnormalities	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	

¹ Ayraud et al. [1976]; ² Higginson et al. [1976]; ³ Dennis et al. [1977]; ⁴ Hull et al. [1979]; ⁵ Klep-de Pater et al. [1979]; ⁶ Serup [1980]; ⁷ Abuelo and Padre-Mendoza [1982]; ⁸ Young et al. [1984]; ⁹ Chitayat et al. [1988]; ¹⁰ Fagan et al. [1989]; ¹¹ Franceschini et al. [1978]; ¹² Tajara et al. [1989]; ¹³ Morey and Higgins [1990]; ¹⁴ Montgomery et al. [2000]; ¹⁵ Cheong et al. [2008]; ¹⁶ ID 253694; ¹⁷ ID 255298.

ID/DD = Intellectual disability/developmental delay; NA = not available; G = glaucoma; ? = unknown/imprecise.

* Foetus delivered at 22 weeks and not available for further evaluations.

^a Suggested by us (early death). ^b Suggested by authors (early death). ^c Initially poor suck. ^d This patient presented pre-axial polydactyly in the hands.

After this review, a very similar deletion to our case was described in a 24-week-old foetus who presented a cleft lip and palate, hypertelorism, a broad nasal bridge, micrognathia, low-set ears, a micropenis and cryptorchidism [Chen et al., 2013]. In this table, features presented in >30% of cases are: ID/DD (~18/18), eye anomalies (12/18), low birth weight (10/18), ear malformations (10/18), heart defects (9/18), large mouth (9/18), feeding problems (9/18), low-set ears (8/18), growth retardation/short stature (8/18), hypotonia (6/18), microcephaly (6/18), micrognathia (6/18), abnormal palmar creases (6/18), and genital anomalies (6/18). The feature 'weak cry' or 'unusual cry' was not included in the present table, but it was present in ~5 patients including the present one.

(fig. 1C; table 1) is presented. Our results suggest that co-deletion of at least 3 eye-related loci (*TAC1*, *CYP3A43* and *HBP1*) mapped in this region could account for glaucoma and other ocular abnormalities.

Glaucoma, a clinically and genetically heterogeneous condition, is characterised by loss of retinal ganglion cells and atrophy of the optic nerve [Izzotti et al., 2011; Mookherjee et al., 2012]. The major clinical criterion of increased intraocular pressure usually results from resistance of the trabecular meshwork to the aqueous humour [Kennedy et al., 2012]. The trabecular meshwork is located around the base of the cornea and plays an important role in regulating the aqueous humour outflow [Izzotti et al., 2011]. Alterations in trabecular meshwork have frequently been found in patients with congenital glaucoma. Congenital glaucoma, cloudy cornea, primary open-angle glaucoma, and juvenile open-angle glaucoma are some of the subtypes of glaucoma and have been related to diverse loci such as *GLC1A* or *MYOC* (1q24.3), *CYP1B1* (2p22.2), and *CAVI/CAV2* (7q31.2) [Stoilov et al., 1997; Alward et al., 1998; Thorleifsson et al., 2010; Kennedy et al., 2012; Mookherjee et al., 2012].

The *CYP1B1* gene has been linked to primary congenital glaucoma with cytochrome-P450-dependent metabolites regulating corneal transparency and aqueous humour secretion (OMIM 231300). Furthermore, *CYP1B1* was downregulated and *CYP26B1* upregulated in human trabecular meshwork cells with a mutated *MYOC* gene [Kennedy et al., 2012]. These facts suggest that other genes of the cytochrome P450s family could be related as well. Actually, a small cluster of cytochrome P450 genes at 7q22.1 (*CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP3A7*, and *CYP3A43*) was deleted in our patient; in fact, most of the deletions in 7q associated with glaucoma or other ocular abnormalities such as cloudy corneas, macrocornea or abnormal pupils involved q22 and likely, *CYPs* genes [Young et al., 1984; Montgomery et al., 2000]. Remarkably, *CYP3A43* was found differentially expressed in human cornea epithelium tissue [Turner et al., 2007]. In general, members of the subfamily 3A were found expressed in human iris, ciliary body and cornea [Zhang et al., 2008; Volotinen et al., 2011]. Another candidate gene for glaucoma appears to be *TAC1*, also deleted in our patient, which has recently been suggested as a possible physiological biomarker for glaucomatous injury. The *TAC1* gene was related to the functional pathway of the *MYOC* gene, which is a glycoprotein induced by stress conditions in trabecular meshwork. Actually, *TAC1* expression was also strongly altered in *MYOC* mutant cells [Kennedy et al., 2012]. The *TAC1* gene (7q21.3) encodes for precursors of hormones that act

as neurotransmitters (UCSC genome browser) and has been identified as a mechanosensible gene in the human trabecular meshwork [Kennedy et al., 2012].

Another gene also deleted in this patient, namely *HBP1*, is a transcriptional repressor that participates in the WNT pathway and is expressed in retina, cornea and ciliary bodies (EMBL-EBI and GeneCards databases). The WNT pathway has been associated to intraocular pressure regulation [Kennedy et al., 2012]. Coincidentally, the *HBP1* (high mobility group box transcription factor) gene is alike to *HMGB1* (high-mobility group box 1 protein) that is known to be an endogenous molecule for signalling of retinal damage and inflammatory stress [Lee et al., 2012].

Although most cases with ocular defects and deletions within or overlapping the 7q21.3q31.1 region were reported before methods for a precise genetic delineation were available, it seems feasible that in at least 9 patients with glaucoma or other ocular abnormalities [Ayraud et al., 1976; Dennis et al., 1977; Franceschini et al., 1978; Serup, 1980; Young et al., 1984; Fagan et al., 1989; Tajara et al., 1989; Morey et al., 1990; Montgomery et al., 2000], the respective deletions involved all the above-mentioned genes (fig. 1C). A further detailed review in DECIPHER and ISCA showed that among ~39 deletions of or overlapping the 7q21.3q31.1 region (fig. 1D), none exhibited the breakpoints here defined or included all 3 genes here proposed. The most similar 7q deletion, molecularly defined (98,423,469–111,872,943), was very recently reported by Chen et al. [2013], but it did not include *TAC1* and neither ocular abnormalities were reported in the foetus. The non-deleted status of *CAVI/CAV2* loci in our patient is consistent with the lack of ocular abnormalities seen in 8 patients with *CAVI/CAV2* hemizygoty. Accordingly, it is tempting to speculate that the proneness to ocular defects inherent to 7q intermediate deletions could largely be caused by co-deletion of the critical genes proposed here. It is worth noting, however, that practically all of the imbalances were related to intellectual disability/developmental delay and multiple sub-regions overlapped (fig. 1C, D; table 1).

In spite of the wide phenotypical spectrum of 7q21q32 deletions, several recurrent clinical features have been observed (table 1). According to the information gathered in table 1, at least 14 features had a frequency >30% in those patients (table 1). For instance, the child in this study described exhibited at least 11 of these features, including intellectual disability/developmental delay, growth retardation, and craniofacial, heart and eye defects. Additionally, breakpoints analysis revealed that the proximal break-

Table 2. Deleted genes in 7q21.3q31.1 potentially related to some frequent clinical features seen in other similar deletion cases

Related to	Gene/protein	References
Brain/ID/DD	<i>ACHE, ATXNL7, BHLHA15, COG5, GPC2, MLL5*, NPTX2, NRCAM, PNPLA8, RELN, SRPK2, SYPL1, TAC1, THAP5, TMEM130, VGF, NYAPI^a</i>	UCSC genome browser; Al-Hassnan et al. [2011]; Rymen et al. [2012]; DECIPHER ID 263273; Vincent et al. [2008]; Uliana et al. [2010]
Craniofacial alterations	<i>MLL5*, PLOD3**, RELN</i>	Al-Hassnan et al. [2011]; Salo et al. [2008]
Deafness/hearing loss	<i>GJC3, LHFPL3, MLL5*, PLOD3**, SLC26A4, SLC26A5</i>	UCSC genome browser; ID 263273; Salo et al. [2008]; Albert et al. [2006]
Ocular abnormalities	<i>CLDN15, CYP3A4, CYP3A43, CYP3A5, CYP3A7, HBP1, NRCAM, TAC1, TMEM130</i>	EMBL-EBI; Volotinen et al. [2011]; Lee et al. [2012]; Demyanenko et al. [2011]; Kennedy et al. [2012]
Heart/cardiac defects	<i>MOSPD3, NPTX2, PNPLA8, SRPK2, THAP5</i>	UCSC genome browser; Pall et al. [2004]
Gastrointestinal alterations/ growth retardation/short stature	<i>CLDN15, MUC3A, MUCB, MUC17, MOGAT3</i>	UCSC genome browser; Wada et al. [2013]

These associations were performed according to the gene functions and expression locations, gene/phenotype overlap with other cases, or previous association. Note that some genes may be linked to more than one clinical feature. Actually, some monogenic lesions were seemingly responsible for various clinical features (e.g. *MLL5** or *PLD3***).

^a Deleted in an ISCA microdeletion case (ID nsv578204).

point of the present deletion lies just 88 kb downstream of the *DLX5* gene. Because haploinsufficiency for *DLX5* and *DLX6* genes appears to be responsible for ectrodactyly [Scherer et al., 1994; van Silfhout et al., 2009], our observation indirectly confirms the exclusion of the *CUX1* gene (as suggested by Bernardini et al. [2008]) and potential regulatory elements (as suggested by Tzschach et al. [2007]) downstream of *DLX5* and *ACN9* (between RP11-800O14 and D7S618) in determining such a limb defect.

Overall, our findings confirm that 7q21.3q31.1 is a gene-rich region crucial for brain, heart, growth, and eye physiology/development (table 2), offer a general over-

view of the gene content of deletions/phenotypes overlapping 7q21.3q31.1, and further strengthen that loci distal to *DLX* genes are unrelated to ectrodactyly.

Acknowledgements

We would like to thank the patient's parents for their continuous co-operation and the report of Dr. Jose A. Paczka (ophthalmologist). This work was partially supported by PROMEP (No. 103.5/11/4330) and PAICYT (SA609-10) to C. Córdova-Fletes, and PAICYT (No. SA324-10) and FOMIX (convocatoria M0014-2007-2010, Reg. 068251) to CIDICS. L. Martínez-Jacobo is supported by a CONACYT scholarship.

References

- Abuelo DN, Padre-Mendoza T: Cat-like cry and mental retardation owing to 7q interstitial deletion (7q22 leads to 7q32). *J Med Genet* 19: 473–476 (1982).
- Albert S, Blons H, Jonard L, Feldmann D, Chauvin P, et al: *SLC26A4* gene is frequently involved in nonsyndromic hearing impairment with enlarged vestibular aqueduct in Caucasian populations. *Eur J Human Genet* 14:773–779 (2006).
- Al-Hassnan ZN, Al-Bakheet A, Abu-Dheim N, Al-Younes B, Colak D, Kaya N: A novel interstitial microdeletion of 7q22.1–7q22.3 detected by array comparative genomic hybridization. *Am J Med Genet* 155:3128–3131 (2011).
- Alward W, Fingert J, Coote M, Johnson A, Lerner S, et al: Clinical features associated with mutations in the chromosome 1 open-angle glaucoma gene (*GLC1A*). *N Engl J Med* 338:1022–1027 (1998).
- Ayraud N, Rovinski J, Lambert JC, Galiana A: Interstitial deletion of the long arm of chromosome 7 in a female child with leprechaunism [French]. *Ann Genet* 19:265–268 (1976).
- Bernardini L, Palka C, Ceccarini C, Capalbo A, Bottillo I, et al: Complex rearrangement of chromosomes 7q21.13–q22.1 confirms the ectrodactyly-deafness locus and suggests new candidate genes. *Am J Med Genet A* 146A:238–244 (2008).

- Chen CP, Chang SJ, Chern SR, Wu PS, Chen YT, et al: Prenatal diagnosis and molecular cytogenetic characterization of a de novo interstitial deletion of 7q (7q22.1→q31.1). *Gene* 521: 311–315 (2013).
- Cheong MLJ, Tsai MS, Cortes R, Harrison MR: Intermediate interstitial deletion of chromosome 7q detected by first-trimester Down's syndrome screening. *Fetal Diagn Ther* 24: 340–344 (2008).
- Chitayat D, McGillivray BC, Wood S, Kalousek DK, Langlois S, Applegarth DA: Interstitial 7q deletion [46,XX,del(7)(pter→q21.1::q22→qter)] and the location of genes for beta-glucuronidase and cystic fibrosis. *Am J Med Genet* 31:655–661 (1988).
- Demyanenko G, Riday T, Tran TS, Dalal J, Darnell EP, et al: *NrCAM* deletion causes topographic mistargeting of thalamocortical axons to the visual cortex and disrupts visual acuity. *J Neurosci* 31:1545–1558 (2011).
- Dennis NR, Neu RL, Bannerman RM: A partial 7q monosomy in an infant with multiple anomalies. *Am J Hum Genet* 29:37A (1977).
- Fagan K, Gill A, Henry R, Wilkinson I, Carey B: A summary of 7q interstitial deletions and exclusion mapping of the gene for beta-glucuronidase. *J Med Genet* 26:619–625 (1989).
- Franceschini P, Silengo MC, Davi GF, Santoro MA, Prandi G, Fabris C: Interstitial deletion of the long arm of chromosome 7 46,XX,del(7)(pter leads to q2200:q3200 leads to qter). *Hum Genet* 44:345–348 (1978).
- Gibson J, Ellis PM, Forsyth JS: Interstitial deletion of chromosome 7: a case report and review of the literature. *Clin Genet* 22:256–265 (1982).
- Higginson G, Weaver DD, Magenis RE, Prescott GH, Haag C, Hepburn DJ: Interstitial deletion of the long arm of chromosome no. 7 (7q-) in an infant with multiple anomalies. *Clin Genet* 10:307–312 (1976).
- Hull DR, Kessler KK, Juberg RC: 7q interstitial deletion resulting in failure to thrive and peculiar cry: comparison with previously reported 7q1 and 7q2 deletions. *Am J Hum Genet* 31:97A (1979).
- Izzotti A, Longobardi M, Cartiglia C, Saccà SC: Mitochondrial damage in the trabecular meshwork occurs only in primary open-angle glaucoma and in pseudoexfoliative glaucoma. *PLoS One* 6:e14567 (2011).
- Kennedy KD, Anithachristy SA, Buie LK, Borrás T: Cystatin A, a potential common link for mutant myocilin causative glaucoma. *PLoS One* 7:e36301 (2012).
- Klep-de Pater JM, Bijlsma JB, Bleeker-Wagemakers EM, de France HF, de Vries-Ekkers CMAM: Two cases with different deletions of the long arm of chromosome 7. *J Med Genet* 16:151–154 (1979).
- Lee J, Hsiao C, Yang I, Chou MH, Wu CL, et al: High-mobility group box 1 protein is implicated in advanced glycation end products-induced vascular endothelial growth factor A production in the rat retinal ganglion cell line RGC-5. *Mol Vis* 18:838–850 (2012).
- Montgomery TL, Wyllie J, Oley C: Ectrodactyly and glaucoma associated with a 7q21.2–q31.2 interstitial deletion. *Clin Dysmorphol* 9:235–239 (2000).
- Mookherjee S, Acharya M, Banerjee D, Bhattacharjee A, Ray K: Molecular basis for involvement of *CYP1B1* in *MYOC* upregulation and its potential implication in glaucoma pathogenesis. *PLoS One* 7:e45077 (2012).
- Morey MA, Higgins RR: Ectro-amelia syndrome associated with an interstitial deletion of 7q. *Am J Med Genet* 35:95–99 (1990).
- Pall GS, Wallis J, Axton R, Brownstein DG, Gautier P, et al: A novel transmembrane MSP-containing protein that plays a role in right ventricle development. *Genomics* 84:1051–1059 (2004).
- Rivera H, Sanchez-Corona J, Burgos-Fuentes VR, Melendez-Ruiz MJ: Deletion of 7q22 and ectrodactyly. *Genet Couns* 2:27–31 (1991).
- Rymen D, Keldermans L, Race V, Régal L, Deconinck N, et al: COG5-CDG: expanding the clinical spectrum. *Orphanet J Rare Dis* 7:94 (2012).
- Salo AM, Cox H, Farndon P, Moss C, Grindulis H, et al: A connective tissue disorder caused by mutations of the lysyl hydroxylase 3 gene. *Am J Hum Genet* 83:495–503 (2008).
- Scherer S, Poorkaj P, Allen T, Kim J, Geshuri D, et al: Fine mapping of the autosomal dominant split hand/split foot locus on chromosome 7, band q21.3–q22.1. *Am J Hum Genet* 55:12–20 (1994).
- Serup L: Interstitial deletion of the long arm of chromosome 7. *Hum Genet* 54:19–23 (1980).
- Stoilov I, Akarsu N, Sarfarazi M: Identification of three different truncating mutations in cytochrome P4501B1 (*CYP1B1*) as the principal cause of primary congenital glaucoma (Buphthalmos) in families linked to the *GLC3A* locus on chromosome 2p21. *Hum Mol Gen* 6: 641–647 (1997).
- Tajara EH, Varella-Garcia M, Gusson AC: Interstitial long arm deletion of chromosome 7 and ectrodactyly. *Am J Med Genet* 32:192–194 (1989).
- Thorleifsson G, Walters GB, Hewitt AW, Masson G, Helgason A, et al: Common variants near *CAV1* and *CAV2* are associated with primary open-angle glaucoma. *Nat Genet* 42:906–909 (2010).
- Turner H, Budak M, Akinci M, Wolosin JM: Comparative analysis of human conjunctival and corneal epithelial gene expression with oligonucleotide microarrays. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:2050–2061 (2007).
- Tzschach A, Menzel C, Erdogan F, Schubert M, Hoeltzenbein M, et al: Characterization of a 16 Mb interstitial chromosome 7q21 deletion by tiling path array CGH. *Am J Med Genet A* 143:333–337 (2007).
- Uliana V, Grosso S, Cioni M, Ariani F, Papa FT, et al: 3.2 Mb microdeletion in chromosome 7 bands q22.2–q22.3 associated with overgrowth and delayed bone age. *Eur J Med Genet* 53:168–170 (2010).
- van Silfhout AT, van den Akker PC, Dijkhuizen T, Verheij J, Olderoode-Berends M, et al: Split hand/foot malformation due to chromosome 7q aberrations (*SHFM1*): additional support for functional haploinsufficiency as the causative mechanism. *Eur J Hum Genet* 17:1432–1438 (2009).
- Vincent JB, Choufani S, Horike S, Stachowiak B, Li M, et al: A translocation t(6;7)(p11-p12;q22) associated with autism and mental retardation: localization and identification of candidate genes at the breakpoints. *Psychiatr Genet* 18:101–109 (2008).
- Volotinen M, Hakkola J, Pelkonen O, Vapaatalo H, Mäenpää J: Metabolism of ophthalmic timolol: new aspects of an old drug. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 108:297–303 (2011).
- Wada M, Tamura A, Takahashi N, Tsukita S: Loss of claudins 2 and 15 from mice causes defects in paracellular Na (+) flow and nutrient transport in gut and leads to death from malnutrition. *Gastroenterology pii:S0016-5085* (2012).
- Young RS, Weaver DD, Kukolich MK, Heerema NA, Palmer CG, et al: Terminal and interstitial deletions of the long arm of chromosome 7: a review with five new cases. *Am J Med Genet* 17:437–450 (1984).
- Zhang T, Xiang C, Gale D, Carreiro S, Wu E, Zhang EY: Drug transporter and cytochrome P450 mRNA expression in human ocular barriers: implications for ocular drug disposition. *Drug Metab Dispos* 36:1300–1307 (2008).