

Microarreglos. Los puentes en el abismo del conocimiento del retraso mental diagnosticado en la infancia (RM)

Dr. Horacio Márquez-González *, Dr. Horacio Márquez-Flores **, Dra. Leyla Camarrillo-Blancarte ***, Dra. Ana Mariel Morales-Aguirre ****, Dra. Cleotilde Muñoz-Ramírez *****, Dra. Ana Carolina Sepúlveda-Vildósola *****

RESUMEN

El retraso mental (RM), es una afección frecuente en la edad pediátrica. Puede ser de origen genético o ambiental. En el primer caso, no se han podido establecer todos los desórdenes que la condicionan y un número considerable de pacientes no tiene un diagnóstico específico.

Los microarreglos, derivan de la hibridación genómica comparada (CGH), donde puede determinarse sitios de deleciones, inserciones o traslocaciones.

Mediante esta técnica se han podido determinar afecciones cromosómicas que conforman síndromes que no habían sido descritos, como: deleción 17q21.31, deleción 15q24 o deleción 1q21.

Su aplicación puede realizarse en grandes poblaciones o puede individualizarse. La introducción de esta técnica ha comenzado a resolver las dudas del RMI monogénico o poligénico.

Palabras clave: Retraso mental, microarreglos, hibridación fluorescente in situ (FISH), deleción 17q21.31, deleción 15q24, deleción 1q21.

ABSTRACT

Mental retardation (MR), is a common neurological condition in children. Its etiology may be genetic or environmental. In the first case, all the disorders that cause it have not been identified and a considerable number of patients do not have an accurate diagnosis. Microarrays are derived from comparative genomic hybridization (CGH), which can determine sites of deletions, insertions or translocations.

This technique has made it possible to determine chromosomal syndromes not previously described such as: 17q21.31 deletion, deletion 15q24 or 1q21 deletion.

It can be done in large populations or be individualized. The introduction of this technique has begun to resolve doubts regarding monogenic or polygenic RMI.

Key words: Mental retardation, microarrays, fluorescence in situ hybridization (FISH), 17q21.31 deletion, deletion 15q24, 1q21 deletion.

* Hospitalización. Hospital de Pediatría. CMN Siglo XXI

** Áreas Críticas. Sanatorio Español de la Laguna

*** Genética. Hospital de Pediatría. CMN Siglo XXI

**** Cirugía. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"

***** Terapia Intensiva Pediátrica. Instituto Nacional de Pediatría

***** Educación. Hospital de Pediatría. CMN Siglo XXI

Correspondencia: Dr. Horacio Márquez-González. Av. Cuahutemoc No. 271. Col. Roma Norte. Del. Cuahutemoc, México 06700 D.F. Correo electrónico: horaciomarquez84@hotmail.com

Recibido: septiembre, 2012

Aceptado: julio, 2013

Este artículo debe citarse como: Márquez-González H, Márquez-Flores H, Camarrillo-Blancarte L, Morales-Aguirre AM, et al. Microarreglos. Los puentes en el abismo del conocimiento del retraso mental diagnosticado en la infancia (RM). Acta Pediatr Mex 2013;34:275-279.

El retraso mental detectado en la edad pediátrica es una afección cuya frecuencia en Estados Unidos es de América de 2 a 3% de la población general. En México los informes de esta entidad nosológica sólo se publican en el Censo de Población y Vivienda, donde se incluye información relacionada por medio de un cuestionario y hasta 2010 se informó discapacidad mental en 5.1% de la población total, es decir, 5 millones 739 mil 270 mexicanos¹.

La American Association on Mental Retardation, publicó en 1992 los siguientes criterios diagnósticos para la definición de retraso mental:²

- Individuos con función mental por debajo del promedio, y coeficiente intelectual (*intelligence quotient IQ*) por debajo de 70 puntos.

- Dos o más limitaciones en las siguientes áreas: comunicación, cuidado personal, tareas del hogar, relaciones sociales, reglas de la comunidad, auto-dirección, salud y seguridad, académica y laboral.
- Que ocurra antes de los 18 años de edad.

Las causas del RM se dividen en dos grandes grupos:
³ las genéticas, enfermedades monogénicas y desórdenes genómicos; las ambientales, intoxicaciones, infecciones, etcétera (Figura 1).

El entendimiento de las enfermedades genéticas se ha revolucionado en las últimas décadas con las nuevas técnicas promovidas por el proyecto del genoma humano. El objetivo de esta revisión es el aporte que ofrecen los microarreglos a las enfermedades mentales.

HISTORIA

Posterior a la era Mendeliana, cuando se pensaba que las enfermedades se heredaban por transmisión vertical, horizontal o por cromosomas sexuales, surgió una etapa de 1900 a 1970 en la que la idea básica era que “un gen producía una enfermedad”. Así empezaron a describirse enfermedades como los errores innatos del metabolismo y otras debidas a la ausencia o presencia de material extra, como la trisomía 21.

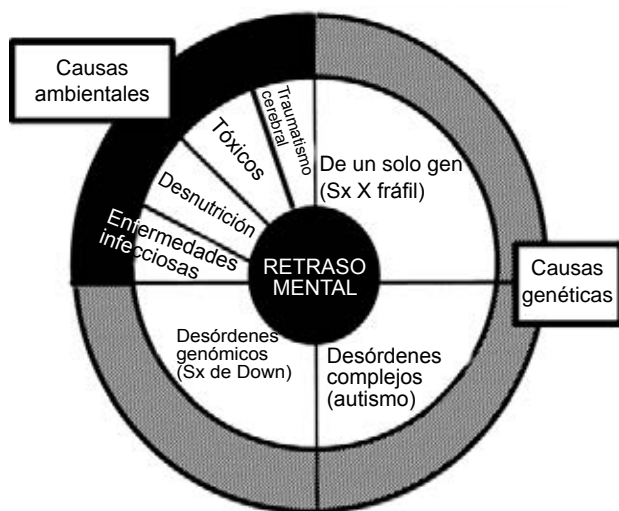


Figura 1. Causas de retraso mental (RM) y sus principales representantes. Las causas genéticas se dividen en dos rubros: las de un solo gen como el síndrome de X frágil; los desórdenes complejos como el autismo y los genómicos como el síndrome de Down. Las ambientales se dividen como se señalan en la figura.

A partir de 1970, la técnica basada en la tinción Giemsa de bandas de los cromosomas en metafase, ofrece una resolución de 450 a 850 bandas, lo que representa poca información si se considera que el cromosoma 1 cuenta con 1,312 genes *versus* los 144 genes del cromosoma 21; entonces un cambio en tres pares de bases puede equivaler a 1.2% de un cromosoma contra el 6.5% del otro.

En 1980, la prueba de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) utilizaba grandes cantidades de DNA en cromosomas bacterianos artificiales (*bacterial artificial chromosomes, BAC*), y lograba detectar deleciones, translocaciones, inversiones y cromosomas en anillo, cromosomas en metafase y núcleos en interfase por medio de fluorescencia, teniendo como limitación alrededor de 0.2 a 0.5 megabases.

En 2004 y 2005 se introdujeron nuevas técnicas que no sólo detectan la presencia de la alteración, sino que fueron capaces de cuantificar y documentar su comportamiento. Tal es el caso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite hacer una estimación cuantitativa y cualitativa de los números de copias de ácido desoxirribonucleico genómico (gDNA) y complementario (cDNA).

Y finalmente, la base de los microarreglos: la hibridación genómica comparada (CGH), en donde la pérdida o ganancia de material genético se detecta en cada uno de los cromosomas de los individuos en enfermos, haciendo de manera simultánea una comparación entre lo no alterado o sano, con una resolución aproximada de 10 megabases.

GENERALIDADES DE LOS MICROARREGLOS. ⁴

Inicialmente para el proyecto del genoma humano se utilizaron los Arreglos de Matriz. La técnica consistía en inmovilizar material genético en una superficie preparada e hibridarlo con material marcado para su detección.

Posteriormente la técnica se perfeccionó y surgieron los microarreglos, gracias a que la compañía *Affymetrix*, desarrolló técnicas fitolitográficas con muestras de ADN de alta densidad que contienen aproximadamente 20,000 a 30,000 genes, lo cual permite la revisión de un genoma completo en poco tiempo.

La información que otorga este tipo de estudios puede ser de dos tipos:

- Microarreglos de genes de expresión.
- Microarreglos genómicos.

En los primeros se obtiene el nivel absoluto de hasta miles de transcritos de ácido ribonucleico (ARN) de una sola muestra. En los genómicos, proporciona información sobre el número de copias del ADN genómico. Estos chips permiten evaluar fácilmente los cambios físicos del ADN cromosómico en las muestras de individuos blanco comparados con un testigo.

Existen diversos tipos de sondas para la obtención del material genético a estudiar: sondas que detectan cambios en la expresión génica; sondas que detectan deleciones o inserciones; y aquellas que detectan mutaciones.

La técnica consiste en marcar una cadena de DNA del paciente en el extremo 3' y la del control (sonda BAC) en el 5', teñidas en colores verde y rojo; ambas se hibridan a determinada temperatura y es así como recibe el nombre de "genómica comparada"; finalmente se detiene el proceso con la enzima Cot1.

Los principales arreglos aplicados son: ⁵

- Arreglos con productos de PCR: La hibridación con los BAC tienen una longitud aproximada de 80 a 200 kilobases (kb), por lo que la detección es limitada cuando se trata de menos de 50kb; una estrategia es la utilización de la PCR para amplificar exponencialmente el tamaño de la sonda. La desventaja principal radica en que la muestra se prepara en un portaobjetos de vidrio y es difícil detectar más de 60,000 oligonucleótidos en este material, por lo que la resolución y la pureza de la muestra pueden verse limitadas.
- Arreglos con oligonucleótidos (ROMA): Se construyen mecánicamente con oligonucleótidos y se puede observar un máximo de 60,000 oligonucleótidos. Por lo general se emplean portaobjetos de vidrio, ya que la cobertura de tales arreglos se limita a una sonda por cada 50 kb. En esta técnica, el ADN genómico se digiere con una enzima de restricción y los fragmentos se ligan a los adaptadores para después amplificarlos por medio de PCR, específicamente los fragmentos más pequeños de restricción. La más comercialmente usada es NimbleGen
- Arreglos de genotipificación, obtenidos a partir de los polimorfismos de un sólo nucleótido (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) obtenidos del proyecto mundial Hap Map. Los arreglos contienen más de 400,000 secuencias en un área no mayor

de una pulgada cuadrada donde se pueden explorar hasta 13,000 genes de manera simultánea. La más utilizada es *Affimetrix*, que consiste en una fitolito-grafía, aunque también existen *Ilumina* y *Alligent*.

La observación se realiza bajo luz fluorescente con láseres de diferente longitud de onda. De esta forma es posible conocer la concentración de algunas de las secuencias y la relación de concentraciones entre dos muestras y este procedimiento puede llevarse a cabo con miles de genes al mismo tiempo.

MICROARREGLOS Y RETRASO MENTAL

Anteriormente las causas inexplicables de retraso mental representaban para el clínico un verdadero desafío, y las técnicas genéticas hasta entonces empleadas ofrecían poca ayuda a los pacientes y sus familiares, limitando así el asesoramiento genético. Sin embargo, con la introducción del FISH se pudieron detectar anomalías subteloméricas hasta en el 5% de los pacientes con RM y alguna malformación.

Con los microarreglos se detectan estas anomalías al menos en 10% de los pacientes con RM sin malformaciones. Por eso el uso de los microarreglos de DNA con SNPs tiene la capacidad de detectar alguna alteración hasta en 97% de las causas de RM y detectar alrededor de 10% de las mutaciones de novo en estos pacientes. La mayor ventaja consiste en que puede realizarse a los padres y a sus hijos con el fin de saber si la entidad se transmite de manera generacional. ⁶

La utilidad más tangible de los microarreglos, es la detección de lo que ahora se conoce como desórdenes genómicos, que son un grupo de entidades causadas por "microdeleciones y microduplicaciones".

El primer síndrome descrito fue el síndrome de deleción 17q21.31, se describió en tres pacientes utilizando la PCR en su variedad MLPA (*multiple ligation-dependent probe amplification*) y los microarreglos de genotipificación; se encontró la deleción en el cromosoma 17. Sus características clínicas son hipotonía, cara alargada, epicanto, pabellones auriculares largos y prominentes, nariz en forma tubular o de pera con una punta bulbosa, columela larga con narinas hipoplásicas. Se asocia frecuentemente a malformaciones cardíacas y renales, así como epilepsia.

La microdeleción del 15q24 se describió por primera vez por la misma técnica durante un *screening* genético en 1,200 pacientes. Esta microdeleción se encontró en

14 pacientes, por medio de microarreglos por oligonucleótidos y FISH, ⁷ que coincidieron con las siguientes malformaciones: retraso en el crecimiento, microcefalia, alteraciones digitales, anomalías genitales, hipospadias, cejas prominentes, paladar elevado y *filtrum* plano. Posteriormente este se observó también en un estudio de cohorte de 9,000 pacientes con retraso mental y retraso en el crecimiento, así como en dos pacientes más. ⁸

La delección del 1q21.1 se identificó inicialmente por microarreglos de fenotipificación en 52 individuos durante un *screening* de 21,000 con MR inexplicable y autismo. El fenotipo de estos pacientes incluye: microcefalia, anomalías cardíacas y se asoció al desarrollo de esquizofrenia. La microduplicación del 1q21.1 se encontró en pacientes con alteraciones en el comportamiento, especialmente en autismo.

La utilidad de estas delecciones no son únicamente aplicables en las causas inexplicables de RM, sino también en los síndromes ya conocidos como el síndrome CHARGE, integrado por: coloboma, malformaciones cardíacas (H), atresia de coanas, retraso mental o del crecimiento (R), anomalías genitales y alteraciones en pabellones auriculares (E), cuya prevalencia es de 1 en 10,000. Por medio de microarreglos por BAC se encontraron microdelecciones en dos pacientes en la región 8q12.

APLICACIÓN EN LA PRÁCTICA MÉDICA

Los microarreglos pueden utilizarse en poblaciones extensas o en un solo paciente, según las necesidades del estudio.

Por ejemplo, Cooper y colaboradores, ⁹ compararon los CNV's por microarreglos en 15,767 niños con alteraciones intelectuales (incluido autismo y epilepsia) y defectos congénitos, con 8,329 controles de adultos; encontraron una discrepancia de más de 400 kbp, con una diferencia estadísticamente significativa. Esta brecha confirió un riesgo de más de 20 veces de probabilidad de asociarse con retraso mental.

Un buen ejemplo de la aplicación individualizada de los microarreglos fue el publicado por Aswini S ¹⁰ y colaboradores, quienes estudiaron el caso de una niña de tres años sin antecedentes de consanguinidad y perinatales de importancia, que al nacer mostraba diversas alteraciones: fontanela anterior amplia, hipertelorismo, implantación baja de pabellones auriculares y clinodactilia.

Se le realizó tomografía computarizada (TC) que reveló atrofia cerebral. No se documentaron alteraciones en las hormonas tiroideas. A la paciente se le realizó un estudio citogenético que mostró alteraciones morfológicas en el cromosoma 19. Posteriormente mediante FISH se encontró material extra en el cromosoma 7 y finalmente por medio de microarreglos de *Affymetrix* se encontró aumento en el número de copias (trisomía parcial del cromosoma 7) de 24490 kb en el brazo corto, que involucraba a las bandas 7p15.3-pter. Además, se detectó un aparente mosaico para una ganancia de 3,500 kb en Xq21.1.

Cuoco y colaboradores, ¹¹ describieron una mecánica semejante en dos hermanos; el primero nació a las 36 semanas de gestación con peso adecuado para la edad gestacional, sin asfixia perinatal, con crecimiento aparentemente normal hasta los ocho años, cuando presentó crisis convulsivas tónicas y estrabismo. Una resonancia magnética nuclear mostró ectopia cerebelar en el foramen oval.

Su hermano menor nació de 36 semanas con peso bajo para la edad y perímetro cefálico en percentil 10; su desarrollo se vio alterado en la esfera del lenguaje. En ambos se solicitaron estudios para descartar síndrome de X frágil; fueron negativos. Posteriormente se procedió al estudio citogenético de ambos hermanos y de los padres; fueron negativos. Se realizó FISH con búsqueda específica para la delección 3p, que fue positiva. Se complementó el estudio con microarreglos de genotipificación y se halló delección en el 3p26.3.

La delección del 3p25 es una afección infrecuente, habitualmente de novo, caracterizada por bajo peso al nacer y alteraciones craneofaciales. Encontrar la delección en el brazo corto puede justificar que las alteraciones en estos hermanos no se manifiesten con marcado retraso mental.

El estudio personalizado de los microarreglos se recomienda para: ¹²

- Múltiples anomalías que no sugieran un síndrome genético específico.
- Autismo.
- Paciente con retraso en el crecimiento, del lenguaje después de realizar otras técnicas como el FISH.

Sin embargo, los resultados siempre deben interpretarse con reserva, ya que no todos los elementos que conforman la técnica de microarreglos, como toda prueba diagnóstica, están sujetas a errores de sobre y subestimación. Tucker ¹³ y colaboradores observaron este fenómeno en una cohorte de 30 niños con RM; cuyos padres no estaban afectados, a

quienes se les tomó muestra sérica y se realizó es estudio de microarreglos con tres técnicas de SNP's: *Affymetrix*, *Agilent* y *NimbleGen*. El objetivo fue determinar la congruencia entre estas tres pruebas; se encontró: de un total de 3,747 microarreglos que se realizaron, entre las tres pruebas, la congruencia en el diagrama de Venn de todas fue de 3.37%; mientras que en las mutaciones de novo fue del 5% y en el síndrome de X frágil de 1.5%. En general, sólo el 22% de las mutaciones se detectó por más de una prueba. Esto demuestra que existen falsos positivos sobre cada una de las plataformas y apoya la necesidad de validar los resultados clínicamente importantes, con una tecnología diferente.

CONCLUSIONES

La revisión anterior permite obtener las siguientes ideas:

- Hasta antes de la nueva era de la genética, muchas enfermedades asociadas con retraso mental se encuadraban en un espectro de la enfermedad "idiopático" o "multifactorial"; el asesoramiento genético era limitado y la posibilidad de clasificar las características clínicas en un síndrome era complicado.
- Los microarreglos ofrecen una manera novedosa de abordar el RM, detectando puntualmente las mutaciones y el efecto que éste tiene sobre otros genes. Complementa la información otorgada por otras pruebas genéticas.
- Ofrece la posibilidad de abordar al paciente con RM de manera personalizada, lo cual es de gran valor sobre todo en el asesoramiento genético.
- Favorece la clasificación e identificación de nuevas enfermedades.
- Como prueba, los resultados que ofrecen no son absolutos, pero sí esclarecen las carencias en el conocimiento de las enfermedades y obligan al clínico a pensar en forma distinta en relación a ellas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Márquez-Caraveo ME, Zanabria-Salcedo M, Pérez-Barrón V, Aguirre-García E, Arciniega-Buenrostro L, Galván-García CS. Epidemiología y manejo integral de la discapacidad intelectual. *Salud Mental*. 2011;34:443-9.
2. American Association on Mental Retardation. 1992. *Mental Retardation: Definition, Classification, and Systems of Supports*. Washington, DC: American Association on Mental Retardation.
3. Mao R, Pevsner J. Mental retardation and developmental disabilities. *Res Rev*. 2005;11:279-85.
4. Benítez Bribiesca L. Los microarreglos de DNA y su aplicación clínica. *Acta Méd Grupo Ángeles*. 2004;2(2):125-7.
5. Nebert DW, Zhang GS, Vesell E. From Human Genetics and Genomics to Pharmacogenetics and Pharmacogenomics: Past Lessons, Future Directions. *Drug Metab Rev*. 2008;40(2):187-224.
6. Lisenka EL, Vissers M, de Vries BBA, Veltman JA. Genomic microarrays in mental retardation: from copy number variation to gene, from research to diagnosis. *J Med Genet*. 2010;47:289e97.
7. Magoulas PL, El-Hattab W. Chromosome 15q24 microdeletion syndrome. *Orphanet J Rare Dis*. 2012;7:2-9.
8. El-Hattab AW, Smolarek TA, Walker ME, Schorry EK, Immken LL, Patel G, et al. Redefined genomic architecture in 15q24 directed by patient deletion/duplication breakpoint mapping. *Hum Genet*. 2009;126:589e602.
9. Cooper GM, Coe BP, Girirajan S, Rosenfeld JA, Vu TH, Baker C. A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat Genet*. 2011;43(9):838-46.
10. Aswini S, Venkata OP, Saranya G, Durgadatta T, Raseswari T, Kanakavalli M, Kulashekar. De novo 7p partial trisomy characterized by subtelomeric FISH and whole-genome array in a girl with mental retardation. *Mol Cytogen*. 2011;21:2-10.
11. Cuoco C, Ronchetto P, Gimelli S, Béna F, Divizia T, Lerone M, et al. Microarray based analysis of an inherited terminal 3p26.3 deletion, containing only the CHL1 gene from a normal father to his two affected children. *Orphanet J Rare Dis*. 2011;6:12- .
12. Manning M, Hudgins L. Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. *Genet Med*. 2010;12(11):742-5.
13. Tucker T, Montpetit A, Chai D, Chan S, Chénier S, Coe BP. Comparison of genome-wide array genomic hybridization platforms for the detection of copy number variants in idiopathic mental retardation. *BMC Med Gen*. 2011;4(25):1-10.