

CH 1

**ESTUDIO DE RADIOSENSIBILIDAD
EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON
INMUNODEFICIENCIA PRIMARIA**

Fernández Rearte J.¹, M.M. Deminge¹, A. Radll¹, M. Cabitto¹, P. Carabajal², A. Gómez Raccio², D. Di Giovanni², S. Rotondo², M. Di Giorgio¹. ¹Laboratorio de Dosimetría Biológica de la Autoridad Regulatoria Nuclear, Argentina; ²Servicio de Inmunología del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, Argentina.
jrearte@arn.gob.ar

La radiosensibilidad individual (RS) es una característica inherente al sujeto asociada con una reacción aumentada a radiaciones ionizantes (RI), influenciada por susceptibilidad genética. Las inmunodeficiencias primarias (IDP) son enfermedades genéticas con defectos en el desarrollo, función y/o regulación de uno o más componentes del sistema inmune. Un grupo de IDP se caracteriza por presentar defectos en los sistemas de reparación del ADN con aumentada RS. El ensayo de micronúcleos (MN) con bloqueo de la citocinesis (CBMN) y el ensayo de cometa permitirían evaluar dicha RS. Se describen dos casos clínicos de pacientes pediátricos con IDP: 1) Niña de un año con enfermedad inflamatoria intestinal, inmunodeficiencia combinada sin variantes patogénicas en panel de biología molecular para IDP. Evaluada en 2018 mediante CBMN; 2) Niña de 9 años, antecedente de infecciones respiratorias recurrentes y síndrome de HiperIgM, que puede asociar alteraciones en la reparación del ADN. Evaluada en 2012 mediante ensayo de cometa. En 2018 con síndrome de PI3K α activado se repite estudio de RS mediante CBMN. La frecuencia de MN muestra valores compatibles con RS normal. Los estudios de RS realizados en 2012 y 2018 evidenciaron hipersensibilidad a las RI. Estos resultados permitirían la aplicabilidad de los ensayos predictivos para la evaluación de pacientes con sospecha/diagnóstico de IDP que puedan requerir procedimientos radiantes o drogas radiomiméticas para las complicaciones (autoinmunidad, inflamación, malignidad) o el trasplante de precursores hematopoyéticos.

CH 2

**DIAGNÓSTICO PRENATAL DE TRISOMÍA
PARCIAL, MONOSOMIA PARCIAL
Y DELECIÓN INTERSTICIAL POR
CITOGENÉTICA Y MICROARRAY**

Marsa S.¹, M.C. Della Vedova^{1,2}, S. Siewert¹, N.F. Barrasa^{1,2}, R. Bravo¹, D. Lozada¹, P. Igarreta². ¹Maternidad Provincial Dra. Teresita Baigorria, San Luis, Argentina; ²Galos, Argentina.
smarsa@gmail.com

Se realizó un diagnóstico prenatal. Por ecografía se observó: onfalocele, mano en garra, pie bot, cabeza en fresa, en una gestación de una paciente de 19 años. Se realizó el cariotipo fetal a partir de líquido amniótico donde se halló la siguiente aberración cromosómica estructural 46,XX,der(11)t(3,11)(q22.2,q24.3). Se observaron dos cromosomas 3 normales, un cromosoma 11 normal y un derivado del cromosoma 11 con la traslocación, generando una trisomía parcial del 3q (3q22.2->3qter) y una monosomía parcial del 11q (11q24.3->11qter). Se realizó cariotipo a ambos padres los cuales fueron normales. Se realizó Microarray con la plataforma Agilent 180K CGH + SNP a partir de una muestra de líquido amniótico que dio como resultado arr[GRCh37]3q22.2q29(134701427_197771082)x3,10q25.1q25.2(107936097_113596588)x1,11q25(130850244_134928849)x1. Se encontró una trisomía de 63,07 Mb desde la región 3q22.2 hasta 3q29, una monosomía de 4,08 Mb desde 11q25 hasta la región terminal que concuerda con el resultado del cariotipo fetal pero además se encontró una monosomía de 5,66 Mb desde 10q25.1 hasta 10q25.2. Se concluye que el resultado del microarrays detectó la translocación diagnosticada en el cariotipo fetal con el hallazgo de una microdelección del cromosoma 10, con lo cual se confirma que la técnica de microarray prenatal es mucho más informativa debido a su mayor resolución.

INESTABILIDAD MITÓTICA DE UN IDIC(Y) EN UNA PACIENTE CON SÍNDROME DE TURNER

Dávila S., M. Antinori², E. Tronchinsky³, N. Aguirre³, W. Montes³, B. Warszatska³, M. Pérez³, A. Espinoza¹, P. Pividori², M. Figueredo¹, S. Rozental³. ¹Hospital de Alta Complejidad "Pte. Juan Domingo Perón", Formosa, Argentina; ²Hospital de la Madre y el Niño, Formosa, Argentina; ³Centro Nacional de Genética Médica, Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS) "Dr. Carlos G. Malbrán", Buenos Aires, Argentina. sole_davila@hotmail.com

Los isodicéntricos (idic) constituyen la anomalía estructural más frecuente del cromosoma Y. Debido a su inestabilidad, pueden perderse o sufrir rearrreglos durante la división y generar diferentes líneas celulares. Se asocian a un espectro variable de anomalías fenotípicas incluyendo hombres infértiles, mujeres con Síndrome de Turner (ST) y pacientes con genitales ambiguos; dependiendo del punto de ruptura y de la proporción de la línea 45,X en diferentes tejidos, incluyendo gónadas. El objetivo fue presentar la caracterización clínica y citogenética de un mosaicismo dinámico que involucra a un idic(Y). Se trata de una paciente de 14 años que consulta por ausencia de caracteres sexuales secundarios y fenotipo compatible con ST. El estudio citogenético en sangre periférica con técnicas estándar, GTW, CBG y FISH con sondas α satélite y subteloméricas para cromosomas X e Y, reveló un cariotipo 45,X[34]/46,X,idic(Y)(q11.23)[34]/46~48,X,der(Y)x2,r(Y)[32]. Los cariotipos parentales fueron normales. El estudio citogenético permitió confirmar el diagnóstico y brindar asesoramiento genético respecto al riesgo para gonadoblastoma. El mecanismo de formación del mosaico estaría relacionado a eventos postcigóticos que involucran ruptura en Yq, recombinación somática y no disyunción. Nuestro trabajo aporta una evidencia del valor del trabajo en red y referencial entre los laboratorios de citogenética del sistema de salud pública del país.

ANÁLISIS CITOGENÉTICO Y ASINCRONÍA DE REPLICACIÓN EN PACIENTES CON DELECCIÓN 6 EN MIELOMA MÚLTIPLE

Stella F.^{1,2}, E. Pedrazzini^{1,3,4}, I. Slavutsky¹. ¹Laboratorio de Genética de Neoplasias Linfoides, Instituto de Medicina Experimental, CONICET-Academia Nacional de Medicina, Argentina; ²Universidad Nacional de Morón, Argentina; ³UNNOBA, Argentina; ⁴UNLP, Argentina. estelapq@yahoo.com.ar

El Mieloma Múltiple es una neoplasia de células B maduras. El cromosoma 6 es uno de los más involucrados en rearrreglos estructurales, principalmente deleciones de brazo largo (del6q). La asincronía de replicación (AR) mide inestabilidad por pérdida temporal del control de la replicación. En este trabajo se analizaron las características citogenéticas y la AR por FISH a nivel de los genes *RB1* y *TP53* en pacientes con del6q. Los resultados se compararon con casos con cariotipo normal y FISH patológico (NA) y con casos con cariotipo normal y sin alteraciones por FISH (NN). Se analizaron muestras de médula ósea de 74 pacientes: 36 con del6q, 22 NA y 16 NN. Los niveles de AR resultaron concordantes dentro de cada grupo, en tanto que la comparación entre grupos mostró diferencias entre los 3 para ambos genes, siendo significativa la diferencia entre del6q y NN para *RB1* ($p < 0,015$). El análisis de los parámetros clínicos mostró que los pacientes con del6q presentaban niveles significativamente aumentados de β_2 microglobulina ($p < 0,004$) y creatinina ($p < 0,04$) respecto del grupo NN, así como mayor proporción de casos con cadena liviana kappa, infiltración de células plasmáticas en médula y lesiones líticas ($p < 0,0025$; $p < 0,0004$ y $p < 0,04$, respectivamente). Los pacientes con del6q y cariotipo complejo evidenciaron una menor supervivencia (28,4 meses) respecto del grupo NN (123,7 meses) ($p < 0,0025$). Nuestros datos evidencian que la del6q se asocia con factores de pronóstico adversos y mayor inestabilidad genómica, indicando la importancia de estos análisis en pacientes con Mieloma Múltiple.

CH 5

SÍNDROME DE ANEUPLOIDÍA EN MOSAICO VARIEGADA: COMUNICACIÓN DE DOS CASOS

Taniguchi L, J.M. Daroqui, C. Romero, V. Huckstadt², A. Moresco², M.G. Obregón², E. Baialardo¹. ¹Laboratorio de Citogenética, Servicio de Genética, Hospital de Pediatría "Garrahan", CABA, Argentina; ²Área Clínica, Servicio de Genética, Hospital de Pediatría "Garrahan", CABA, Argentina. taniguchilaura@gmail.com

El Síndrome de Aneuploidía en Mosaico Variegada (AMV) es un desorden autosómico recesivo raro caracterizado por la presencia de aneuploidías constitucionales variadas en mosaico, causada por mutaciones bialélicas de los genes BUB1B (AMV tipo 1), CEP57 (AMV tipo 2) y TRIP13 (AMV tipo 3). La expresión anormal de los genes BUB1B y TRIP13 afecta el punto de control del ensamblaje del huso mitótico, mientras que la expresión anormal del gen CEP57 afecta la unión de los cromosomas al huso mitótico, produciendo una mayor tasa de error en la segregación de cromosomas durante la división celular. Describimos dos pacientes cuyos hallazgos citogenéticos y clínicos son compatibles con AMV tipo 1 y tipo 2. La primera paciente consultó a los 11 meses de edad por microcefalia, dismorfias, retraso madurativo, hipotonía, malformación de fosa posterior tipo Dandy-Walker y tumor de Wilms unilateral. La segunda paciente fue evaluada a los 12 años de edad por baja estatura, dismorfias, Ductus Arterioso Permeable y enfermedad pulmonar crónica. En ambos casos el análisis citogenético reveló aneuploidías en mosaico que involucran diferentes cromosomas. Estos resultados orientan al diagnóstico de AMV siendo la clínica de la primera paciente compatible con AMV tipo 1 y la de la segunda con AMV tipo 2. Hasta el momento no se ha podido realizar el estudio molecular de los genes involucrados.

CH 6

CARACTERIZACIÓN CLÍNICA, CITOGENÉTICA Y MOLECULAR DE UN PACIENTE CON ATAXIA TELANGIECTASIA (AT)

Boywitt A, F. Villegas², G. Cafruni¹, B. Casali¹, R. De Bellis¹, M.D.C. Fernández², R. Armando², C. Arberas², G. Del Rey¹. ¹Laboratorio de Citogenética, Centro de Investigaciones Endocrinológicas-CEDIE "Dr. César Bergadá"-CONICET-FEI. División de Endocrinología, Hospital de Niños "Dr. R. Gutiérrez", Buenos Aires, Argentina; ²Sección de Genética Médica, Hospital de Niños "Dr. R. Gutiérrez", Buenos Aires, Argentina. boywitta77@yahoo.com.ar

La AT (OMIM#208900) es un síndrome de Inestabilidad Cromosómica (IC) que asocia inmunodeficiencia combinada grave con ataxia progresiva, telangiectasias, susceptibilidad a infecciones y cáncer e hipersensibilidad a radiaciones ionizantes. Es una entidad autosómica recesiva causada por más de 500 mutaciones del gen ATM (ataxia-telangiectasi mutated, 11q22.3) que codifica una proteína involucrada en la reparación de la doble cadena del ADN en fase G2 del ciclo celular. Prevalencia 1:100000 RN. Se presenta un niño con sospecha clínica de AT confirmada por estudios de laboratorio, citogenéticos y análisis molecular. A la consulta, edad 3 años, derivado por retraso global del desarrollo y trastorno en la marcha con inestabilidad desde 1,3 años. Infecciones a repetición. Telangiectasias en escleróticas, mejillas y pabellón auricular. Sialorrea. Marcha atáxica a predominio troncal, movimientos de lateralización cefálica, compromiso del lenguaje. Laboratorio: AFP elevada. Evaluación inmunológica: inmunoglobulinas bajas y linfopenia. Estudio cromosómico en cultivos de 48 h para análisis de anomalías espontáneas y de 72 h expuestos a RX e inducidos por mutágeno. Cariotipo: 46,XY con presencia de gaps, roturas y reordenamientos cromosómicos de los cromosomas 7, 14, 1, 13. El análisis molecular detectó dos variantes patogénicas de ATM. Se concluye que una detallada evaluación clínica y estudios citogenéticos específicos para IC resultan eficaces para el diagnóstico temprano de pacientes con AT. El análisis molecular confirma el diagnóstico permitiendo un adecuado asesoramiento familiar.

TRISOMÍA DEL CROMOSOMA 14: REPORTE DE CASO

Aguilar S.¹, S. Rodríguez¹, N. Monjagata¹, S. Fernández¹, G. Meza¹.
¹Laboratorio de Citogenética, Departamento de Genética, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción, IICS/UNA, San Lorenzo, Paraguay.
 saraaguilar011@gmail.com

Los estudios de no disyunción demuestran que el cromosoma 14 extra se origina tanto de los errores en la meiosis secundaria de los parentales como de los errores que se dan en una mitosis temprana. La trisomía 14 se observa en embriones y fetos espontáneamente abortados, por lo que es compatible con la vida si se encuentra en forma de mosaico como este caso. Para la realización del presente estudio se tuvieron en cuenta las consideraciones éticas de confidencialidad. Así se reporta el caso de un recién nacido de sexo masculino, cuya muestra fue remitida al Laboratorio de Citogenética, del Departamento de Genética del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Asunción. El paciente nació con muy bajo peso, 1,320 gramos, edad gestacional por capurro de 33,5 semanas. Presentó apnea, además de complicaciones como cardiopatía congénita, tetralogía de Fallot, displasia renal izquierda, fosisa pilonidal, onfalocele, depresión neonatal, por lo que requirió ingreso a la Unidad de Cuidados Intensivos. Se solicitó estudio cromosómico, el cual se realizó en sangre periférica, encontrándose en el 28% (14/50) de las metafases analizadas trisomía del cromosoma 14 en mosaico. El cariotipo resultante fue un mosaico, $mos47,XY,+14[14]/46,XY[36]$. Los estudios de cariotipo tienen especial importancia en este tipo de casos, ya que orientan al médico para un diagnóstico preciso y un posterior consejo genético a los padres.

TNFAIP3 (A20) HAPLOINSUFFICIENCY IN A GIRL WITH NEW AUTO-INFLAMMATORY DISEASE

Casali B.¹, F. Villegas², R. Armando², M. Fernández², A. Boywitt¹, R. De Bellis¹, G. Del Rey¹, I. Bergadá¹, R. Rey¹, M.G. Ropelato¹, C. Arberas².
¹Centro de Investigaciones Endocrinológicas "Dr. César Bergadá" (CEDIE) CONICET- FEI- División de Endocrinología, Hospital de Niños "R. Gutiérrez", Buenos Aires, Argentina; ²Sección de Genética, Hospital de Niños "R. Gutiérrez", Buenos Aires, Argentina.
 bcasali@cedie.org.ar

Recently new auto-inflammatory disease caused by heterozygous mutations with loss of function in TNFAIP3 gene, encode A20 protein, resulting in the activation of NF- κ B pathway has been described. We report a 15 year old girl with co-deletion 1q43/6q23.2q24 associated to intellectual disability, short stature and juvenile idiopathic arthritis (JIA) with difficult management. The structural variants (SVs) were identified using aCGH. First evaluation showed short stature, facial dimorphisms (small palpebral fissures, ptosis, dimorphism ears, wide nasal bridge, thick lips, small chin, short and wide neck) intellectual disability (ID), and juvenile idiopathic arthritis with difficult management. CGH microarray analysis was performed using the platform SurePrint G3 Unrestricted CGH (8x60K), Agilent. aCGH reveals two SVs, one corresponding to a deletion of 2.7 Mb in 1q43 harboring 38 genes, two of which CHRM3 and FMN2 genes are involved in the developing of Central Nervous System and could explain the phenotype of ID and SS. The other SV was a deletion of 3.5 Mb is in 6q23.2q24.1 encompassing 51 genes, including TNFAIP3. TNFAIP3 haploinsufficiency has a pathogenic effect in our patient and could explain the refractory auto-inflammatory manifestation. We emphasize the importance to detect two SVs in this patient using aCGH that make possible to understand her complex clinical picture. Recognizing the genetic cause associated with TNFAIP3 haploinsufficiency could help to select the adequate new therapies to improve the clinical management of auto-inflammatory disease.

CH 9

HALLAZGOS CROMOSÓMICOS EN PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA

Morales P.¹, S. Fernández, E. Torres¹. ¹Universidad Nacional de Asunción, Paraguay.
paulammoralesc@gmail.com

Las alteraciones cromosómicas implicadas en la formación de las Leucemias Mieloblásticas Agudas (LMA) y Leucemias Linfoblásticas Agudas (LLA), pueden ser visualizadas mediante la citogenética. El hallazgo de una cromosomopatía permite un diagnóstico temprano y un manejo adecuado del paciente, pues a través de este resultado, se realiza una clasificación y selección del tratamiento. Este trabajo ha tenido como propósito identificar los principales tipos de anomalías cromosómicas en pacientes con LMA y LLA. Se realizaron cultivos de médula ósea en una muestra de 72 pacientes hematológicos, en el Laboratorio de Citogenética del IICS/UNA en el Paraguay, 45 con diagnóstico presuntivo de LMA y 26 con LLA, el paciente restante no indicó el linaje y su cariotipo fue inconcluso. De los pacientes con diagnóstico de LMA se observaron 3 anomalías numéricas, 5 anomalías estructurales y 37 con cariotipo normal. En los pacientes con diagnóstico de LLA se observaron 3 anomalías numéricas, 5 anomalías estructurales y 18 con cariotipo normal. Los casos inconcluyentes fueron 12, las principales causas de esto fueron la escasez de la muestra, una cantidad reducida de células en división y/o debido a una elevada actividad mitótica de células no leucémicas. Resulta muy probable que los pacientes con cariotipo normal presenten puntos de ruptura crípticas, regiones no detectables al microscopio óptico. Estos resultados permiten al paciente tener un diagnóstico de certeza, como también un pronóstico favorable o desfavorable según su categoría de riesgo. De allí la necesidad e importancia de este estudio.

CH 10

DOBLE TRANSLOCACIÓN CROMOSÓMICA EQUILIBRADA CARACTERIZADA POR CARIOTIPO DE ALTA RESOLUCIÓN Y SKY

Fortunato P.C.¹, P.D. Flores¹, E. Torchinsky², S. Rozental², J.E. Dipierri¹.
¹Hospital Materno Infantil "Dr. Hector Quintana", Jujuy, Argentina;
²Centro Nacional de Genética Médica, Buenos Aires, Argentina.
pamela_f@hotmail.com

Las dobles translocaciones cromosómicas equilibradas (DTCE) son eventos muy raros. En general estas anomalías llegan a la consulta por problemas reproductivos o después del nacimiento de un niño con anomalías congénitas. Se presenta la caracterización clínica y citogenética de un paciente con un derivado de una DTCE paterna. Niña de 4 meses derivada por malformaciones múltiples, tercera hija de una pareja sana no consanguínea de 37 años ambos. Embarazo normal. Ecografía prenatal: malformación cerebral. Cesárea 37 semanas, PN 2.833 g, Talla 46 cm, PC 33 cm, Apgar 8/9, mielomeningocele lumbar abierto, hidrocefalia, pie bot, DAP, cataratas, hipoplasia RD, retraso madurativo, microcefalia, hipertelorismo, nariz pequeña, narinas antevertidas, filtrum largo, dermatoglifos anormales. El estudio citogenético (NR=550) reveló un cariotipo: 46,XX,der(13)[20]. El cariotipo materno fue 46,XX[20] y el paterno 46,XY,t(4;15)(q31.3;q22.3),t(13;20)(q32;q13.1)[20].ish,der(4)(wcp4+,wcp15+),der(13)(wcp13+,wcp20+),der(15)(wcp15+,wcp4+),der(20)(wcp20+,wcp13+). Cariotipo definitivo del propósito: 46,XX,der(13)t(13;20)(q32;q13.1)pat[20]. El paciente comparte características clínicas con las descritas para estos desbalances. El riesgo aditivo de una doble translocación desbalanceada es de 24-48%. Estas anomalías representan un enorme desafío en el diagnóstico y asesoramiento genético. Cabe destacar la importancia de la citogenética molecular para la interpretación de las anomalías cromosómicas estructurales y el valor del trabajo en red entre laboratorios del sistema público de nuestro país.

FRECUENCIA DE POLIMORFISMOS DEL GEN *TRPV1* EN POBLACIÓN GENERAL DEL OCCIDENTE DE MÉXICO Y SU RELACIÓN CON PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

González Mercado A.^{1,2}, J.Y. Sánchez López², M. Ríos Silva³, X. Trujillo⁴, M.G. González Mercado⁵, B. Ibarra¹, M.T. Magaña Torres², M. Huerta Viera⁴. ¹Instituto de Genética Humana, CUCS, Universidad de Guadalajara, Jalisco, México; ²División de Genética, CIBO, IMSS, Guadalajara, Jalisco, México; ³Universidad de Colima, Cátedras CONACyT, CUIB, Colima, México; ⁴Universidad de Colima, Unidad de Investigación Dr. Enrico Stefani, CUIB, Colima, México; ⁵Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Campus Guadalajara, Tecnológico de Monterrey, México.
anahi_220@hotmail.com

El gen *TRPV1* codifica para la proteína TRPV1, un canal catiónico con respuesta al pH bajo, calor y capsaicina, relacionado con nocicepción, inflamación neurógena y prurito. El objetivo fue conocer la frecuencia de los polimorfismos rs222749 (c.271G>A), rs222747 (c.945G>C), rs224534 (c.1406G>A) y rs8065080 (c.1753C>T) en población mexicana y su relación con parámetros bioquímicos. Se incluyeron 203 estudiantes de Colima y Guadalajara. Se extrajo ADN de sangre periférica, la genotipificación fue por ensayo TaqMan SNP. La media de edad fue 20,8±3,2 años e IMC 24,0±4,1 kg/m². El 4,3% presentó presión arterial (PA) sistólica ≥140mmHg, 5,9% PA diastólica ≥90mmHg, 9,6% colesterol total ≥200mg/dL; 47,2% se consideraron muy tolerantes al sabor picante. Las frecuencias de los alelos menores fueron: rs222749A (10,6%), rs222747C (31,8%), rs224534A (51,2%) y rs8065080T (62,8%), estadísticamente similares a la población de Los Ángeles con ancestría mexicana (p>0,05) y diferentes a las del este de Asia y África (p<0,0001) reportadas en 1000 genomas. Los participantes con el genotipo rs222749GG tuvieron una presión arterial (PA) diastólica baja, rs224534GG confiere una PA sistólica baja, mientras que rs224534AA se asoció con altos niveles de HDL. Se reportan por primera vez las frecuencias genotípicas y alélicas en población mexicana del occidente. Dado que estos polimorfismos se han relacionado, en diversas poblaciones, con patologías como percepción al dolor, al sabor salado, tos y DM1, este trabajo podría utilizarse para futuros estudios de asociación con alguna patología de interés.

ISODICÉNTRICO DEL CROMOSOMA Y EN UN PACIENTE DE FENOTIPO MASCULINO CON GENITALES AMBIGUOS Y EN DOS PACIENTES CON FENOTIPO FEMENINO

Martínez Taibo C.^{1,2}, E. Salim¹, A.D. Granados³, R.P. Martos⁴, P. Huidobro⁵. ¹Laboratorio de Citogenética, Hospital "Dr. Arturo Oñativia", Salta, Argentina; ²Laboratorio de Genética Humana, Instituto Médico de Alta Complejidad (IMAC), Salta, Argentina; ³Centro de Estudio Femenino y Reproducción Humana (CEFYR), Salta, Argentina; ⁴Servicio de Cirugía, Instituto Médico de Alta Complejidad (IMAC), Salta, Argentina; ⁵Especialidades Médicas, Hospital Público Materno Infantil, Salta, Argentina.
cmartineztaibo@yahoo.com.ar

Se realizó el hallazgo de una misma anomalía cromosómica sexual en pacientes con fenotipo masculino y femenino. El objetivo es caracterizar por distintas técnicas de citogenética clásica y molecular las cromosopatías detectadas y correlacionarlas con la clínica. Se realizó cultivo de linfocitos de sangre periférica. Se utilizaron técnicas de citogenética clásica: Bando G, Bando C, Bando Q. Técnica de citogenética molecular: Hibridación *In Situ* Fluorescente (FISH). En los tres pacientes se observa por Bando G un isocromosoma del Y i(Y). Los Bando C y Q marcan dos bloques de heterocromatina y un centrómero. Mediante FISH se detecta el gen SRY y AZFa en doble copia, lo que determina que porta dos copias del brazo corto del cromosoma Y, indicando un cromosoma isodicentrico idic(Y). Caso 1: 45,X[27]/46,X,idic(Y)(p11.3)[23] RN masculino con genitales ambiguos, estructuras internas masculinas en lado izquierdo y en derecho estructuras femeninas rudimentarias. Caso 2: 45,X[13]/46,X,idic(Y)(p11.3)[7] RN femenino con Síndrome de Turner. Caso 3: 45,X[110]/46,X,idic(Y)(p11.3)[8]/46,XY[3] niña de 7 años con Síndrome de Turner. En el paciente con genitales ambiguos la línea con cromosoma masculino representa el 46%, mientras que en la RN y en la niña de 7 años es el 35 y el 9%. El mosaicismo puede variar en otros tejidos, por lo que se plantea el estudio en las gónadas. En los tres casos la constitución del idic(Y) resultó idéntica. Mediante FISH pudo determinarse que el i(Y) observado por Bando G es un idic(Y), lo que resalta la importancia de un estudio citogenético exhaustivo.

CH 13

SÍNDROME DE WOLF-HIRSCHHORN POR TRANSLOCACIÓN: A PROPÓSITO DE UN CASO

Alvarenga E.¹, S. Paredes¹, J. Ortíz¹, G. Meza¹, E. Torres¹. ¹Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Campus UNA, San Lorenzo, Paraguay.
elialvarengat@gmail.com

El síndrome de Wolf-Hirschhorn (WHS) es causado por la pérdida de la porción distal del brazo corto del cromosoma 4. Se caracteriza por presentar un rasgo cráneo-facial típico. Su frecuencia es de 1 por 50.000 nacidos vivos. Se presenta el caso de una paciente de 7 meses de vida derivada al Laboratorio de Citogenética del IICS, Paraguay, para la realización de la técnica de Hibridación *in situ* fluorescente (FISH), por presentar malformaciones diversas y alimentación nasogástrica. Madre 20 y Padre 26 años, sanos, no consanguíneos, refieren no haber tenido exposición a teratógenos. La niña es producto de un primer embarazo, nacida a término a las 41 semanas de gestación con 2.320 g de peso, con hipotonía y alimentación por sonda. Al examen físico presentó microcefalia, puente nasal chato, hipertelorismo, orejas dismórficas y de implantación baja, paladar hendido, retardo psicomotor y FOP. La presión pulmonar y ritmo cardíaco normal y buena contractilidad. El estudio cromosómico reveló una translocación desequilibrada entre el brazo corto del cromosoma 4 y una pieza extra de origen desconocido. La técnica (FISH) reveló la microdelección distal del brazo corto en el cromosoma 4, región p16.3. A fin de determinar el origen de la translocación, se realizó el estudio cromosómico a los padres, siendo sus cariotipos normales. Para este caso resulta de fundamental importancia la realización del FISH en la paciente, pues con el cariotipo estándar se observó una translocación *de novo*, y con el FISH la microdelección del gen en el brazo corto del cromosoma 4, región p16.3.

CH 14

EXPERIENCIA EN LA DETECCIÓN DE ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS EN LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA MEDIANTE TÉCNICA DE HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE

Sturich A.¹, Y. Colussi¹, L. Guanchiale², N. Rossi³. ¹Laboratorio de Hematología, Oncología y Genética, Hospital Privado Universitario de Córdoba, Córdoba, Argentina; ²Servicio de Hematología y Oncología, Hospital Privado Universitario de Córdoba, Córdoba, Argentina; ³Servicio de Genética Médica, Hospital Privado Universitario de Córdoba, Córdoba, Argentina.
asturich@gmail.com

La leucemia linfática crónica (LLC) es una patología caracterizada por proliferación de linfocitos maduros en sangre, médula ósea y tejidos linfoides; representa el 70% de las leucemias en adultos, afectando a individuos entre 60–80 años, incidencia 2M/1F. El 50% de ellas presenta anomalías cromosómicas, este valor se eleva al 70% mediante la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH), al identificar anomalías crípticas no observables en cariotipos con bandeado GTG, lo que tiene impacto directo en la elección del tratamiento y en el pronóstico de la patología. Los objetivos de este trabajo fueron: a) Presentar nuestra experiencia en el diagnóstico de anomalías cromosómicas en pacientes con LLC mediante técnica de FISH, en un centro de referencia en la ciudad de Córdoba; b) Comparar nuestros hallazgos con la literatura. Se evaluaron muestras de médula ósea de 151 pacientes, 105 M, 46 F, en el período diciembre 2011 a mayo 2019. El 91% fueron casos de *novo*. Se empleó el kit multicolor de sondas específica de DNA (Abbott molecular) para detección de anomalías en los cromosomas 11 (gen ATM), 12, 13 (región 13q14) y 17 (gen TP53). El 40% resultó normal; en el 60% patológico se detectaron: trisomía 12 (20%), delección 11q (13%), delección 13q (36%) tanto monoalélica como bialélica y delección 17p (10%). El 21% de los pacientes presentaron dos o más anomalías, no detectándose en nuestra serie asociación entre delecciones 11q y 17p. Nuestros resultados coinciden con los reportados en la bibliografía. Destacamos la utilidad del FISH para la detección de estas anomalías.

FRECUENCIA DE MICRODELECCIONES CROMOSÓMICAS DETECTADAS POR HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE EN PACIENTES CON CARIOTIPO NORMAL

Torres Fernández E.C.¹, E.A. Alvarenga Torres¹, S.A. Paredes Rivas¹, J.A. Ortiz Monjagata¹, G. Meza Acosta¹, S. Fernández Martínez¹, M.S. Rodríguez Ovelar¹. ¹Universidad Nacional de Asunción, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Departamento de Genética, Laboratorio de Citogenética, Campus Universitario, San Lorenzo, Paraguay. torres.elodia63@gmail.com

La Hibridación *in situ* fluorescente implica la hibridación de una sonda marcada a un objetivo cromosómico, el principio se refiere a la propiedad que tiene una hebra simple de DNA de unirse a su secuencia complementaria y detectar visualmente regiones homólogas. El objetivo de este trabajo fue determinar la frecuencia de microdeleciones cromosómicas en pacientes con cariotipo normal por medio de la técnica citogenética molecular de hibridación *in situ* fluorescente. Se utilizaron sondas comerciales Vysis®, Abbott Molecular Inc., USA, para 1p36, 4p16, 7q11, 15q11, 22q11 y Gen SRY. En una primera fase se realizaron 9 hibridaciones para estandarización y entrenamiento de la técnica, y en una segunda fase se realizaron 6 hibridaciones como controles positivos y, en una tercera y última fase se atendieron consecutivamente a 35 pacientes con sospecha clínica de ser portadores de microdeleciones para los Síndromes Monosomía 1p36, Sx. Wolf Hirschhorn 4p16, Sx. Williams 7q11, Sx. Prader-Willi/Angelman 15q11, Sx. Di George 22q11 y para detección del gen SRY del cromosoma Yp11. La frecuencia de microdeleciones en este grupo de pacientes fue de 18,75 % (3/16), la del Gen SRY fue de 87,5 % (14/16) y 5 pacientes sin resultados. Estos resultados reflejan la importancia de la aplicación de la técnica de Hibridación *in situ* fluorescente (FISH) en pacientes sin aparente alteración cromosómica pero con sospecha clínica de ser portadores de microdeleciones, de manera de tener un diagnóstico precoz y de certeza, un tratamiento y asesoramiento genético adecuados para una mejor calidad de vida.

TRISOMÍA DEL BRAZO CORTO DEL CROMOSOMA 9: REPORTE DE UN CASO

Salim E.¹, P. Huidobro², J. Marinaro¹, C. Martínez Taibo¹. ¹Laboratorio de Citogenética, Hospital "Dr. Arturo Oñativia", Salta, Argentina; ²Servicio de Endocrinología y Metabolismo, Sector Especialidades Médicas, Hospital Público Materno Infantil, Salta, Argentina. ericasalim81@gmail.com

Ante el hallazgo de una anomalía cromosómica se propone como objetivos la identificación de la anomalía detectada por cariotipo convencional, confirmación por la técnica de FISH y su correlación con la clínica. Paciente femenino de nueve meses de vida consulta al Laboratorio de Citogenética derivada por estrabismo, malformaciones en dedos de las manos y ortijos, e hiperlaxitud. Primera hija de pareja no consanguínea, EM: 31 años, EP: 31 años. Presenta, además, facie síndromica, braquicefalia, cuello corto, labio inferior invertido con prognatismo y tórax ancho, entre otras. Estudio citogenético clásico: Sangre periférica y cultivo celular de 72 hs. Cosecha de linfocitos y Bando G. Observación: microscopía óptica. Estudio citogenético molecular: Técnica Hibridación *In Situ* por Fluorescencia sobre extendido cromosómico, sonda subtelomérica SMT 9pter. Los hallazgos citogenéticos: 46,XX,der(14)t(9;14)(p10;q10). Se observó material adicional en el cromosoma 14 correspondiente al brazo corto del cromosoma 9. Confirmación por FISH, lo que resulta en una trisomía parcial del cromosoma 9p. Cariotipo materno normal, sin acceso al cariotipo paterno. La trisomía 9p, o síndrome de Rethoré, se caracteriza clínicamente por retraso mental y psicomotor, malformaciones cráneo-faciales distintivas y anomalías de manos y pies. La descripción fenotípica y los hallazgos citogenéticos de la paciente se corresponden con el síndrome mencionado. Estos resultados demuestran la importancia de los estudios citogenéticos para un correcto asesoramiento.

CH 17

ESTUDIO DEL POLIMORFISMO 9PH O INVERSIÓN PERICÉNTRICA DEL CROMOSOMA 9 EN PACIENTES CON TRASTORNOS REPRODUCTIVOS

Corominas A.¹, L. Matilla Mendez¹, J. Laiseca¹, S. Lopez¹, J.P. Refort¹, A. Castañón², C. Serale¹, M.S. Perez², S. Benasayag¹. ¹FUNDAGEN, Buenos Aires, Argentina; ²MANLAB, Buenos Aires, Argentina. silviabenasayag@gmail.com

En Citogenética, los polimorfismos son regiones de heterocromatina aumentada, disminuida o de cambio de posición en determinados cromosomas. Estas variantes son consideradas clínicamente no significativas. Sin embargo, su estudio detallado en poblaciones con fallas reproductivas ha sido controvertido. El objetivo fue estudiar la prevalencia del polimorfismo 9ph o inversión del cromosoma 9, en nuestra población. Evaluar si su frecuencia es diferente en pacientes con trastornos reproductivos. Se estudió la prevalencia del 9ph en 4744 muestras de pacientes consecutivas recibidas en Fundagen con cariotipo normal, diagnóstico clínico de infertilidad, esterilidad o abortos espontáneos. Se comparó dicha prevalencia en la población control. La significancia estadística se evaluó por el método Chi². De los 4744 pacientes, 3150 consultaron por problemas de fertilidad (1596 cariotipos femeninos, 9ph=14: 0,877%; 1554 cariotipos masculinos, 9ph=20: 1,287%); 1594 consultaron por otros motivos (720 cariotipos femeninos, 9ph=7: 0,972%; 874 cariotipos masculinos, 9ph=3: 0,343%). La prevalencia de este polimorfismo fue de 0,927. La mayor prevalencia de 9ph en cariotipos masculinos es estadísticamente significativa (p=0,02), con un OR=3,79 (1,07–16,03). La prevalencia general coincide con la literatura. Nuestros resultados indican que 9ph en la población masculina podría asociarse a trastornos reproductivos. Muchas de las causas de estas fallas siguen siendo aún desconocidas. Este polimorfismo podría ser un factor que perturbe la gametogénesis normal.

CH 18

ALTERACIONES CITOGÉNÉTICAS EN MUESTRAS DE MÉDULA ÓSEA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS REMITIDAS AL LABORATORIO DE CITOGÉNÉTICA DEL IICS–UNA PERÍODO 2014–2018

Fernández Martínez S.¹, M.S. Rodriguez¹, P. Morales¹, E. Torres¹, N. Monjagata¹, S. Aguilar¹, G. Meza¹, E. Estigarribia¹. ¹Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Asunción, Paraguay. silvifernandezm@hotmail.com

La citogenética estudia las alteraciones cromosómicas y se considera una importante herramienta en el diagnóstico y seguimiento de las neoplasias hematológicas. El objetivo del presente trabajo fue presentar las alteraciones citogenéticas que se observaron en muestras de médula ósea de pacientes pediátricos con sospecha de neoplasias hematológicas remitidas al laboratorio de Citogenética del IICS–UNA del 2014 al 2018. Se analizaron 210 muestras de menores de 18 años, 55 % masculinos y 45 % femeninos. El 81% de las muestras se analizaron, mientras que el resto no debido al escaso crecimiento celular. El 78% de los pacientes presentaban un diagnóstico presuntivo o sintomatología relacionada con alguna alteración hematológica como Leucosis y Pancitopenia. La metodología utilizada fue el cultivo de médula ósea entre 24 y 72 hs, posteriormente el análisis citogenético con la técnica de bandas G, se analizaron de 20 a 30 células por paciente. El 19% de los casos analizables presentaron alteraciones cromosómicas, 10% estructurales y 9% numéricas. La alteración estructural más frecuente fue la t(9;22), mientras otras estructurales presentes fueron t(15;17), t(11;17), t(7;9), t(1;18), t(1;3), del(7p), del(15q). Mientras entre las numéricas se observaron hiperdiploidias. Los estudios citogenéticos se utilizan para la confirmación del diagnóstico, por lo que resulta de mucha importancia contar con criterios que justifiquen el análisis citogenético de médula ósea en estos pacientes pediátricos de manera de clasificar y estadificar la neoplasia a fin de contar con una terapia adecuada.

SÍNDROME DE TURNER CON CARIOTIPO INFRECUENTE: REPORTE DE UN CASO CLÍNICO

Silva V.¹, J. Souto¹, A. Sanguinetti¹, G. Cassina¹, V. Díaz¹, S. Machado¹, M. Spangenberg¹, F. Uturbey¹. ¹Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. silvavanina@gmail.com

El síndrome de Turner es un trastorno cromosómico causado por la ausencia parcial o total de un cromosoma X. La incidencia es 1 en 4000 recién nacidas. La constitución cromosómica más frecuente es 45,X, 50% y menor frecuencia para mosaicismos y alteraciones estructurales como isocromosomas, cromosomas en anillo o deleciones. Estas últimas se observan en 1 cada 15000 recién nacidas. Es menos frecuente aún la concomitancia de deleciones en ambos brazos como la que se presenta. Se describe el caso de un recién nacido de sexo femenino con dismorfias craneofaciales, de manos y pies. El estudio citogenético mostró 46,XX, del(X)(pter → p11)(qter → q21) con deleción de ambos brazos q y p del cromosoma X, sin formación de anillo cromosómico. Se realizó Hibridación *in situ* fluorescente que confirmó la presencia de dos centrómeros del X y ausencia de cromosoma Y. A pesar de que el complemento cromosómico no puede predecir de manera exacta la presentación clínica, algunas alteraciones se han asociado a anomalías cromosómicas concretas; en el caso presentado resulta relevante relacionar las manifestaciones clínicas con los genes afectados. El presente caso remarca la importancia del estudio citogenético convencional y molecular en conjunto para el diagnóstico y manejo clínico de enfermedades complejas.

TÉCNICA DE ENRIQUECIMIENTO CELULAR. ELIMINACIÓN DE FALSOS NEGATIVOS POR HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH) EN PACIENTES CON MIELOMA MÚLTIPLE

Sanguinetti A.^{1,2}, V. Díaz¹, G. Cassina¹, S. Machado¹, V. Silva¹, J. Souto^{1,2}, M.N. Spangenberg¹, F. Uturbey^{1,2}. ¹Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; ²Hospital Maciel, Montevideo, Uruguay. analia.sang@gmail.com

En el mieloma múltiple (MM) la citogenética convencional y molecular es imprescindible para el pronóstico. Presenta dificultades por el bajo índice mitótico y por rearrreglos crípticos que deben identificarse por hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Esta técnica presenta un bajo rendimiento en la médula ósea entera y en metafases de cultivos celulares aún con mitógenos, por presentar un importante número de falsos negativos. El objetivo del trabajo es optimizar el FISH para factores pronósticos en MM, lo cual incluye disminuir falsos negativos por selección positiva, validar la selección negativa por citometría de flujo y eliminar falsos negativos de forma comparable con la selección positiva. En este estudio se incluyeron 20 pacientes para selección positiva por citometría de flujo y 14 pacientes para la técnica de selección negativa, mediante la utilización de *RosetteSep*TM. Se realizó FISH sobre pellets de cultivos celulares con mitógenos B y sobre médula entera enriquecida. La técnica se validó demostrando un aumento del porcentaje de células mielomatosas en el producto enriquecido en relación a médula entera, cuantificado por citometría de flujo. Se evidenciaron alteraciones por FISH en pellet enriquecido no observadas sobre pellet citogenético, lo que implicó una disminución del 40% de los falsos negativos. Estos resultados muestran que tanto la selección positiva por citometría de flujo (*sorting*) como el enriquecimiento celular (selección negativa) optimiza el diagnóstico por FISH de pacientes portadores de MM.

CH 21

DELECIÓN Y DUPLICACIÓN EN EL CROMOSOMA 3: REPORTE DE DOS CASOS

Monjagata De Ortiz N.¹, S. Aguillar¹, S. Fernández Martínez¹, S. Rodríguez¹. ¹Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Asunción, Paraguay.
normonjagata@gmail.com

Las aberraciones cromosómicas, son un error durante la meiosis de los gametos o de las primeras divisiones del huevo y que provoca una anomalía de número o de estructura de los cromosomas. Estas podrían ser heredadas o resultar un episodio de *novo*. Una duplicación cromosómica es la repetición de un fragmento que surgen por error en el ADN. Las deleciones, que implican pérdida de material genético, se relacionan con los signos y síntomas que provocan síndromes o enfermedades entre los afectados. Se presentaron dos casos casi similares en muestras remitidas al laboratorio de genética para el análisis de cariotipo. Se observó duplicación en el cromosoma 3p. Primer caso: Paciente de sexo masculino de 5 años de edad, padres no consanguíneos. Ecocardio refiere normal, perfil tiroideo normal. Al examen físico presentó PC-48, sen>-2 AS. Epicantus marcados, puente nasal ancho, orejas prominentes de implantación baja, ante hélices simples, labios gruesos, pliegues palmares normales, dedos cortos. Mentón cuadrado, asimetría facial, ojo derecho más bajo, filtrum corto. No convulsiona. Cariotipo estándar: 46,XX,dup 3p que abarca desde el p13 hasta el p21.3. Segundo caso: Paciente con microcefalia, pc.28, hendiduras palpebrales pequeñas con dificultad para la apertura ocular, base de implantación nasal ancha, implante baja de orejas, micro y retrognatia, en ambas manos dedos del medio y anular superpuestos. Cariotipo: XX,del(3)(p25:pter)[83]/46,XX,idic(3)(pter:p10::pter:p10)[2]/46,XX[15]. Se presenta la comparación de ambos casos.

CH 22

DIAGNÓSTICO PRENATAL: ABORDAJE INTERDISCIPLINARIO DE UNA TRANSLOCACIÓN RECÍPROCA BALANCEADA FAMILIAR EN JUJUY

Flores P.D.¹, P.C. Fortunato¹, F.A. Vladislavic¹, J.E. Dipierri¹. ¹Hospital Materno Infantil "Dr. Héctor Quintana", Jujuy, Argentina.
danielafllores0286@gmail.com

Los portadores de translocaciones recíprocas balanceadas (TRB) presentan un alto riesgo de aborto o descendencia cromosómicamente desbalanceada; tienen una incidencia en la población general de ~1/700. Recientemente el Centro Materno Infantil de Jujuy incorporó el diagnóstico prenatal a los servicios brindados. Se presenta un caso familiar de TRB atendido en esta institución estatal. Embarazada de 33 años de edad con una gesta de 12 semanas, con 2 hijos sanos de una pareja previa que ingresa para recibir estudio y asesoramiento genético por presentar antecedentes familiares de malformaciones (fisura labio-alvéolo-palatina bilateral, pie talo, agenesia del cuerpo calloso, convulsiones) en tres generaciones de la familia de su pareja actual. Se realizó cultivo de linfocitos de sangre periférica y técnica de bandeado GTG en el padre que presentó un cariotipo 46,XY,t(1;4)(p36.2;q35) [20]. El estudio citogenético de líquido amniótico con sondas subteloméricas 1pter y 4qter por FISH reveló la presencia del derivado cromosómico 1 de origen paterno. El cálculo de riesgo de recurrencia familiar para un portador masculino es de 13,5% al 23% y de aborto espontáneo dado un embarazo reconocido de ~40%, que incluye un riesgo basal de ~20%. Los hallazgos citogenéticos permitieron demostrar esta anomalía cromosómica y facilitó localmente el abordaje multidisciplinario del embarazo en curso y el asesoramiento genético familiar. El recién nacido comparte algunas características fenotípicas con las descritas en la bibliografía para esta patología.

COMPARACIÓN CPG OLIGONUCLEÓTIDO/ IL2 vs. TPA, COMO MITÓGENOS EN LEUCEMIA LINFOIDE CRÓNICA

Machado S¹, G. Cassina¹, V. Díaz¹, C. Fagúndez², F. Fagúndez², A. Farabelli², N. García², L. Gómez², A. Sanguinetti¹, V. Silva¹, J. Souto¹, M.N. Spangenberg¹, F. Uturbey¹. ¹Departamento de Genética, Facultad de Medicina, UDELAR, Uruguay; ²Estudiante de grado, Facultad de Medicina, UDELAR, Uruguay.
sebastianmachado2014@gmail.com

La leucemia linfocítica crónica (LLC) es una enfermedad caracterizada por acumulación anormal de linfocitos B maduros. Es la leucemia más frecuente en adultos con edad media de diagnóstico a los 70 años. Para valorar el pronóstico de esta enfermedad son necesarios estudios de citogenética convencional. Como objetivo se plantea poner a punto la técnica de citogenética utilizando CpG IL2 de manera sistemática como mitógeno en el cultivo. Este protocolo está validado a nivel mundial, pero no se utiliza aún en nuestro país. Se comparará la eficacia del nuevo mitógeno con el 12-O-tetradecanoilforbol ester (TPA) tradicional, utilizando el índice mitótico. Se realizó un estudio comparativo entre los dos mitógenos que se utilizan para la determinación del pronóstico de LLC. La población de estudio se conformó por pacientes con diagnóstico de LLC de la policlínica de LLC del Hospital Maciel, valorados en el período de julio-setiembre del 2018, sin tratamiento en los últimos 12 meses. Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de diagnóstico citogenético de la Facultad de Medicina. En nuestro grupo de pacientes se evidenció que la utilización de CpG-IL2 como mitógeno sistemáticamente mejora la obtención en cantidad y calidad de las metafases. La diferencia fue significativa. Este trabajo permitió la puesta a punto de un protocolo y demostró su superioridad frente a la técnica utilizada en nuestro medio. A partir de los resultados de este estudio se implementó el uso de CpG como mitógeno de forma sistemática en el departamento de Citogenética de la Facultad de Medicina.