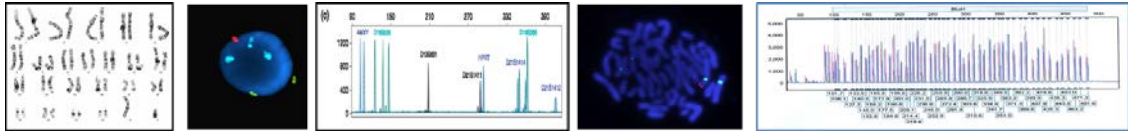


DEPARTAMENTO DE CIRUGIA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA



ANÁLISIS MEDIANTE MLPA DE SÍNDROMES DE MICRODELECCIONES/MICRODUPLICACIONES EN PACIENTES CON RETRASO MENTAL

F. Javier Sánchez García

Sevilla, 2015

DEPARTAMENTO DE CIRUGIA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Memoria realizada en la Unidad de Gestión Clínica de Genética, Reproducción, y Medicina Fetal del Hospital Universitario Virgen del Rocío bajo la dirección de Dña. Raquel María Fernández García, Doctora en Farmacia y Dña. Irene Marcos Luque, Doctora en Farmacia, y la tutoría de D. Guillermo Antiñolo Gil Profesor Titular de Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina y Cirugía de la Universidad de Sevilla, que presenta el Licenciado en Biología F. JAVIER SÁNCHEZ GARCÍA para optar al grado de Doctor.

Las Directoras,

El Tutor,

Raquel Fernández García
Doctora en Farmacia
HU Virgen del Rocío

Irene Marcos Luque
Doctora en Farmacia
HU Virgen del Rocío

Guillermo Antiñolo Gil
Profesor Titular de
Obstetricia y Ginecología
Universidad de Sevilla

El Doctorando

F. Javier Sánchez García

A Fátima, Fernando, Ignacio y Luis
A mis padres

INDICE

INTRODUCCION

1.	Reseña histórica.	3
2.	Técnicas de bandeo cromosómico.	4
3.	Técnica de citogenética molecular – FISH.	7
	3.1. Aplicaciones clínicas de la FISH.	8
	3.2. Tipos de sondas FISH	10
	3.2.1. Sondas de las regiones centroméricas (CEP) y satélites.	10
	3.2.2. Sondas de pintado cromosómico (WCP).	11
	3.2.3. Sondas Locus específico (LSI).	11
4.	Técnicas de citogenética molecular – mFISH y SKY.	13
	4.1. Elementos de SKY.	14
	4.1.1. Hibridación.	14
	4.1.2. Obtención de imágenes.	15
	4.1.3. Análisis de resultados.	15
5.	Técnicas de citogenética molecular – PNA-FISH.	16
6.	Técnicas de citogenética molecular – ODN-FISH.	16
7.	MLPA (Multiple Ligation Probe Amplification).	17
8.	Hibridación Genómica Comparada (CGH).	19
9.	Síndromes de microdeleciones y microduplicaciones.	22
	9.1. Causas de las microdeleciones / microduplicaciones.	23
10.	Consejo Genético.	29

HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

1.	Hipótesis.	33
2.	Objetivos.	35

PACIENTES Y METODOS

1.	Pacientes.	39
2.	Métodos.	41
	2.1. Cultivos Celulares.	41

2.1.1. Cultivo de linfocitos en sangre periférica.	41
2.1.2. Cultivo de células de líquido amniótico.	44
2.1.3. Cultivo de fibroblastos en piel.	45
2.2. Extracción de ADN.	48
2.2.1. Extracción de ADN genómico a partir de sangre periférica.	48
2.2.2. Extracción de ADN a partir de vellosidades coriales / líquido amniótico/ cultivo de piel.	49
2.3. Extracción automática de ADN (MagnaPure).	52
2.4. Espectrofotometría de ácidos nucleicos.	53
2.5. MLPA (Multiple Ligation Probe Amplification).	54
2.6. Hibridación in situ Fluorescente (FISH).	69
2.7. Análisis molecular mediante marcadores microsatélites del cromosoma 15.	81
RESULTADOS	
1. Síndrome de delección 1p36.	87
2. Duplicación 3q29.	88
3. Síndrome de Cri du Chat, delección 5p15.2.	89
4. Síndrome de duplicación 5q35.	90
5. Síndrome de Williams, delección 7q11.3.	91
6. Síndrome de Prader-Willi, delección 15q11-q13.	92
7. Síndrome de Angelman, delección 15q11-q13.	92
8. Síndrome de Miller-Dieker, delección 17p13.	95
9. Síndrome de Potocki-Lupski, duplicación 17p11.2.	96
10. Síndrome microdelección NF1, delección 17q11.2	96
11. Síndrome de DiGeorge, delección 22q11.	97
12. Síndrome de duplicación Xq28.	98
13. Síndromes microdelecionales.	98
14. Diagnóstico prenatal en sangre fetal y líquido amniótico.	109
14.1. Análisis del síndrome de Miller-Dieker.	109

14.2. Análisis del síndrome de DiGeorge.	109
14.3. Otros estudios prenatales.	110
15. Relación del número de pacientes diagnosticados en los diferentes síndromes identificados en el presente estudio.	111
16. Número de pacientes con algún tipo de anomalía.	112
DISCUSION	
1. Variabilidad clínica en los síndromes de microdelección / microduplicación.	115
2. Mosaicismo germinal / somático como causa de síndrome de Angelman.	118
3. Reordenamientos cromosómicos como causa de síndromes de microdelección / microduplicación.	122
3.1. Segregación familiar de una translocación entre un cromosoma 4 y cromosoma 8 como causa de síndrome de Wolf-Hirschhorn.	122
3.2. Segregación familiar de una translocación entre un cromosoma 4 y cromosoma 22 como causa de síndrome de Wolf-Hirschhorn.	123
3.3. Segregación familiar de una inserción intersticial del brazo corto de un cromosoma 10 en el brazo largo de un cromosoma 16 como causa de un síndrome de DiGeorge tipo 2.	124
4. Diagnóstico prenatal de síndromes de microdelección/microduplicación.	126
4.1. Diagnóstico prenatal de la microdelección 22q11 en mujeres con antecedentes de microdelección 22q11 o en embarazos con fetos con cardiopatía.	127
4.2. Diagnóstico prenatal en fetos con malformación cerebral.	127
CONCLUSIONES	129
BIBLIOGRAFIA	135
ANEXO	145

Índice de Figuras

Figura I-1: Técnicas de bandeado cromosómico.	6
Figura I-2: Tipos de sondas utilizadas en FISH.	13
Figura I-3: Combinación de los fluorocromos en SKY.	15
Figura I-4: Procedimiento del array CGH.	20
Figura I-5: Recombinación homóloga no alélica entre cromosomas homólogos.	24
Figura I-6. Recombinación intracromosómica. Intercambio desigual entre cromátidas hermanas.	25
Figura I-7. Recombinación intracromosómica. Formación de un lazo (<i>loop</i>) intracromosómico.	26
Figura PM-1: esquema de la técnica de MLPA.	55
Figura PM-2: Algoritmo de confirmación mediante MLPA.	56
Figura PM-3: Informe estándar del análisis de fragmentos de MLPA con el programa GeneMarker.	69
Figura PM-4: Localización de las sondas subteloméricas.	70
Figura PM-5. Localización de las sondas e idiograma, región 1p36.	71
Figura PM-6. Localización de la sonda LSI WHS e idiograma, región 4p16.3.	72
Figura PM-7. Localización de la sonda LSI D5S23, D5S721 e idiograma, región 5p15-2.	72
Figura PM-8. Localización de la sonda LSI NSD1 e idiograma, región 5q35.	73
Figura PM-9. Localización de la sonda LSI ELN e idiograma, región 7q11-23.	74
Figura PM-10. Localización de la sonda LSI SNRPN e idiograma, región 15q11-q13.	74
Figura PM-11. Localización de la sonda LSI LIS1 e idiograma, región 17p13.3.	75
Figura PM-12. Localización de la sonda LSI SMS e idiograma, región 17p11.2.	75
Figura PM-13. Localización de la sonda LSI MAPT (17q21).	76
Figura PM-14. Localización de la sonda LSI TUPLE1 (HIRA) e idiograma, región 22q11.2.	76
Figura PM-15: Valoración de las señales FISH.	81
Figura PM-16: Posición de los microsatélites del cromosoma 15 utilizados en el estudio.	82
Figura R-1: Arbol genealógico de la familia con duplicación parcial de la región 3q29.	89
Figura R-2: Mapa de la duplicación parcial 3q29. En la parte superior se indican los locus de la región analizada.	89
Figura R-3: Arbol genealógico duplicación 5q35.	90
Figura R-4: Análisis FISH duplicación 5q35.	91
Figura R-5: Estudio familiar mediante STRs del cromosoma 15 en gemelos dicigóticos con síndrome de Angelman.	93

Figura R-6: Imagen de la cara interior de uno de los antebrazos de mostrando región hipopigmentada.	94
Figura R-7: Análisis mediante FISH con las sondas D15Z1/SNRPN/PML del cultivo de fibroblastos de la zona hipopigmentada materna.	95
Figura R-9: Árbol genealógico de la familia con duplicación Xq28.	98
Figura R-10: Hibridación in situ fluorescente en metafase con las sondas 1p36: AGRN (1pTEL), CDK11B/CDK11A/RH65426 (1p36).	100
Figura R-11: Mapa deleción parcial 1p36	100
Figura R-12: Metafase analizada con el MIX3 TotalVysion, con deleción de la sonda 3qter en uno de los cromosomas del par 3.	101
Figura R-13: Segregación familiar de una translocación entre un cromosoma 4 y un cromosoma 8 como causa de síndrome de Wolf-Hirschhorn.	102
Figura R-14: Análisis familiar mediante FISH con la sonda WHS localizada en la región crítica responsable del síndrome de Wolf-Hirschhorn.	103
Figura R-15: Cariotipo de la madre (46,XX,ins(16;10)(q22;p13p15.2).ish ins(16;10)(16qTEL013+,wcp10+;10pTEL006+))con una inserción en el cromosoma 16 de la región 10p15.1 como causa de un síndrome de DiGeorge tipo 2.	104
Figura R-16: Arbol genealógico de la familia con ins(16;10).	105
Figura R-17: Metafase, cariotipo y FISH de un paciente con síndrome de Klinefelter y síndrome de Angelman.	106
Figura R-18: Análisis mediante microsatélites del cromosoma 15 y del cromosoma X de un paciente con síndrome de Klinefelter y síndrome de Angelman.	106
Figura R-19: Árbol genealógico de la familia con síndrome de Potocki-Lupski.	107
Figura R-20: Mapa de los loci analizados mediante MLPA con la salsa P369 y la sonda utilizada en el estudio mediante FISH en una familia con duplicación <i>LLGL1</i> .	108
Figura R-21: Representación de la región involucrada en el síndrome de microdeleción/microduplicación 22q11.	108
Figura R-22: Gráfico con el número de pacientes identificados en cada una de las patologías.	111
Figura R-23: Gráfico representando el número de pacientes con anomalías identificadas en el presente estudio.	112
Figura D-1: Mapa del cromosoma 15. Los puntos de corte teloméricos BP1 y BP2 permiten distinguir entre dos tipos de deleciones en el síndrome de Angelman.	119

INTRODUCCIÓN

1. Reseña histórica.

Hasta el año 1956 había dos hechos que se creían en la citogenética humana: (i) El número de cromosomas en la especie humana era de 48 y (ii) El mecanismo de determinación del sexo XX-XY se asumía que era el mismo que en *Drosophila*, es decir la relación entre el número de cromosomas X y el número de autosomas determina el sexo del organismo.

Durante años las preparaciones cromosómicas obtenidas eran de muy baja calidad, incluso para poder identificar correctamente el número exacto de cromosomas. Dos nuevas técnicas, añadir colcemid al cultivo de células y el posterior tratamiento con una solución hipotónica, permitieron que en el año 1956 Tjio y Levan (Tjio y Levan, 1956) determinaran que el número de cromosomas en el hombre era de 46, en vez de 48 como se creía hasta entonces, lo que supuso el punto de partida de un desarrollo espectacular de los estudios cromosómicos humanos. Una vez determinado el número correcto de cromosomas, ciertos defectos congénitos específicos se asociaron claramente a determinadas anomalías cromosómicas. En 1979 Hsu (Hsu, 1979), divide la citogenética en cuatro eras atendiendo a diferentes eventos: (i) Era oscura, anterior a 1952, caracterizada por preparaciones cromosómicas de baja calidad. (ii) Era hipotónica (1952-1959), diferentes técnicas permitieron determinar el número correcto de cromosomas. (iii) Era trisómica, periodo comprendido entre 1959 hasta 1969, donde se identificaron pacientes con un número anómalo de cromosomas. (iv) Era del bandeo cromosómico (a partir de 1970), donde se pudo identificar cada par de cromosomas según un patrón, primero fluorescente y posteriormente mediante tinción selectiva con colorante tras tratamiento enzimático.

Atendiendo al tamaño y a la posición del centrómero los cromosomas se pudieron clasificar en varios grupos, permitiendo la identificación de anomalías numéricas como en el caso de la trisomía 21 en el síndrome de Down (Lejeune, 1959), 45,X en el síndrome de Turner (Ford, 1959), 47,XXY en el síndrome de Klinefelter (Jacobs y Strong, 1959), la trisomía 13 en el síndrome de Patau (Patau y cols., 1960) y la trisomía 18 en el síndrome de Edwards (Edwards y cols., 1960). El cromosoma Philadelphia, una anomalía estructural que involucra al cromosoma 9 y 22, se identificó en un paciente con leucemia mieloide crónica (LMC) y fue la

primera anomalía estructural identificada (Nowell P y Hungerford D, 1960). Actualmente la identificación de este reordenamiento en pacientes con LMC es fundamental para determinar el tratamiento adecuado. Durante la conferencia de Denver primero (1960) y posteriormente en la conferencia de Londres (1963) y en la conferencia de Chicago (1966) los cromosomas humanos en metafase se clasificaron en 7 grupos atendiendo a su tamaño y posición del centromero, desde la A hasta la G.

2. Técnicas de bandeado cromosómico.

Hasta los años 70 los cromosomas se teñían homogéneamente con colorantes que presentaban afinidad por la cromatina. Esta tinción si bien permitía identificar el número de cromosomas y clasificarlos en grupos, no permitía identificar posibles anomalías estructurales. Posteriormente se desarrollaron nuevas técnicas que daban lugar a un patrón alternativo de bandas a lo largo del cromosoma, permitiendo identificar cada par de cromosomas homólogos.

El tratamiento de las preparaciones cromosómicas con naranja de quinacrina permite obtener un patrón de bandas fluorescentes, bandas Q, que constituyeron el inicio del bandeado cromosómico (Caspersson y cols. 1970). Sin embargo, dado que la fluorescencia tiende a desaparecer con el tiempo y que no siempre se conseguía un buen patrón de bandas, esta metodología ha ido reemplazándose por otras.

Las bandas G se obtienen mediante una digestión enzimática, principalmente tripsina, y posterior tinción con Giemsa y es el método de rutina en los estudios citogenéticos (Drets y Shaw, 1971). Este método origina un patrón específico para cada par de cromosomas homólogos de bandas claras y oscuras. El nivel de resolución vendrá determinado por la calidad y longitud de los cromosomas. Existe una correlación entre las bandas claras y oscuras y la presencia de genes. Mientras que las bandas oscuras, ricas en A-T (adenina-timina), son de replicación tardía y pobres en genes, las bandas claras, ricas en G-C (guanina-citosina) son de replicación temprana y ricas en genes. Este patrón de bandas es permanente y permite identificar anomalías, como deleciones y duplicaciones, de un tamaño variable. Dependiendo de la calidad y longitud

cromosómica se consigue una resolución diferente. Para una resolución estándar de 550 bandas, con una calidad y longitud cromosómica baja-media, el nivel de resolución es de 5-8 Mb, mientras que para un patrón de 800 bandas, con una resolución media-alta, el nivel de resolución es de 3-5 Mb (Shaffer y cols., 2004).

Dado que en el patrón de bandas G el extremo de los cromosomas, los telómeros, eran difíciles de identificar generalmente al coincidir con una banda clara, se desarrolló un patrón, bandas R, que era la imagen especular de las bandas G y por tanto los extremos coincidían con una banda oscura. En consecuencia los telómeros se teñían con una banda oscura (Dutrillaux y Lejeune, 1971).

Las bandas C se consiguen con un pretratamiento con hidróxido de bario y tinción con Giemsa (Summer, 1972). Tiñen selectivamente la heterocromatina constitutiva, que está formada por ADN repetitivo, que permanece condensado durante la interfase del ciclo celular. Son especialmente útiles para identificar las regiones heterocromáticas polimórficas de los cromosomas 1, 9, 16 e Y. Permite identificar la presencia de cromosomas dicéntricos y la presencia de heterocromatina en cromosomas marcadores (pequeños cromosomas de origen desconocido con centrómero generalmente en mosaico).

Las regiones del organizador nucleolar (NORs) identificadas mediante tinción con plata (bandas NOR) revela los genes activos localizados en los brazos cortos (satélites) de los cromosomas acrocéntricos (Matsui y Sasaki, 1973). Contiene repeticiones en tándem de ADN que codifica para el ARN ribosómico. El número de NORs varía en la población y se trata de polimorfismos hereditarios, pudiéndose utilizar para identificar o determinar el origen parental de algún cromosoma.

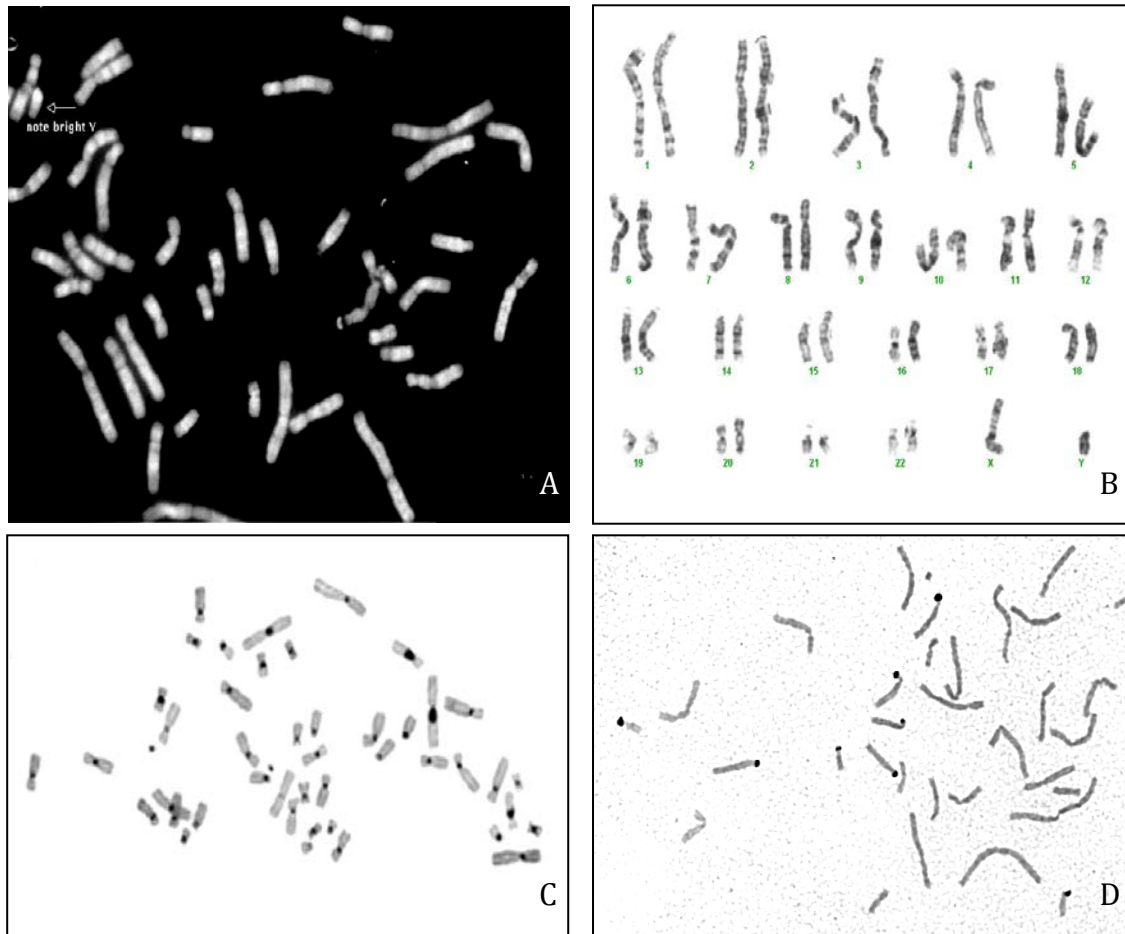


Figura I-1: A – Bando cromosómico Q. B – Bando cromosómico G. C – Bando cromosómico C. D – Bando cromosómico NOR. (Adaptada de Cytogenetics Gallery. UWMC Cytogenetics Laboratory. USA).

La aplicación de las técnicas de bandeo cromosómico se realiza sobre cromosomas en metafase, y por tanto es necesario que las células estén en división. Estas técnicas permiten analizar individualmente cada célula, identificando posibles anomalías cromosómicas a nivel de cada una de ellas y en consecuencia detectando posibles mosaicismos cromosómicos. Durante años las técnicas citogenéticas han sido las técnicas de referencia (*gold standard*) en la identificación de las anomalías cromosómicas numéricas y estructurales. Esto ha permitido identificar las anomalías cromosómicas asociadas a síndromes, como el síndrome de Down o trisomía 21, a procesos cancerosos y muy especialmente a procesos hematológicos, como la translocación 9;22 y la leucemia mieloide crónica (LMC).

A partir de los años 80 se introdujeron técnicas que aunaban las técnicas citogenéticas clásicas con las técnicas de biología molecular. La hibridación in situ fluorescente (FISH) ha permitido identificar anomalías cromosómicas con una mayor resolución y que no podían observarse con las técnicas de bandeo clásicas. La FISH es un tipo de hibridación que utiliza una secuencia de ADN marcado con un fluorocromo (sonda) complementario a una región cromosómica específica. Mediante esta técnica es posible localizar un locus o región cromosómica tanto en células en interfase como en preparaciones cromosómicas.

El cariotipo ha sido la técnica principal utilizada para el diagnóstico en pacientes con retraso mental y/o rasgos dismórficos. En los últimos años la genética humana ha sufrido un avance espectacular, lo que ha supuesto un cambio en nuestra comprensión del desarrollo humano y la causa de múltiples enfermedades de origen genético. Gracias al desarrollo de los análisis genómicos, la unión de la biología molecular y la citogenética, la aplicación de la informática a los análisis genéticos y la accesibilidad de la información en bases de datos *on line*, se han identificado nuevos genes, las mutaciones responsables de enfermedad y los mecanismos moleculares responsables, permitiendo nuevas estrategias diagnósticas, preventivas y terapéuticas en las enfermedades de base genética. Las enfermedades de base genética que suelen aparecer en edad pediátrica, presentan una alta morbimortalidad y discapacidad, son de una alta complejidad diagnóstica y pronóstica y necesitan de un seguimiento multidisciplinar. La identificación de la causa genética responsable de la enfermedad permite realizar mejores y más eficientes tratamientos terapéuticos y pronósticos. Así mismo permite identificar a familiares de riesgo y abordar un consejo genético y proponer nuevas técnicas diagnósticas como el diagnóstico prenatal o el diagnóstico genético preimplantatorio y realizar un consejo genético adecuado.

3. Técnicas de citogenética molecular – FISH.

Las técnicas de bandeo cromosómico clásicas tienen un nivel de resolución, en el mejor de los casos de 5-10 Mb, y por tanto es posible que ciertas anomalías cromosómicas con significado clínico no sean identificadas.

El principio de la FISH es la interacción, de una sonda de ADN o ARN de cadena simple marcada, con la secuencia de ADN diana complementaria de cadena simple. La presencia o ausencia de la secuencia de ADN diana puede demostrarse tanto en células en interfase como en cromosomas en metafase. Utilizando sondas específicas de una región o segmento cromosómico pueden analizarse diferentes secuencias diana. Las primeras sondas utilizadas se marcaban con un isótopo radioactivo (Gall y Pardue, 1969; John y cols., 1969). Posteriormente se utilizaron métodos indirectos de marcaje no fluorescente con moléculas como la biotina o la digoxigenina (Langer y cols., 1981). La identificación posterior de la localización de la sonda en la preparación se realiza con moléculas que presentan una gran afinidad por la molécula marcadora y que está unida a un fluorocromo. Actualmente las sondas se marcan con un fluorocromo que emite fluorescencia cuando se ilumina con luz UV a una longitud de onda determinada.

3.1. Aplicaciones clínicas de la FISH.

Actualmente hay una amplia variedad de sondas comerciales de FISH que cubren la mayoría de las regiones cromosómicas involucradas en procesos con repercusión clínica. Sin embargo, es posible sintetizar y marcar una sonda de una región cromosómica concreta para la que no hay disponibilidad comercial.

- i. Las aplicaciones clínicas de la FISH incluyen, la identificación y caracterización de anomalías cromosómicas numéricas y estructurales en niños con dismorfía y/o retraso mental. La identificación de la anomalía responsable del cuadro clínico es fundamental para proporcionar un consejo genético/reproductivo adecuado. Igualmente proporciona información del pronóstico y desarrollo de la enfermedad y puede identificar a familiares en riesgo, con el fin de diagnosticar a pacientes y ofrecer un diagnóstico prenatal o preimplantatorio.
- ii. Una de las aplicaciones de mayor éxito de la FISH es la identificación de cromosomas marcadores (pequeños cromosomas con centrómero que suelen presentarse en mosaico) que no son posibles caracterizar mediante técnicas citogenéticas clásicas. La

caracterización de estos cromosomas, identificando la presencia de regiones eucromáticas, permiten predecir una posible repercusión clínica.

- iii. Siempre que haya disponibilidad de una sonda, la FISH puede ser de gran ayuda en la comprobación y validación de anomalías identificadas mediante otras técnicas, en especial MLPA (Amplificación múltiple de sondas ligadas, *Multiple ligation probe amplification*) o CGH (Hibridación Genómica Comparada, *Comparative Genome Hybridization*) y más recientemente array-CGH. Igualmente permite realizar estudios familiares con el fin de identificar posibles reordenamientos que justifiquen la anomalía.
- iv. Ciertos tumores presentan anomalías cromosómicas características. La identificación de alteraciones cromosómicas en ciertos tumores puede ser fundamental en el diagnóstico, pronóstico, seguimiento e incluso tratamiento. En especial en procesos hematológicos donde ciertas anomalías cromosómicas, tanto numéricas como estructurales, son características de una enfermedad hematológica concreta.
- v. La identificación de microdeleciones y microduplicaciones de regiones cromosómicas en pacientes con dismorfia y/o retraso mental, en especial aquellas diagnosticadas por técnicas de biología molecular, y el estudio familiar que permita descartar posibles reordenamientos de la región de interés, mapeo genético y estudios de evolución del cariotipo.
- vi. Una de las principales aplicaciones es el diagnóstico prenatal de las principales aneuploidias o el diagnóstico preimplantatorio tanto de aneuploidias como de dotaciones en desequilibrio en casos de reordenamientos familiares.

3.2. Tipos de sondas FISH.

Las sondas de ADN, usadas para FISH, pueden clasificarse en tres categorías principales:

3.2.1. Sondas de las regiones centroméricas (CEP) y satélites.

Las secuencias satélites son secuencias de ADN repetitivo en el genoma que no codifica para ningún producto génico y que son polimórficas. Diferentes individuos tienen variación en el número de copias de estas secuencias de ADN. El ADN alfa-satélite es un monómero de ADN de 171 pares de bases que se repite N veces en tándem. Los centrómeros cromosómicos presentan bloques de este ADN repetitivo. La mayoría de este ADN es idéntico en todos los cromosomas humanos. Sin embargo, el 2-3% del ADN es variable permitiendo realizar sondas específicas para cada centrómero consiguiéndose la identificación individual de cada uno de ellos. La excepción la constituye los centrómeros de los cromosomas 13 y 21 y de los cromosomas 14 y 22 que no pueden distinguirse entre ellos utilizando sondas centroméricas. Otro tipo de ADN satélites incluye el beta-satélite, constituido por repeticiones de 68 pares de bases y que se localizan en los extremos del brazo corto de los cromosomas acrocéntricos 13, 14, 15, 21 y 22. El ADN satélite I es una repetición AATGG que se localiza en la región pericentromérica de los cromosomas 1, 9, 16 y en la región terminal del cromosoma Y. Las regiones teloméricas de los extremos de los brazos cortos y largos de todos los cromosomas está constituido por una secuencia repetitiva TTAGGG, y por tanto una sonda con esta secuencia permite identificar simultáneamente los telómeros de todos los cromosomas.

Las sondas de secuencias repetitivas permiten enumerar uno o varios cromosomas específicos, tanto en metafase como en células en interfase y por tanto determinar la aneuploidía de una célula o una muestra. Dado que las secuencias dianas son largas y están altamente repetidas, las sondas de este tipo permiten una identificación rápida y de buena calidad de la señal fluorescente. Este tipo de sondas se vienen aplicando en el diagnóstico rápido prenatal de las principales aneuploidias cromosómicas en células de líquido amniótico o vellosidades coriales no cultivadas, y más recientemente en el diagnóstico

preimplantatorio en uno o varias blastómeras, obteniéndose un diagnóstico en apenas unas horas.

3.2.2. Sondas de pintado cromosómico (*Whole Chromosome Painting - WCP*)

Las sondas de pintado cromosómico están compuestas por numerosas secuencias únicas y repetitivas para un cromosoma específico completo. Diferentes técnicas han permitido sintetizar este tipo de sondas, como citometría de flujo, microdissección y posterior amplificación mediante PCR de un cromosoma concreto. Estas sondas están diseñadas para su aplicación exclusivamente en preparaciones cromosómicas en metafase, dado que en interfase la señal de hibridación se dispone dispersa por el núcleo debido a la descondensación cromosómica. Su mayor aplicación consiste en la identificación de anomalías cromosómicas estructurales.

Actualmente se disponen de sondas comerciales para cada brazo cromosómico, pudiendo identificarse reordenamientos entre cromosomas o entre múltiples cromosomas y entre brazos cromosómicos.

3.2.3. Sondas Locus específico (LSI)

Las sondas de secuencia única son complementarias a regiones no repetidas a lo largo del genoma y que pueden codificar para un gen. En la actualidad hay múltiples sondas LSI a lo largo de todo el genoma que permite identificar microdeleciones/microduplicaciones cromosómicas, presencia/ausencia o amplificación de oncogenes como N-MYC o Her2/neu o secuencias únicas subteloméricas que posibilitan determinar posibles reordenamientos crípticos.

La FISH permite realizar hibridación con múltiples sondas, pudiéndose combinar sondas de varios tipos y cuya única limitación es la disponibilidad de fluorocromos que permita identificar inequívocamente cada secuencia cromosómica. Así es posible realizar simultáneamente hibridación con sondas

LSI/CEP siempre que utilicemos diferente fluorocromo que nos permita identificar la localización de cada sonda.

La sensibilidad de la FISH depende de múltiples factores. Uno de los factores que más influye en la calidad de la señal de hibridación es el tipo celular. Los linfocitos en sangre periférica parecen las células que han demostrado un mejor comportamiento ante diferentes tipos de sondas. Las células de líquido amniótico y vellosidades coriales no cultivadas son utilizadas para el diagnóstico prenatal rápido de las principales aneuploidias consiguiéndose buenos resultados, si bien dependiendo de la semana de gestación es posible que sea necesario un pretratamiento de la muestra previo a la hibridación. Los tipos celulares más problemáticos son los derivados de tejidos tumorales o de tejido fijados en parafina, y de su estado de conservación.

Las características de las diferentes tipos de sondas hacen que las del tipo centromérica den buenos resultados en un periodo corto de hibridación, mientras que las LSI presentan mayores dificultades y requieren de muestras de buena calidad. Bajo condiciones óptimas de hibridación, utilizando sondas centroméricas, se pueden conseguir señales de hibridación adecuadas con tan solo 30 minutos de hibridación. Esto permite realizar un diagnóstico en 1-1:30 hrs. tras la obtención de la muestra. Evidentemente esto solo es aplicable cuando existe una clara sospecha clínica de aneuploidia de un cromosoma concreto. La aplicación en el diagnóstico prenatal de las trisomías 13 y 18 ha permitido identificar fetos con esta anomalía en periodos extraordinariamente cortos y por tanto tomar decisiones con una mayor información dentro de los plazos legales.

La sensibilidad de la FISH está muy influenciada por el tiempo de las preparaciones cromosómicas y el modo en el que se han conservado. Los mejores resultados se obtienen a partir de buenas preparaciones cromosómicas, ausencia de citoplasma, cromosomas largos y bien fijados ... Sin embargo, es posible obtener nuevas preparaciones cromosómicas a partir de las soluciones celulares en carnoy que se han conservado durante años.

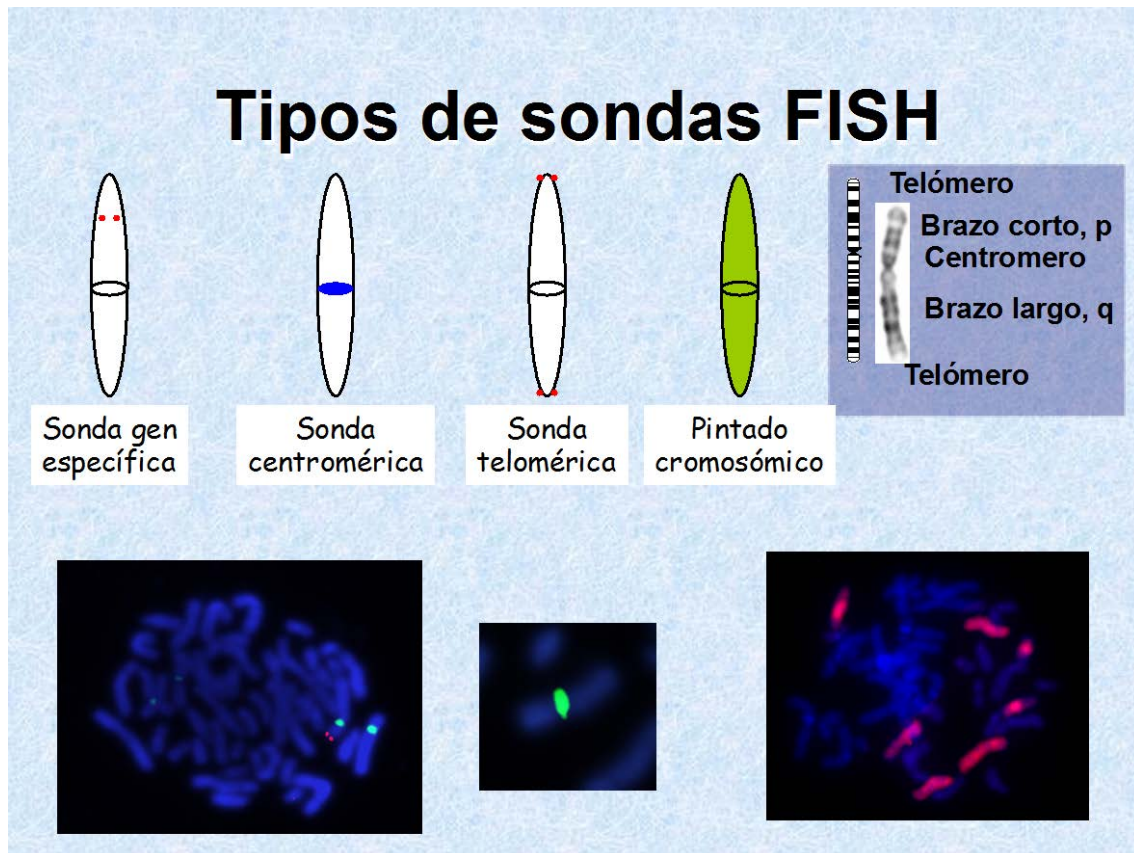


Figura I-2: Tipos de sondas utilizadas en FISH. Inferior izquierda hibridación con sonda LSI. Inferior centro sonda centromérica. Inferior derecha hibridación con WCP.

4. Técnicas de citogenética molecular – mFISH y SKY.

El cariotipo espectral (*spectral karyotyping*, SKY)(Schröck y cols., 1996) y el FISH múltiple (mFISH)(Speicher, y cols 1996), son técnicas de citogenética molecular, basadas en el mismo principio, que permiten la visualización simultánea de todos los pares cromosómicos en diferentes colores. El SKY y el mFISH consisten en la preparación de una “librería” de sondas de pintado cromosómico para cada par cromosómico. Cada sonda es marcada con un fluorocromo diferente para cada cromosoma. Las sondas hibridarán con su secuencia específica en la preparación cromosómica. Mediante un sistema informático es posible analizar el resultado de la hibridación. Dada la limitación en el número de fluorocromos espectrales, los diferentes colores se obtienen

mediante combinación de los diferentes fluorocromos disponibles. Ambas técnicas son unas herramientas diagnósticas importantísimas en los estudios constitucionales de cromosomas marcadores y de intercambios cromosómicos que no pueden ser identificados mediante técnicas de citogenética convencional. La identificación de estas anomalías es fundamental para determinar los riesgos de un posible fenotipo anómalo y muy especialmente en el diagnóstico prenatal. En el diagnóstico prenatal determinar con exactitud las regiones cromosómicas implicadas puede proporcionar información fundamental sobre los potenciales efectos sobre el fenotipo y del desarrollo y por tanto tomar decisiones con una mayor información.

Mediante mFISH/SKY es posible identificar claramente anomalías intercromosómicas, tales como translocaciones o reordenamientos complejos. Sin embargo, no es posible diagnosticar anomalías intracromosómicas o pequeñas deleciones y duplicaciones. El nivel de resolución depende de la calidad de las extensiones cromosómicas y de la calidad de la hibridación y puede oscilar entre 500-2000 kb.

4.1. Elementos de SKY.

SKY combina la espectrofotometría de Fourier, imagen digital (CCD) y microscopía óptica para medir el espectro de emisión, en el rango del visible y cercano al infrarrojo, simultáneamente en todos los puntos de la muestra. Esto permite la utilización de múltiples sondas marcadas con fluorocromos espectrales. Las fases principales de SKY son: hibridación, obtención de imágenes y análisis de los resultados.

4.1.1. Hibridación: Las sondas de pintado SKY hibridan con las metafases seleccionadas. Las sondas SKY son sintetizadas a partir de muestras cromosómicas enriquecidas mediante citometría de flujo y posterior amplificación mediante PCR con oligos específicos. Las sondas SKY se marcan mediante la combinación de cinco fluorocromos diferentes.

#	FITC	SpeOra	TexRed	Cy5	DEAC
1				Yellow	
2					Cyan
3			Magenta		
4	Green				
5		Red			
6	Green			Yellow	
7				Yellow	Cyan
8			Magenta	Yellow	
9		Red		Yellow	
10	Green				Cyan
11	Green		Magenta		
12	Green	Red			
13			Magenta		Cyan
14		Red			Cyan
15		Red	Magenta		
16	Green			Yellow	Cyan
17	Green		Magenta		
18	Green	Red		Yellow	
19			Magenta	Yellow	Cyan
20		Red		Yellow	Cyan
21		Red	Magenta	Yellow	
22	Green		Magenta		Cyan
X	Green	Red			Cyan
Y		Red	Magenta		Cyan

Figura I-3: Combinación de los fluorocromos.

- 4.1.2. Obtención de imágenes: En esta fase se mide todo el espectro visible emitido por las sondas con el fin de obtener una imagen espectral de los cromosomas. La imagen espectral es capturada por una cámara CCD previo a su paso por filtros específicos. El espectro de emisión se convierte a colores de visualización asignando los rangos de emisión espectral a los tres colores básicos: azul, rojo y verde. Estos colores de visualización permiten una primera evaluación de la calidad de la hibridación. Para evitar los efectos de solapamiento del espectro es necesario realizar una transformación de Fourier que permite obtener un único espectro proporcionando una sola imagen.
- 4.1.3. Análisis de los resultados: un programa informático permite analizar cada espectro cromosómico específico.

SKY es una herramienta que ha demostrado seguridad, sensibilidad, y alta resolución. Especialmente significativo ha sido su aportación en la detección de reordenamientos complejos en procesos hematológicos. SKY presenta una mayor resolución que las técnicas de citogenética clásica y frente a técnicas como los aCGH es una técnica más apropiada para la identificación de poliploidías, mosaicismos de bajo nivel (<20%) o reordenamientos equilibrados. La Universidad de Jena, Alemania, ha publicado una base de datos (<http://www.uniklinikum-jena.de/fish/sSMC.html>) que permite relacionar el

fenotipo y cromosomas marcadores identificados. SKY es una potente herramienta diagnóstica, aunque es necesario utilizarla siempre complementada con otras técnicas.

5. Técnicas de citogenética molecular – PNA-FISH

Los PNAs (*Peptide Nucleic Acid*) son ADNs miméticos en los que el grupo fosfato de la desoxirribosa es sustituido por un péptido no cargado (Nieslen y cols., 1991). Esta nueva configuración proporciona una serie de propiedades, como mejores tasas de hibridación, resistencia a nucleasas y proteasas y la posibilidad de penetrar en estructuras biológicas complejas. El eje no cargado de PNA proporciona una unión fuerte entre las cadenas de PNA/ADN o PNA/ARN y una mayor especificidad en la interacción entre los componentes del ADN. Se ha demostrado que PNA se une con una mayor afinidad que la cadena complementaria, siguiendo las normas de apareamiento de Watson y Crick. Este alto grado de especificidad indica que sondas PNA cortas constituyen una herramienta eficiente para detectar secuencias de ADN específicas en cortos periodos de hibridación.

Mediante PNA es posible identificar las secuencias repetitivas teloméricas (Lansdorp y cols., 1996). La disponibilidad de sondas PNA centroméricas permite determinar el número de cromosomas tanto en metafase como en interfase, y dada las características de las cinéticas de hibridación, es posible obtener resultados en poco tiempo, lo que las hace muy útiles en la aplicación al diagnóstico prenatal o en el diagnóstico genético preimplantatorio de las aneuploidias cromosómicas (Taneja y cols., 2001).

Actualmente la disponibilidad de sondas PNA comerciales es escasa y dado que su producción es, aún, costosa su aplicación en citogenética clínica es limitada.

6. Técnicas de citogenética molecular – ODN-FISH

La mayoría de las sondas utilizadas en FISH derivan de fragmentos de ADN tales como plasmidos, BACs (*Bacterial Artificial Chromosomes*) o YACs (*Yeast Artificial Chromosomes*). Para aquellos casos en los que es necesario definir el

número de cromosomas a partir de secuencias repetitivas centroméricas es posible utilizar pequeños oligonucleótidos sintéticos (*ODN, Oligo DesoxiNucleótido*)(Matera y cols., 1993).

La utilización de sondas sintéticas de oligonucleótidos permiten mejores cinéticas de hibridación, mayor consistencia y a menor coste. Uno de los mayores beneficios es la posibilidad de combinar múltiples secuencias en la preparación de la sonda, permitiendo buenas señales de hibridación en periodos tan cortos como 5 minutos de hibridación frente a las 16 horas necesarias para los casos en los que se utilizan sondas de mayor complejidad. Una de las limitaciones es que al tratarse de sondas de pequeño tamaño se reduce el número de marcajes que puede incorporar y por tanto reduce su sensibilidad que se compensa con las miles de veces que puede estar presente, como en la región satélite III del cromosoma Y.

7. MLPA (*Multiple Ligation Probe Amplification*).

En 2002 MRC-Holland desarrollaron la MLPA (*Multiple ligation probe amplification*) como un método de detección de variaciones en el número de copias de regiones concretas (Eldering E y cols., 2003). Aunque la MLPA no puede utilizarse como método para estudiar el genoma completo, presenta una serie de ventajas con respecto a otras técnicas. La MLPA permite detectar deleciones/duplicaciones u otras variaciones en el número de copias (CNVs) de tamaño medio, pudiéndose analizar más de 45 secuencias simultáneamente en una única reacción. Requiere de un mínimo entrenamiento, permite un alto rendimiento y puede completarse en dos días. Frente a los aCGH, requiere de menor cantidad de ADN y si no fuese necesario estudiar todo el genoma puede diseñarse el estudio de una región concreta caracterizándola a mayor resolución. MLPA proporciona una información segura y no es esperable resultados de significado incierto.

La reacción de MLPA se realiza en un único tubo de reacción, y consiste en los siguientes pasos: hibridación de las sondas con las secuencias dianas complementarias, ligación de las sondas unidas, amplificación mediante PCR de las sondas ligadas, electroforesis capilar y análisis.

Es recomendable una cantidad de 20-500 ng de ADN, aunque se han obtenido resultados a partir de células lisadas mediante proteinasa K directamente obtenidas de vellosidades coriales o líquido amniótico. Para el análisis es necesario un ADN control normal que idealmente debe obtenerse del mismo tipo de tejido y bajo las mismas condiciones que el de la muestra a analizar.

Cuando se obtiene un resultado positivo, en especial en el análisis de enfermedades monogénicas, es recomendable la comprobación con un segundo análisis o mediante un método alternativo. En los casos que disminución de señal en una única sonda, podría ser necesaria la secuenciación de la región para descartar cambio en uno o unos pocos nucleótidos que sean responsables de la reducción de la señal.

La detección de mosaicismos es un factor determinante, es especial en el diagnóstico prenatal. Diversos estudios han descrito la detección de mosaicismos del 25% al 35% en el caso de deleciones, mientras que para casos con duplicaciones el grado de mosaicismos era del 40%, indicando que las deleciones en mosaico parecen ser más sensibles a ser detectadas que las duplicaciones en mosaico (Van Veghel-Plandsoen MM y cols., 2011). En general, mediante MLPA es posible detectar mosaicismos de al menos 20% al 30% mientras que por debajo de estos niveles resulta difícil detectarlos, similares a los detectados por otras técnicas moleculares. Por el contrario, mediante FISH o cariotipo es posible detectar mosaicismos de muy bajo nivel, dependiendo del número de células analizadas.

La MLPA se ha mostrado como una técnica eficaz en la detección tanto prenatal como postnatal de regiones subteloméricas, regiones centroméricas y de regiones involucradas en microdeleciones y microduplicaciones recurrentes. Especialmente en casos de fetos con malformaciones ecográficas compatibles con alguno de los síndromes que incorpora las diferentes kits SALSA MLPA, incluso en el diseño específico para detectar reordenamientos familiares en desequilibrio (Faas BH y cols., 2008; Grati FR y cols., 2008).

Una gran ventaja de los estudios de microdelección mediante MLPA es la fácil interpretación y predicción de las consecuencias clínicas dado que existe una buena definición de los fenotipos asociados a estos síndromes, aunque para alguno de ellos encontramos variabilidad clínica que puede complicar el consejo genético.

Sin embargo, para los casos de microduplicación o anomalías subteloméricas es posible que no podamos predecir con claridad el fenotipo y esto es especialmente problemático en el diagnóstico prenatal.

Mediante MLPA, con un conjunto de sondas centroméricas y teloméricas es posible identificar cromosomas marcadores supernumerarios que suponen un problema de interpretación importante durante los estudios citogenéticos, especialmente prenatales. Dado que estos cromosomas marcadores pueden estar en mosaico, o presentar cierta inestabilidad en cultivo, puede proporcionar información que no sea posible obtener por otras técnicas (Van Opstal D y cols., 2011).

En aquellas familias con una enfermedad monogénica con mutación conocida es posible diseñar un kit SALSA MLPA específico, consistente en un conjunto de sondas diseñadas para identificar la mutación familiar previamente observada por otros métodos y aplicarlo en el diagnóstico prenatal o en el estudio del resto de familiares (Concolino E y cols., 2009).

MLPA viene utilizándose como método seguro en el estudio de anomalías genéticas. Sin embargo, no todos los kits disponibles tienen la autorización europea CE o la autorización de la FDA de los Estados Unidos lo que obliga a cada laboratorio a realizar sus propios controles de validación. Es previsible que desde la primera autorización CE en agosto de 2014 de los primeros kits SALSA MLPA, nuevos kits se sumen a esta autorización europea (www.mlpa.com Newsletter 5(3), 2014).

8. Hibridación Genómica Comparada (CGH).

La hibridación genómica comparada (CGH) es un método diseñado para identificar anomalías en el número de copias en segmentos cromosómicos. Desde los años 90 se vienen realizando grandes esfuerzos para aumentar la resolución de esta tecnología. En este sentido un gran avance ha sido la utilización de ADN diana inmovilizado en formato array en vez de utilizar las preparaciones de cromosomas en metafase. El principio de esta técnica se basa en marcar el ADN control (con una dotación genómica normal) y el ADN del paciente con diferentes fluorocromos, combinar las muestras marcadas a igual concentración y co-hibridar sobre una

matriz con ADN genómico. Ambas muestras de ADN compiten para unirse al ADN fijado, y la intensidad de la fluorescencia de cada punto es reflejo de las cantidades relativas de cada muestra.

Esta técnica permite identificar pérdidas y/o ganancias de material genético. Sin embargo, no permite estudiar la estructura genómica de la muestra a analizar. De tal modo, no es posible identificar reordenamientos equilibrados donde no hay pérdidas o ganancias de material genético.

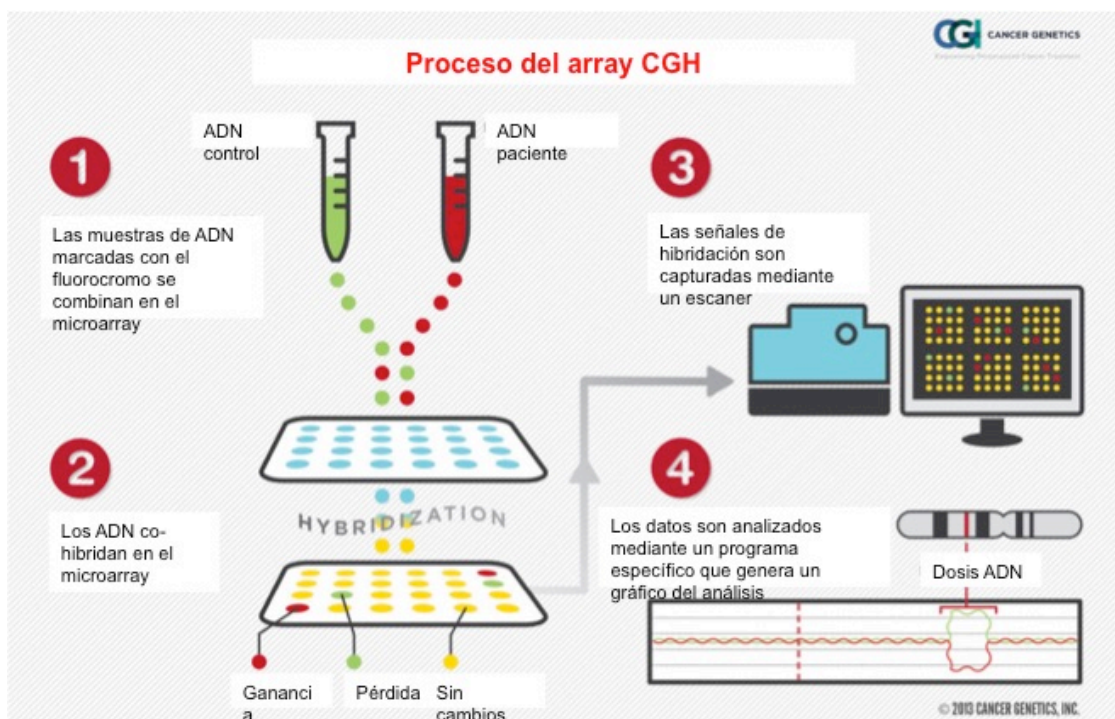


Figura I-4: Procedimiento del arrayCGH.

Inicialmente el CGH se desarrolló para detectar cambios en el número de copias de segmentos cromosómicos en células cancerosas. Actualmente se utiliza como una herramienta útil y eficaz en la aplicación clínica.

Desde su desarrollo inicial diferentes aplicaciones vienen utilizándose del CGH:

- i. Aplicación en cáncer: numerosos estudios han demostrado su utilidad para detectar cambios en el número de copias en células cancerosas, permitiendo identificar cambios que habrían pasado desapercibidos con los estudios clásicos. Especialmente útil se ha mostrado en procesos hematológicos, donde el cultivo de células

leucémicas puede resultar especialmente complicado (Schwaenen C y cols., 2004).

- ii. Aplicación en enfermedades genéticas: deleciones y duplicaciones de segmentos cromosómicos se asocian a enfermedades genéticas. Mediante esta técnica ha sido posible delimitar las regiones involucradas en este tipo de síndromes. Esta técnica ha sido de gran valor en la identificación del número de copias de segmentos específicos en pacientes con cariotipo normal y retraso mental (Shaw-Smith C y cols., 2004; Klein OD y cols., 2004).
- iii. Aplicación en genética de poblaciones: Una de las nuevas aplicaciones es la caracterización de variaciones de ADN a gran escala. La identificación de variaciones en el número de copias a lo largo del genoma, y especialmente en localizaciones cercanas a ciertos loci relacionados con cáncer, sugiere que ciertos individuos podrían tener una mayor susceptibilidad a cáncer u otras enfermedades que otros (Sebat J y cols., 2004).
- iv. Aplicación en estudios de evolución: comparando las variaciones el número de copias entre ADN de dos o más especies es posible realizar estudios evolutivos. Así por ejemplo en la comparación entre el ADN del hombre y ADN de simio se han identificado 63 localizaciones con diferencias en el número de copias, o reconocer genes pertenecientes a una línea evolutiva concreta (Fortna A y cols., 2004).
- v. Aplicación en el diagnóstico clínico: el diagnóstico genético mediante el análisis de ADN tiene diversas ventajas: es estable, relativamente fácil de transportar y puede obtenerse de muestras de bloques de parafina, lo que permite realizar estudios de muestras antiguas o de pacientes no disponibles. Por otra parte es posible comparar diferentes tejidos y detectar variaciones entre tejidos sanos y afectos.

Dada la resolución de los estudios citogenéticos clásicos, los aCGH se han diseñado y aplicado en pacientes con retraso mental, anomalías congénitas y retraso del desarrollo y últimamente en la detección de

embriones con anomalías (Bejjani BA y cols., 2005; Cheung SW y cols., 2005; Wilton L y cols., 2001).

Recientemente se ha descrito una alta frecuencia de microdeleciones y microduplicaciones patogénicas en pacientes con retraso del desarrollo, déficit intelectual o trastornos de espectro autista (Nicholl J y cols., 2014).

A pesar de la indudable utilidad de los aCGH la aplicación al diagnóstico prenatal puede presentar problemas de interpretación de resultados, controles de calidad y aspectos éticos, lo que ha llevado a una moratoria en la utilización de esta técnica en los diagnósticos prenatales de rutina.

La introducción en los estudios de rutina es previsible que favorezca la reducción de costes, la estandarización de protocolos, desarrollo de programas de análisis específicos y una relación fenotipo-genotipo clara y segura. De hecho esta técnica se ha sugerido como la técnica que sustituirá progresivamente a las técnicas clásicas (Manning M y cols., 2010).

Actualmente el nivel de resolución de los aCGH se ha incrementado considerablemente, llegando a nivel de un único nucleótido. La limitación de los aCGH en detectar inversiones o translocaciones equilibradas parece que podría resolverse, al menos en aquellos reordenamientos equilibrados más frecuentes con puntos de rotura recurrentes.

9. Síndromes de microdeleciones y microduplicaciones.

Las características clínicas de los síndromes de microdeleciones / microduplicaciones son muy diversas y complejas. Muchos de estos síndromes son altamente discapacitantes con malformaciones mayores de órganos, tales como anomalías cardíacas congénitas. Ciertos síndromes presentan anomalías cardíacas características, por ejemplo el síndrome de Williams (delección 7q11) presenta estenosis aórtica supravalvular y estenosis pulmonar periférica, la delección 22q11.2 (síndrome de DiGeorge/Velocardiofacial) se asocia a malformaciones cardíacas conotruncuales, como tetralogía de Fallot, truncus arteriosus e

interrupción del arco aórtico y la deleción 8p23.1 que se asocia a defectos del septo atrioventricular o estenosis pulmonar con defecto del septo atrial.

Una facies característica es frecuente para un síndrome específico y suele ser un indicio diagnóstico. Al igual que en la mayoría de las anomalías cromosómicas, estos síndromes suelen presentar retraso del crecimiento y del desarrollo. Estos retrasos pueden variar desde una presentación leve (como en el síndrome velocardiofacial) a una presentación severa (en el síndrome de Angelman). Los trastornos del comportamiento son frecuentes. Quizás uno de los mejor estudiados es el síndrome de Williams, asociado a un comportamiento “amigable” con pérdida de habilidades sociales. El síndrome de Smith-Magenis o la deleción 8p23.1 suelen asociarse a trastornos del sueño y autolesión o el síndrome de Prader-Willi con tendencia a la obesidad y un mayor riesgo de enfermedad psiquiátrica.

Por tanto los síndromes de microdeleciones / microduplicaciones presentan un amplio rango de manifestaciones fenotípicas lo que implica la participación de especialistas de diferentes campos. De hecho la mayoría de estos síndromes se han identificado previamente por el genotipo a diferencia de por un enfoque basado en el fenotipo. Mediante un enfoque basado en el fenotipo el clínico seleccionaba una serie de pacientes con un cuadro clínico común. Sin embargo, este tipo de enfoque requiere de tiempo y de que un determinado síndrome tenga un fenotipo consistente entre diferentes pacientes. Por el contrario el enfoque basado en el genotipo identifica pacientes con la misma alteración genómica o al menos que se solape y describir el síndrome. Los pacientes, en este caso, suelen presentar características diferentes y generalmente no pueden agruparse exclusivamente a su presentación clínica.

9.1. Causas de las microdeleciones / microduplicaciones.

Una vez identificados los síndromes de microdeleciones / microduplicaciones, se observó que la región cromosómica involucrada en la mayoría de los pacientes para un determinado síndrome tenía un tamaño uniforme. Esto implicaría que en la región hay una característica estructural

cromosómica subyacente que confiere una predisposición a la pérdida/ganancia de pequeños fragmentos cromosómicos.

Se han propuesto tres mecanismos posibles:

9.1.1. Recombinación homóloga no alélica (*NAHR, non-allelic homologous recombination*), en reordenamientos recurrentes.

Se ha observado la presencia de repeticiones de bajo número de copia región específica (*region-specific low-copy repeats, LCRs*) que flanquean la mayoría de las microdelecciones / microduplicaciones. Se ha demostrado que la causa de las deleciones, y sus duplicaciones recíprocas, son debidas a recombinaciones homólogas no alélicas tanto entre cromosomas homólogos como entre cromátidas hermanas. Los reordenamientos entre dos cromosomas homólogos son debidos a un entrecruzamiento desigual durante la meiosis I en LCRs parálogas.

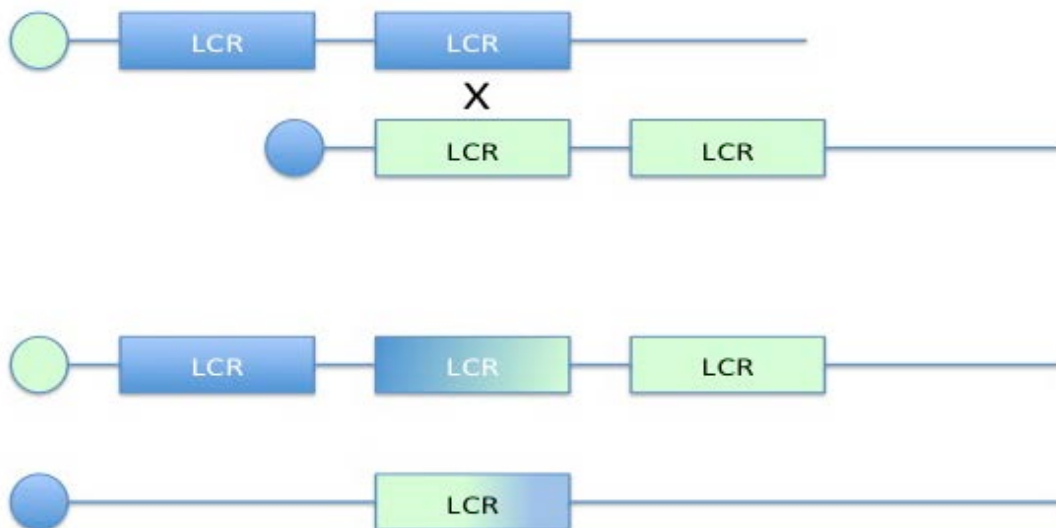


Figura I-5: Recombinación homóloga no alélica entre cromosomas homólogos. Los cuadros representan secuencias LCRs. Se ha elegido diferente color para representar los cromosomas homólogos. Como consecuencia de un entrecruzamiento desigual entre dos secuencias LCR se origina un cromosoma con deleción y su homólogo con duplicación.

Los reordenamientos intracromosómicos pueden deberse a varios mecanismos: mal apareamiento de LCR con desigual intercambio de cromátidas hermanas o la formación de un lazo (*loop*) intracromosómico en una de las

cromátidas. Aunque los reordenamientos intracromosómicos pueden originarse tanto en meiosis como postzigóticamente, el hecho del escaso número de pacientes con síndromes de microduplicación /microdelección en mosaico hace pensar que probablemente la mayoría de los casos tengan un origen meiótico.

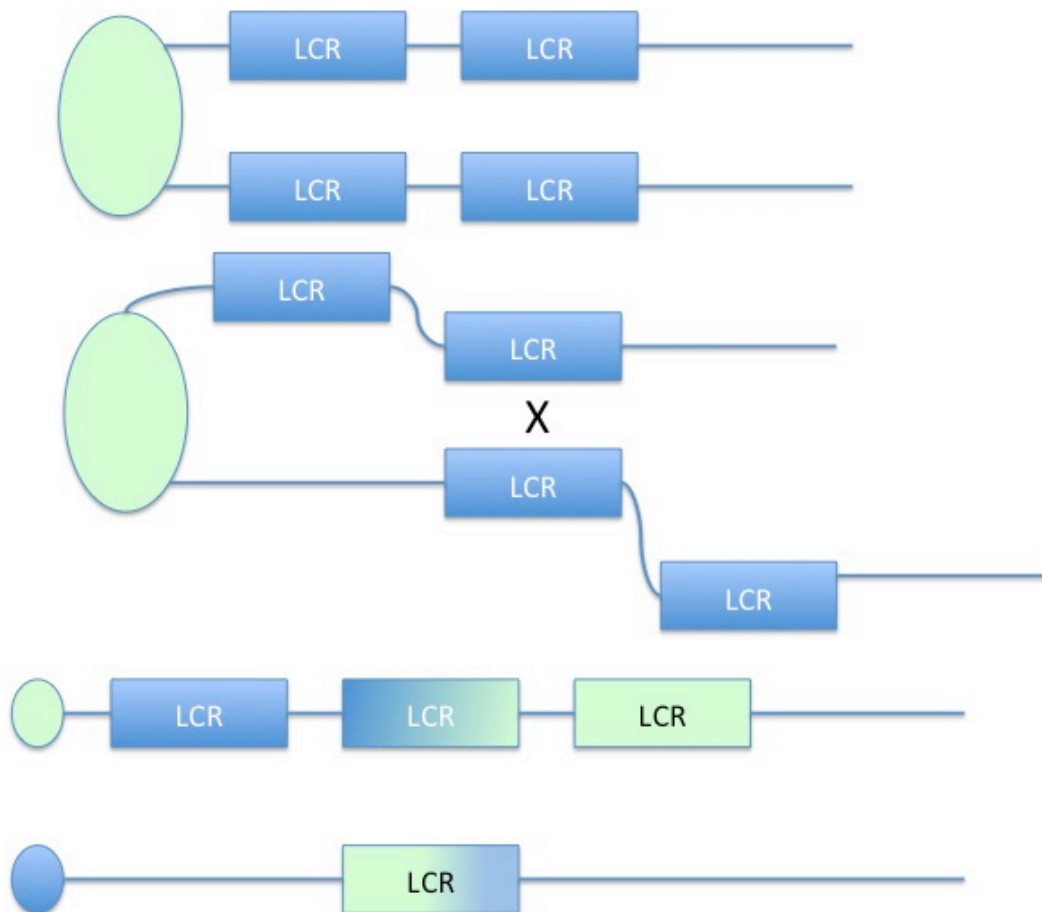


Figura I-6. Recombinación intracromosómica. Intercambio desigual entre cromátidas hermanas.

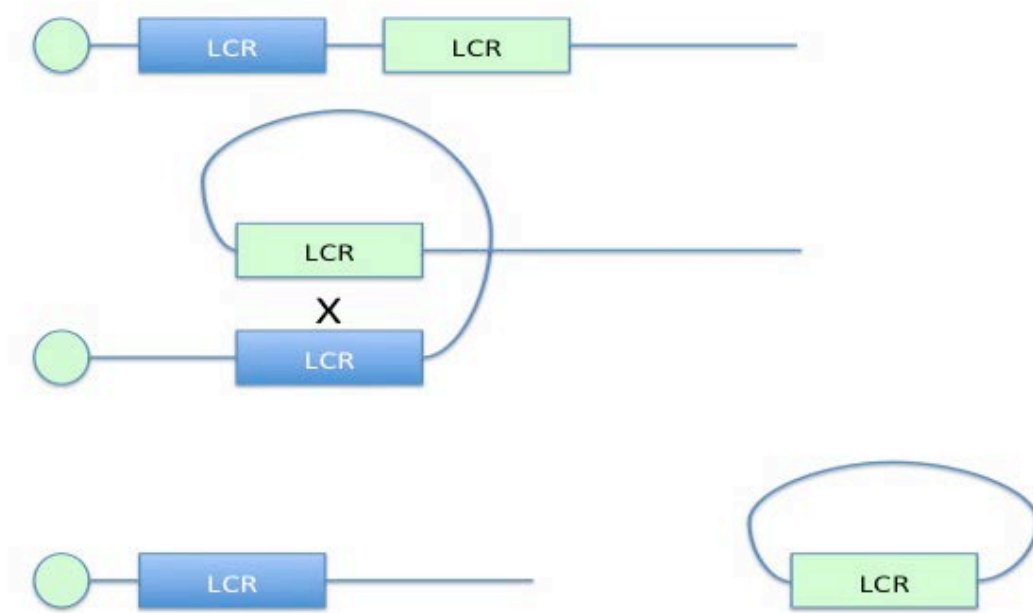


Figura I-7. Recombinación intracromosómica. Formación de un lazo (*loop*) intracromosómico.

En el caso en que las LCRs estén en orientaciones opuestas en el mismo cromosoma, la recombinación homóloga no alélica puede dar lugar a inversiones.

Si la recombinación homóloga no alélica tiene lugar entre dos LCRs localizadas en cromosomas diferentes daría lugar a una translocación cromosómica.

La recombinación homóloga no alélica entre cromosomas homólogos origina dos tipos de productos, una delección y una duplicación. Sin embargo, la duplicación es mucho menos frecuente que su producto recíproco, la delección. Los primeros pacientes identificados con duplicaciones fueron para las regiones 22q11, 15q11-q13, y 17p11.2-12. Es posible que el hecho de identificar un menor número de pacientes con duplicaciones se relacione con un efecto letal, aún cuando el fenotipo de éstas es menos severo que su recíproca delección. Por el contrario, es posible que el fenotipo sea leve y no requiera de una especial atención médica. Aunque se ha demostrado la fertilidad de ciertos pacientes con duplicación, es factible que ésta esté reducida y por tanto no pase a generaciones sucesivas y por tanto no sea detectada en los programas de cribado actuales.

El tamaño de las secuencias LCRs que flanquean las regiones frecuentemente delecionadas varía entre 200 y 500 kb y presentan una homología >95%. Por otra parte se han detectado pequeñas secuencias parálogas (secuencias homólogas separadas por un proceso de duplicación) dentro de estas regiones delecionadas. Concretamente se han identificado este tipo de secuencias en las regiones que afectan al síndrome de DiGeorge/VCF (22q11.2), Smith-Magenis (17p11.2), Prader-willi/Angelman (15q11-q13) y neurofibromatosis tipo 1(17q11.2). La presencia y tamaño de estas secuencias parálogas influyen en un mal alineamiento meiótico y en un posterior entrecruzamiento desigual.

El origen parental de estos reordenamientos es diverso. En ocasiones el origen es tanto materno como paterno, por ejemplo el síndrome de Williams. En otras el origen es preferentemente paterno, como en el síndrome de Sotos, o de origen materno como la deleción 8p. Esta situación podría explicarse por las diferentes tasas de recombinación a lo largo del genoma y las diferencias entre varón y mujer, con zonas especialmente propensas a recombinación sexos específicas.

En padres de afectos de ciertos síndromes de microdeleción/microduplicación se ha observado la presencia de inversiones polimórficas entre las LCRs que flaquean las regiones implicadas en el reordenamiento. Así, todas las madres con niños con la deleción del gen del receptor olfativo presentan una inversión polimórfica en el brazo corto del cromosoma 8. Un polimorfismo similar se ha observado en una proporción elevada, más del 30%, en padres con la deleción de 1,5 Mb en 7q11.23 y responsable del síndrome de Williams-Beuren. Igualmente en madres de niños con síndrome de Angelman que presentan la deleción BP2/BP3 se ha detectado una inversión polimórfica, presente en el 9% de la población general. Sin embargo, no se han observado inversiones polimórficas en la deleción más frecuente, la deleción 22q11.2. Una cuestión por dilucidar es si la inversión aumenta el riesgo de tener hijos con un reordenamiento. Aún cuando estas inversiones se han observado en varios tipos de reordenamientos, la deleción 8p es extremadamente rara aunque la inversión 8p está presente en el 25% de la población.

El fenotipo asociado a los síndromes de microdeleciones puede ser debido a la haploinsuficiencia de un único gen o de varios genes contiguos localizados en la

región delecionada. Así, en pacientes con síndrome de Angelman debido a mutaciones en el gen *UBE3A* son clínicamente casi indistinguibles de aquellos con deleción 15q11-q13. Sin embargo, considerando a los pacientes en su conjunto, aquellos con deleción presentan una afectación más severa, con mayor incidencia de ataques epilépticos, microcefalia y mayor retraso del desarrollo de tal modo que hay otros genes en la región delecionada que contribuyen al fenotipo completo del paciente.

El síndrome de Williams es un claro ejemplo de síndrome de genes contiguos. En pacientes con mutaciones del gen de la elastina se han observado anomalías cardíacas como la estenosis pulmonar periférica y estenosis aórtica supravalvular, que igualmente presentan los pacientes con síndrome de Williams, por lo que estas son debidas exclusivamente a la haploinsuficiencia del gen de la elastina. Por tanto el resto de manifestaciones clínicas de los pacientes con síndrome de Williams es debido a la deleción de otros genes contiguos en la región delecionada.

9.1.2. Unión de finales no homólogos (*NHEJ, non-homologous end-joining*) y Replicación inducida por rotura mediada por microhomología (*MMBIR, Microhomology-Mediated Break-Induced o FoSTeS, Fork Stalling and Template Switching*), en reordenamientos no recurrentes.

Es bien conocido que las secuencias LCRs inducen una susceptibilidad a dar origen a deleciones. Sin embargo, solo una pequeña fracción de secuencias LCRs se relacionan como causa de reordenamientos recurrentes.

El mecanismo de NHEJ es un mecanismo de reparación basado en la recombinación. Se caracteriza por la ausencia de LCRs flanqueantes a los puntos de rotura y la presencia de sitios de microhomología de unión. Este mecanismo puede dar lugar a deleciones, duplicaciones y translocaciones.

A diferencia de los otros mecanismos, FoSTeS o MMBIR se basa en mecanismos de replicación, como causa de reordenamientos. Durante la replicación del ADN se producen roturas de la horquilla de replicación dando lugar a finales de ADN de cadena sencilla. Estos finales de cadena sencilla, invaden una segunda horquilla de replicación de ADN pegándose por microhomología al extremo 3'. La pérdida de la horquilla de replicación que se situaría por detrás

daría lugar a una delección, mientras que la invasión de la horquilla de replicación situada por encima daría lugar a duplicación. Este mecanismo puede dar lugar a reordenamientos complejos, dependiendo del número de veces que ocurra o de la orientación de la horquillas de replicación.

10. Consejo Genético.

En España el Consejo Genético está regulado por la Ley de Investigación Biomédica del 3 de julio 14/1007. Según esta ley se define como “Consejo Genético: procedimiento destinado a informar a una persona sobre las posibles consecuencias para él o su descendencia de los resultados de un análisis o cribado genéticos y sus ventajas y riesgos y, en su caso, para asesorarla en relación con las posibles alternativas derivadas del análisis. Tiene lugar tanto antes como después de una prueba o cribados genéticos e incluso en ausencia de los mismos”.

Hay que considerar que los resultados de los análisis genéticos, tanto postnatales como prenatales, presentan una característica importante: dependiendo del resultado podría tener consecuencias para el resto de familiares. La detección de una anomalía supondría un estudio familiar con el fin de identificar a posibles miembros con riesgo de padecer o transmitir una enfermedad de origen genético.

El Plan de Genética de Andalucía, de la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía especifica que el consejo genético debe vincularse sistemáticamente a los análisis genéticos. En consecuencia el consejo genético integra los resultados de los análisis genéticos, con los cálculos de riesgo teniendo en cuenta los hallazgos clínicos para identificar a pacientes y familiares de riesgo proporcionando información sobre los riesgos y las opciones disponibles para evitarlos. Es evidente que para la realización de un consejo genético adecuado es esencial realizar un diagnóstico seguro y preciso que permita identificar la causa de la enfermedad. Dada la evolución y el aumento de resolución de las diferentes técnicas analíticas genéticas, estudios realizados hace unos pocos años han de ser reevaluados con el fin de identificar anomalías no detectadas.

Tabla I-1: Tabla comparativa de las diferentes técnicas más utilizadas en los análisis genéticos en pacientes con retraso mental.

Técnica	Resolución	Cobertura	Ventajas	Desventajas	Anomalía detectada
Cariotipo	>10Mpb	Genoma completo	Estudia el genoma completo	Baja resolución	Reordenamientos (equilibrados, desequilibrados), pérdidas y ganancias
SKY	>2Mpb	Genoma completo	Identificación de anomalías inter cromosómicas y cromosomas marcador	No identifica anomalías intracromosómicas. Requiere de presencia de buenas preparaciones cromosómicas	Reordenamientos (equilibrados, desequilibrados), pérdidas y ganancias
CGH	>2Mpb	Genoma completo	No requiere de células en división. Permite una alta resolución	No todas las regiones tienen la misma cobertura	Pérdidas y ganancias
FISH pintado	>20kpb	Cromosoma específico	Permite clarificar anomalías	Requiere de identificar una anomalía	Reordenamientos (equilibrados, desequilibrados), pérdidas y ganancias
FISH interfase	>20 kpb	Locus específico	Identificación de anomalías en células que no están en división	Requiere de conocer la anomalía	Presencia/ausencia de una región cromosómica concreta
FISH Locus específica	>20 kpb	Locus específico	Visualización directa de un locus concreto	No detecta pequeñas alteraciones no cubiertas por la sonda	Presencia / Ausencia de un locus determinado. En metafase permite la localización de secuencias específicas
arrayCGH	5-100kpb	Genoma completo	Identificación de pérdidas y ganancias	No detecta reordenamientos equilibrados	Reordenamientos (desequilibrados), pérdidas y ganancias
ArraySNP	5kpb	Genoma completo	Identificación de pérdidas y ganancias. UPD	No detecta reordenamientos equilibrados	Perdidas, ganancias, UPD, mutación
PCR	<10kpb	Gen específico	Rápido, posibilidad de automatización	No detecta mosaicismos	Reordenamientos (equilibrados, desequilibrados), pérdidas, ganancias, mutación
Southern blotting	<20kpb	Gen específico	Puede detectar reordenamientos. Puede detectar mosaicismos.	Caro y de manipulación complicada	Reordenamientos (equilibrados, desequilibrados), pérdidas y ganancias
MLPA	20 kpb	Locus específico	No detecta reordenamientos. Puede detectar mosaicismos.	Analiza múltiples regiones simultáneamente	Deleciones / duplicaciones

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS DE TRABAJO.

En pacientes con retraso mental, tanto sindrómico como no sindrómico, los estudios de rutina son un análisis citogenético y del síndrome de fragilidad del cromosoma X. Parece evidente que las nuevas técnicas tanto de citogenética molecular como de biología molecular aportan la posibilidad de una mayor resolución y por tanto la posibilidad de identificar posibles anomalías que justifiquen el cuadro clínico del paciente.

El cariotipo permite identificar las anomalías cromosómicas más frecuentes y que cursan con cuadros clínicos característicos bien conocidos. Entre ellos el síndrome de Down (47,+21), síndrome de Patau (47,+13) o síndrome de Edwards (47,+18) son, quizás, los más conocidos.

El síndrome de fragilidad del cromosoma X, debido a una expansión inestable de la repetición CGG del gen *FMR1* y de una metilación anómala, es la causa más frecuente de retraso mental hereditario.

En nuestro centro estos estudios se realizan a todos los pacientes con retraso mental y/o rasgos dismórficos. Si bien es posible identificar un gran número de anomalías, también es cierto que hay una serie de pacientes que quedan sin diagnóstico.

La introducción tanto de la hibridación *in situ* fluorescente como de MLPA es previsible identifique una serie de anomalías, que por limitaciones de las técnicas habitualmente utilizadas de rutina, no sería posible detectar.

Planteamos el análisis por MLPA de las microdeleciones / microduplicaciones mas frecuentes descritas hasta la fecha y su confirmación mediante estudios citogenéticos y FISH en pacientes con retraso mental para profundizar en el conocimiento de las base genéticas del retraso mental en nuestra población.

En aquellas familias con un hijo diagnosticado de microdelección/microduplicación mediante MLPA, realizaremos un estudio citogenético/FISH para identificar un posible reordenamiento cromosómico como posible causa de la anomalía identificada.

Previsiblemente, esto incrementará el número de casos con causa conocida, traduciéndose en la posibilidad de ofrecer un consejo genético y un futuro diagnóstico prenatal/preimplantacional a las familias afectas.

OBJETIVOS

1. Análisis por MLPA de microdeleciones/microduplicaciones en pacientes con retraso mental y causa genética desconocida.
2. Análisis por MLPA de microdeleciones/microduplicaciones en pacientes con anomalías cromosómicas y con un fenotipo clínico atípico.
3. Análisis por MLPA de microdeleciones o microduplicaciones en pacientes con retraso mental con historia familiar que sugiere una herencia ligado al cromosoma X.
4. Validación del kit de sondas MLPA, confirmación mediante FISH de las microdeleciones/microduplicaciones identificadas.
5. Estudio familiar mediante cariotipo/FISH en progenitores de pacientes con una microdelección/microduplicación detectada por MLPA. Valoración del riesgo de recurrencia.
6. Diagnóstico prenatal, en futuros embarazos, de la microdelección/microduplicación presente en la familia.

PACIENTES Y MÉTODOS

PACIENTES Y MÉTODOS

1. Pacientes

Todos los individuos que han participado en nuestros estudios han autorizado su inclusión mediante consentimiento informado. Dichos consentimientos siguen las normas de protección de los sujetos humanos contenidas en la declaración de Helsinki, así como lo estipulado en el Título I, Artículo 12, del real Decreto 561/1993 de 16 de abril, y han sido aprobados por el Comité de Ética e Investigación Clínica del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla.

Hemos seleccionado pacientes con retraso mental, tanto sindrómico como no sindrómico, de nuestra población a los que previamente se le ha realizado un estudio citogenético y análisis genético del síndrome de fragilidad del cromosoma X. Hemos estudiado un total de 1002 pacientes remitidos por diferentes hospitales y servicios:

- Hospital Universitario Virgen del Rocío.
- Hospital Universitario Virgen de Valme.
- Hospital Universitario Virgen Macarena.
- Hospital de Osuna.

Los principales servicios demandantes de estudios:

- Neurología pediátrica.
- Dismorfología.
- Cardiología pediátrica.
- Neonatología.
- Endocrinología pediátrica.
- Digestivo.

Con respecto a las indicaciones más frecuentes para incluir a un paciente en el estudio se recogen en la siguiente tabla. Los pacientes presentaban uno o más de los ítems que se describen:

- Rasgos dismórficos.
- Retraso madurativo.
- Hipotonía.
- Fallo de medro.
- Cardiopatía.
- Trastorno de Espectro Autista.
- Retraso mental.
- Trastorno Generalizado del Desarrollo.
- Talla baja.
- Anomalías craneales y/o cerebrales.

En el presente estudio hemos analizado fundamentalmente muestras procedentes de sangre periférica (n=1001). En un caso hemos analizado adicionalmente fibroblastos procedentes de biopsia de piel. Hemos estudiado 24 casos de diagnóstico prenatal mediante cultivo de células de líquido amniótico o sangre fetal, por presentar hallazgos ecográficos compatibles con alguno de los síndromes, o por hijo previo diagnosticado de un síndrome concreto.

2. Métodos

2.1. Cultivos celulares

Se detallan los protocolos para la generación de cultivos celulares a partir de células procedentes de distintos tejidos.

2.1.1. Cultivo de linfocitos en sangre periférica.

- ✓ Obtener una muestra de sangre periférica en Vacutainer con heparina sodio o en una jeringa con 25 U de heparina sodio, sin conservantes, por ml. de sangre.

Otros anticoagulantes, tales como heparina litio o EDTA son tóxicos para las células y nunca deben utilizarse.. La sangre puede permanecer 4 días y aún conservar su capacidad de dividirse in vitro, sin embargo, es preferible iniciar los cultivos tan pronto como sea posible.

- ✓ En un frasco de cultivo con 5 ml. de medio de cultivo, añadir 0,2 ml. de PHA. Iniciar los cultivos inoculando 0,25 ml. de sangre total (0,2 ml para recién nacidos de menos de 3 semanas).

No utilizar agujas menores de 21-G porque pueden lisar los leucocitos.

Medio de cultivo	
RPMI 1640	100 ml
Newborn Calf Serum	13,5 ml
Penicilina-Streptomicina(10000Ui/ml- 10000µg/ml)	1 ml
L-glutamina	1 ml
Hepes Buffer	1 ml

- ✓ Incubar los cultivos durante 2-4 días (típicamente 3 días) a 37 °C.

Los cultivos de los recién nacidos generalmente funcionan con dos días de cultivo, pero también pueden sacrificarse directamente o tras 1 día de cultivo. Los cultivos de pacientes mayores pueden necesitar 3-4 días porque pueden no responder a la estimulación con PHA. Para evitar botones celulares no se añadieron más de 0,5 ml de sangre total.

- ✓ Añadir 0,2 ml de colcemid (10 mg/ml). El colcemid destruye las fibras del huso acromático de las células, parando las células en metafase, momento en el que hay mayor condensación cromosómica. Tanto la concentración como el tiempo al colcemid influye sobre la calidad y tamaño cromosómico.

Volumen de Colcemid	Tiempo de incubación
25 µl	1 hora
50 µl	30 min (óptimo)
200 µl	45 min

El volumen de colcemid hay que añadirlo directamente sobre la superficie del medio de cultivo/células y agitar muy suavemente el frasco de cultivo, evitando que queden grupos de células sobre la superficie del frasco.

- ✓ Transferir la solución celular a tubos de centrifuga estériles de polipropileno. Centrifugar 8 minutos a 1000 rpm, a temperatura ambiente. Decantar el sobrenadante.

El poliestireno puede reaccionar con el fijador carnoy dando lugar a efectos no deseables sobre los cultivos. Dado que hay que realizar incubaciones prolongadas, durante 17 hrs, es preferible utilizar materiales inertes, tales como el polipropileno o en su defecto el cristal.

- ✓ Choque hipotónico: añadir 5 ml de KCl 75 mM a temperatura ambiente y suavemente resuspender el botón celular. Añadir 3 ml de KCl, y agitar la suspensión celular. Valorar que no quedan acúmulos de células, si los

hubiese con una pipeta Pasteur disgregar por completo (es en estos acúmulos donde están las células en división). Incubar 15 minutos a temperatura ambiente o a 37 °C. Mediante este choque hipotónico, se consigue que la célula incorpore agua al interior y acabe por destruir la membrana plasmática.

- ✓ Añadir, con una pipeta Pasteur, 10-12 gotas (1 ml. aprox.) de fijador Carnoy (metanol/ácido acético 3:1) recién preparado a 4 °C y mezclar homogéneamente. Centrifugar 8 minutos a 1000 rpm, a temperatura ambiente.

Este tratamiento reduce gradualmente el pH de las células preparándolas para los siguientes pasos de fijación. También lisa los eritrocitos remanentes y empieza el proceso de limpieza de los detritus celulares.

- ✓ Retirar el sobrenadante hasta dejar 0,5 ml de la suspensión celular, resuspender el botón celular mediante una pipeta Pasteur. Añadir 1 ml de fijador e inmediatamente mezclar homogéneamente. Llevar hasta un volumen de 5 ml con fijador y mezclar hasta obtener una solución celular homogénea. Centrifugar 8 minutos a 1000 rpm, a temperatura ambiente.

El botón celular tras el primer paso de fijación aparecerá marrón y con grumos debido a los restos de los eritrocitos. Al resuspender cuidadosamente pero abundantemente conseguimos que no se formen agrupaciones de linfocitos que puedan dificultar la extensión posterior en los portas.

- ✓ Retirar el sobrenadante, y se resuspender en 5 ml de fijador. Centrifugar 8 minutos a 1000 rpm, a temperatura ambiente.
- ✓ Decantar el sobrenadante y resuspender el pellet celular en una cantidad de fijador suficiente para producir una solución de aspectos lechosa (5-9 ml aprox.). Incubar un mínimo de 30 minutos a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C.

Las fijaciones prolongadas mejoran las preparaciones cromosómicas. Dejar la suspensión a 4 °C durante toda la noche puede mejorar la calidad de las preparaciones o puede hacerse para una mejor organización del laboratorio.

- ✓ Preparaciones cromosómicas: extender 5 gotas por portaobjetos. Valorar y modificar la concentración
- ✓ La suspensión celular se extiende sobre portaobjetos para su análisis cromosómico y mediante FISH.

2.1.2. Cultivo de células de líquido amniótico.

Mediante la amniocentesis es posible la obtención de células fetales, a partir del líquido amniótico, para la realización de un diagnóstico prenatal.

Ofrecimos un diagnóstico prenatal a todas las parejas que previamente hubieran tenido un hijo diagnosticado de alguna microdelección / microduplicación.

Igualmente ofrecemos diagnóstico prenatal a aquellas mujeres que durante las ecografías de rutina se detectara algún tipo de anomalía compatible con alguno de los síndromes que incluye el estudio.

- ✓ Obtener 10-20 ml. de líquido amniótico. Dividir la muestra en dos tubos de centrifuga estériles. Las muestras son tratadas independientemente. Centrifugar durante 10 min a 1500 rpm. Decantar el sobrenadante.
- ✓ Resuspender el botón celular en 5 ml. de medio de cultivo. Transferir la suspensión celular a un frasco de cultivo falcon de 25 cm².

Medio de cultivo	
Ham's F10	50 ml.
RPMI1640	50 ml.
Suero Fetal Bovino (FCS)	20 ml.
L-Glutamina	2 ml.
Penicilina/Estreptomicina	2 ml.
Hepes Buffer	2 ml.

- ✓ Tras 5 días, realizar un cambio del medio de cultivo. Los cultivos se evalúan diariamente mediante un microscopio invertido con contraste de fases.
- ✓ Tras la evaluación diaria y dependiendo del crecimiento celular cambiar el medio de cultivo cada 1-3 días.
- ✓ Una vez se observa un número adecuado de células en división, añadir 400 µl. de colcemid (10 µg/ml). Incubar durante 2 hrs. a 37 °C.
- ✓ Transferir el medio de cultivo a un tubo de centrifuga. Añadir 3 ml. de tripsina/EDTA al frasco de cultivo y evaluar, mediante el microscopio invertido con contraste de fases, la separación de las células de la superficie del frasco de cultivo. Recuperar la solución celular y transferirla a un tubo de centrifuga.
- ✓ Centrifugar a 1500 rpm durante 10 min.
- ✓ Decantar el sobrenadante. Añadir 3 ml. de choque hipotónico (KCl 0,075 M). Homogeneizar la suspensión celular. Añadir 7 ml. de KCl. Homogeneizar e incubar durante 20 min. a 37 °C.
- ✓ Añadir 1 ml. de fijador Carnoy recién preparado y frío. Homogeneizar.
- ✓ Centrifugar a 1500 rpm durante 10 min.
- ✓ Decantar el sobrenadante. Añadir gota a gota 1 ml. de fijador Carnoy. Homogeneizar. Añadir 9 ml. de fijador Carnoy. Homogeneizar. Incubar a temperatura ambiente durante 10 min.
- ✓ Realizar 3-5 lavados con fijador Carnoy. Incubar a -20 °C.
- ✓ La suspensión celular se extiende sobre portaobjetos para su análisis cromosómico y mediante FISH.
- ✓ Dado que iniciamos al menos dos cultivos independientes, uno de ellos se destina a la extracción de ADN.

2.1.3. Cultivo de fibroblastos en piel.

Hemos realizado estudios de fibroblastos en piel en un caso que sospechábamos mosaicismos para un tipo concreto de anomalía.

Hemos utilizado dos métodos de cultivo. La diferencia entre ambos protocolos es el método utilizado para disgregar las células. Los cultivos se evalúan diariamente mediante un microscopio invertido con contraste de fases. Una vez se observa un

número de divisiones adecuado se sacrifica de igual forma que en el cultivo de células de líquido amniótico.

La digestión enzimática, a diferencia de la disgregación mecánica, aumenta la complejidad del protocolo y del tiempo necesario para iniciar los cultivos. Sin embargo, hemos optado por una combinación de ambos protocolos. Por que la disgregación enzimática permite un crecimiento celular más rápido, reduciendo el tiempo necesario para obtener un número adecuado de células en división. Además la disgregación mecánica permite el subcultivo y mayor producción de células, aumentando la cantidad de ADN del cultivo.

Disgregación mecánica.

- ✓ La muestra de piel obtenida es transportada al laboratorio, en medio de cultivo, en el menor tiempo posible.
- ✓ En condiciones de esterilidad se deposita la muestra en una placa Petri de 35 mm con medio de cultivo nuevo.
- ✓ Con un escalpelo o unas tijeras estériles disgregamos la muestra en fragmentos pequeños.
- ✓ Los diferentes fragmentos se transfieren, mediante una pipeta Pasteur, a un frasco de cultivo falcon de 25 cm², distribuyéndolo equidistantes por toda la superficie del frasco de cultivo.
- ✓ El frasco, con mucho cuidado, se pone en posición vertical y se incuba durante dos horas. Este sistema aumenta la probabilidad de que los diferentes fragmentos se adhieran a la superficie de cultivo y no floten cuando se le añade el medio de cultivo.
- ✓ Añadir 4 ml. de medio de cultivo y poner los frascos en su posición horizontal. Incubar a 37 °C y 5% de CO₂. Incubar durante 2-5 días. Dado que los fragmentos de piel, explantes, inicialmente no están estériles hay que revisar los frascos ante cualquier indicio de contaminación (turbidez, cambio de color ...).
- ✓ Examinar los explantes con un microscopio invertido con contraste de fases. Alrededor de los explantes aparecen células, típicamente fibroblastos, que crecen saliendo del explante. El crecimiento de los explantes es lento y

no todos se adhieren a la superficie del frasco, por lo que es necesario cultivarlos durante largos periodos de tiempo (3-4 semanas).

- ✓ Los cultivos se evalúan diariamente, cambiando de medio de cultivo cada 1-3 días.
- ✓ Una vez se observa un número adecuado de células en división se sacrifica mediante el mismo protocolo que el cultivo de células de líquido amniótico.
- ✓ Dado que a partir de una muestra de piel se inician al menos dos cultivos independientes, uno de ellos se destina a la extracción de ADN.

Disgregación enzimática.

- ✓ La muestra de piel obtenida es transportada al laboratorio, en medio de cultivo, en el menor tiempo posible.
- ✓ En condiciones de esterilidad se deposita la muestra en una placa Petri de 35 mm. con 1-3 ml. de solución de colagenasa (3 mg. colagenasa tipo IV/HBSS), incubar 1 hr a 37 °C.
- ✓ Transferir la solución celular a tubo de centrifuga estéril. Añadir 1-3 ml. de tripsina/EDTA precalentada a 37 °C, e incubar durante 1 hr.
- ✓ Disgregar con una pipeta Pasteur. Añadir medio de cultivo, hasta un volumen final de 15 ml.
- ✓ Centrifugar durante 10 min. A 1500 rpm. Descartar el sobrenadante y resuspender el botón celular en 1-2 ml. de medio de cultivo.
- ✓ Examinar tras un día de cultivo una posible contaminación. Añadir 2-3 ml. de medio de cultivo.
- ✓ Los cultivos se evalúan diariamente, cambiando de medio de cultivo cada 1-3 días.
- ✓ Una vez se observa un número adecuado de células en división se sacrifica mediante el mismo protocolo que el cultivo de células de líquido amniótico.
- ✓ Dado que a partir de una muestra de piel se inician al menos dos cultivos independientes, uno de ellos se destina a la extracción de ADN.

2.2. Extracción de ADN.

2.2.1. Extracción de ADN genómico a partir de sangre periférica.

El núcleo de las células de los organismos eucariotas está constituido por ácido desoxirribonucleico (ADN) y proteínas. El ADN genómico se obtuvo a partir de una muestra de sangre periférica de los pacientes, sus familiares y controles.

Los reactivos utilizados durante la extracción realizan una serie de funciones:

- ✓ TRIS con funciones ácido-base.
- ✓ $MgCl_2$ mantiene la pared de los leucocitos.
- ✓ EDTA inhibe las DNAasas al secuestrar cationes Mg^{2+} y Ca^{2+} .
- ✓ SDS actúa como detergente disolviendo los lípidos de las membranas celulares.
- ✓ PROTEINASA K digiere las proteínas.
- ✓ ETANOL precipita el ADN.

Partimos de 5-15 ml de sangre periférica conservada con anticoagulante, preferentemente EDTA (1 mM). Siempre que fue posible, se procesó la muestra en el menor tiempo posible.

- ✓ 15ml de sangre total se lava con 35 ml de suero fisiológico en tubos Nunc de 50ml de polipropileno estériles.
- ✓ Centrifugar 15 minutos a 2000-2500 rpm y 4 °C.
- ✓ Desechar el sobrenadante, mediante aspirado circular con una pipeta Pasteur, dejando la capa celular.
- ✓ Añadir tampón de lisis de eritrocitos (Tris pH=7,5 20mM; $MgCl_2$ 5mM) hasta alcanzar un volumen de 50ml y homogeneizar la muestra.
- ✓ Centrifugar 15 minutos a 3500 rpm y 4 °C.
- ✓ Decantar el sobrenadante.
- ✓ Añadir tampón de lisis de eritrocitos hasta volumen final de 50ml.
- ✓ Centrifugar 15 minutos a 3500 rpm y 4°C.
- ✓ Desechar el sobrenadante.

Digestión de proteínas

- ✓ Añadir 3ml de tampón de lisis de leucocitos (WCLB pH=8,2, NaCl 400mM; EDTA pH=8 2mM; Tris pH=7,5 10mM), 200 μ L SDS 10% y 500 μ L solución de proteinasa K (Proteinasa K 2mg/ml; SDS 1%; EDTA pH=8

2mM). Homogeneizar con vórtex. Incubar a 37 °C en agitación durante 16 hr.

Extracción de ADN

- ✓ Añadir 1 ml de NaCl 5,5M. Agitar 15 segundos en vórtex.
- ✓ Centrifugar 15 minutos a 3500 rpm y 4 °C.
- ✓ El sobrenadante se transfiere a otro tubo Nunc, eliminando parte de las sales
- ✓ Centrifugar 15 minutos a 3500 rpm y 4 °C.
- ✓ Añadir v/v de cloroformo (Merck). Homogeneizar manualmente durante 15 segundos.
- ✓ Centrifugar 15-20 minutos a 3500 rpm y 4 °C.
- ✓ Recuperar el sobrenadante y transferirlo a otro tubo.
- ✓ Añadir 2 v/v de etanol absoluto (Merck) frío y agitar suavemente hasta observar la medusa de ADN.
- ✓ Recuperar el ADN y lavarlo con etanol al 70% a -20 °C. Posteriormente, pasarlo a un criotubo Nunc con 0,5-1ml (según el tamaño de la medusa obtenida) de Tris 10mM/EDTA 0,2mM e incubar unas horas a 37 °C en agitación para que se disuelva completamente. Conservar a -80 °C.

2.2.2. Extracción de ADN a partir de vellosidades coriales/Líquido amniótico/cultivo de piel

- ✓ Tomar con una pipeta Pasteur estéril la muestra de vellosidad coriales y pasarla a un tubo de rosca estéril. Centrifugar a 14.000rpm durante 2 min. Para cultivo de piel o cultivo de células de líquido amniótico realizamos una tripsinización del cultivo confluyente. Añadimos 3 ml de tripsina/EDTA al frasco de cultivo, valoramos en microscopio de contraste de fases, y recogemos la solución celular. Añadimos 3 ml de medio de cultivo para inactivar la tripsina. Transferimos la solución celular a un tubo de rosca estéril. Centrifugamos a 14.000 rpm durante 2 min. Decantamos el sobrenadante.
Para líquido amniótico no cultivado, reservamos 5 ml de la muestra. Centrifugamos a 1.500 rpm durante 10 min. Decantamos el sobrenadante.
- ✓ Añadir 500 µl de tampón de urea y 15µl de proteinasa K (10mg/ml).

Tampón urea	
Urea	24 g
NaCl 5M	3 ml
Tris-EDTA 2M	0,25 ml
EDTA 0.25M	2ml
SDS 10%	10 ml
H ₂ O csp	50 ml

- ✓ Incubar a 37°C en agitación durante 16 hrs.
- ✓ Añadir v/v de fenol (Merck)/cloroformo isoamílico (Merck). Agitar y centrifugar a 12.000 rpm durante 2-3 min.

Solución de cloroformo / alcohol isoamílico (conservar a 4 °C en botella oscura)			
Solución A		Solución B	
Cloroformo	480 ml	TRIS 2M pH=8.1	5 ml
Alcohol isoamílico	20 ml	H ₂ O csp	500 ml

Mezclar las soluciones A y B y agitar durante toda la noche.

- ✓ Recuperar la fase superior y transferirla a un tubo nuevo. Añadir v/v de cloroformo/isoamílico. Agitar y centrifugar a 12.000 rpm durante 2-3 min.
- ✓ Recuperar la fase superior y transferirla a un tubo nuevo. Añadir 1/10 del volumen de acetato sódico 3M (por cada ml de muestra 100 µl de acetato sódico). Agitar suavemente.

Acetato sódico 3M (esterilizar y mantener TA)	
Acetato sódico 3 H ₂ O	408,1 g
H ₂ O csp	1000 ml

- ✓ Añadir 2v de etanol absoluto frío. Invertir el tubo varias veces hasta observar la medusa de ADN. Dejar precipitar a -20°C, aproximadamente 15 min.

- ✓ Centrifugar a 12.000 rpm durante 5 min. Eliminar el sobrenadante y dejar secar en campana durante al menos 2 horas (debemos de eliminar los restos de etanol que puedan interferir después en el procesado de la muestra).
- ✓ Resuspender el pellet en Tris-EDTA (1mM/0,1mM). Añadir la cantidad necesaria según el tamaño de la medusa. Si la medusa es visible se añade unos 300µL. Dejar disolver a 37°C durante 30 min.

Segunda extracción:

- ✓ Añadir 10 µl RNAasa por ml de muestra. Incubar 1 hora a 37°C.
- ✓ Añadir 75 µl de SDS 10% por cada ml de muestra y agitar.
- ✓ Añadir 20 µl de proteinasa K (10 mg/mL) por cada ml de muestra, agitar y dejar 1 hora a 56 °C.
- ✓ Añadir v/v de fenol/cloroformo/isomálico. Agitar y centrifugar durante 2-3 min a 12.000 rpm.
- ✓ Recuperar la fase superior y transferirla a un tubo nuevo.
- ✓ Añadir v/v de cloroformo/isoamílico. Agitar y centrifugar a 12.000 rpm durante 2-3 min.
- ✓ Recuperar la fase superior y trasferirla a un tubo nuevo.
- ✓ Añadir 1/10 del volumen de acetato sódico 3M (por cada ml de muestra 100 µl de acetato sódico). Agitar suavemente.
- ✓ Añadir 2v de etanol absoluto frío. Invertir el tubo varias veces hasta observar la medusa de ADN. Dejar precipitar a -20°C aproximadamente 15 min.
- ✓ Centrifugar a 12.000 rpm durante 5 min. Eliminar el sobrenadante y dejar secar en campana durante al menos 2 horas (debemos de eliminar los restos de etanol que puedan interferir después en el procesado de la muestra).

Resuspender el pellet en Tris-EDTA (1mM/0.1mM). Añadir la cantidad necesaria según el tamaño de la medusa. Si la medusa es visible se añade unos 300µL. Dejar disolver a 37°C durante 30 min.

2.3. Extracción automática de ADN (MagnaPure).

Contamos con un extractor automático de ADN MagnaPure 3.0. El equipo sigue todos los controles de calidad propuesto por el fabricante. Se hacen revisiones periódicas por parte del servicio técnico oficial.

Como norma general procesamos muestras en múltiplos de 8. Seleccionamos el icono de la pantalla del ordenador “*Sample ordering*”. Entonces saldrá una pantalla con un esquema donde se representa la placa donde vamos a introducir las muestras de sangre. El orden de introducir las muestras es de derecha a izquierda, empezando por la fila de arriba. Así, la muestra número 1 sería el pocillo A1, la muestra nº 2 sería la B1..., la muestra nº 8 sería la H1, y la muestra nº 9 sería la A2. Así sucesivamente. Es posible rellenar una columna de comentarios de la muestra (aspecto, volumen ...).

El protocolo seguido para 1 ml de sangre total es el “V3_8 DNA LV Blood_1”. Dentro de este protocolo es posible elegir tres opciones:

- *“Fast”*: Es un método bastante rápido, pero con menor rendimiento. Suele tardar unos 45 minutos para cada 32 muestras.
- *“High performance”*: Es algo más lento pero con mayor rendimiento. Tarda aproximadamente 1.15 horas por cada 32 muestra
- *“High performance external lysis”*: Esta opción es por si se quiere lisar previamente la muestra por peligrosidad (virus...).

La opción más utilizada corresponde a “High performance”, dado que nos proporciona mayor y mejor calidad de ADN en un tiempo adecuado.

Seleccionamos la cantidad de muestra a procesar, que normalmente será 1ml, mediante el botón “*Sample volume*”. Al seleccionar esta opción nos saldrá “*Elution volumen*”, que corresponde a 200 μ l.

Al realizar este protocolo, obtendremos 200 μ l a una concentración de 100 ng/ μ l de ADN de doble cadena. En total tendremos un mínimo de 10 μ g de ADN.

Preparamos la placa con las muestras de sangre, en el mismo orden que hemos introducido previamente en el ordenador.

Seleccionamos el icono “*Stage setup*”. Nos lleva a una pantalla donde indica la cantidad de tampón de cada tipo que hay que utilizar, así como el tipo de recipiente para cada uno. Hay cuatro recipientes diferentes:

- L: Son las cubetas más grandes.
- M20: Son cubetas medianas de 20.
- M30: Son cubetas medianas de 30.
- S: Son los más pequeños.

Todos los reactivos se preparan siguiendo estrictas normas de seguridad, utilizando guantes. El kit de extracción se conserva a temperatura ambiente. Las cubetas con los reactivos, una vez tapadas, se colocan en el carril rectangular, en el orden preciso. La última cubeta será la que lleva MGP, hay que prepararla en el menor tiempo posible. Una vez preparadas todas las cubetas, metemos el carril en la máquina.

Además de las muestras y reactivos, es necesario otra serie de fungibles, como puntas de pipeta grandes y pequeñas, *tip stands*, ... Validamos en el ordenador cada material que metemos en la máquina.

Nos aseguramos que hemos metido todo lo necesario, e iniciamos la extracción.

Una vez finalizado el proceso de extracción, recogemos la placa donde está el ADN aislado. Cada muestra es transferida a un criotubo y etiquetada correctamente. Los restos biológicos y de material es desechado conforme a los protocolos del hospital en los contenedores adecuados.

Limpiamos la maquina con etanol al 70%. Realizamos ciclo de descontaminación con luz UV durante 4 hrs.

2.4. Espectrofotometría de Ácidos nucleicos

La concentración y pureza de las muestras de ADN se analizó mediante la determinación de la absorbancia (densidad óptica, DO) a distintas longitudes de onda con el espectrofotómetro SmartSpec™ 3000 (BIO-RAD). Según la ley de Lambert-Beer la $A_{260nm} = E \times C \times l$, siendo E el coeficiente de extinción molar (ADN de doble cadena $E=0,02(\mu\text{g}/\text{ml})^{-1}\text{cm}^{-1}$), C la molaridad y l el grosor de la cubeta.

Preparamos una dilución 1:20 de la muestra y se midió la absorbancia a 260nm (longitud de onda de absorción del ADN de doble cadena) y 280nm (longitud de onda de absorción de las proteínas). La pureza de la solución de Ácidos nucleicos viene determinada por el cociente DO260/DO280. En situaciones óptimas que indican que la muestra de ADN es adecuada el cociente varía entre 1,6-2.

El coeficiente de absorción del ADN de doble cadena (α) a 260nm es 0,02 ml/g. Para determinar la concentración de ADN (g/ml) de la muestra se multiplica la DO260nm por 20 (factor de dilución) y por 50 (el inverso del coeficiente de absorción del ADN de doble cadena) y se divide por 1 (distancia en centímetros que atraviesa la luz por la solución que se corresponde con el ancho de la cubeta del espectrofotometro).

2.5. *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)*

Mediante la técnica de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) podemos detectar la duplicación y deleción de diferentes fragmentos de un gen o de diferentes fragmentos de distintas zonas del genoma. Esta técnica consiste en la sucesión de cuatro reacciones: desnaturalización, hibridación, ligación y amplificación realizándose a partir de una mezcla de sondas, específicas según el estudio que se vaya a realizar.

El ADN es desnaturalizado. Cada región de interés la hibridamos con dos hemisondas, inmediatamente adyacente. Cada hemisonda tiene un cebador universal en cada extremo. Una hemisonda es sintética, la otra hemisonda, portadora de una secuencia espaciadora, es derivada de M-13. Cada hemisonda derivada de M-13 tiene una secuencia espaciadora diferente. Durante la reacción de MLPA, cada par de hemisondas hibrida con su secuencia diana adyacente y son ligadas enzimáticamente con una ligasa termoestable. Los productos de ligación se amplifican mediante PCR utilizando un único par de cebadores. Los productos amplificados para un determinado locus específico tienen una longitud única debido a la secuencia espaciadora. Uno de los cebadores está marcado con un fluorocromo. Los productos amplificados se separan por electroforesis capilar. La cantidad de producto amplificado vendrá determinado por el número de copias de la secuencia diana antes de la amplificación. Comparando los resultado del paciente con los de un individuo control podemos determinar la pérdida o ganancia de la secuencia diana de cada locus.

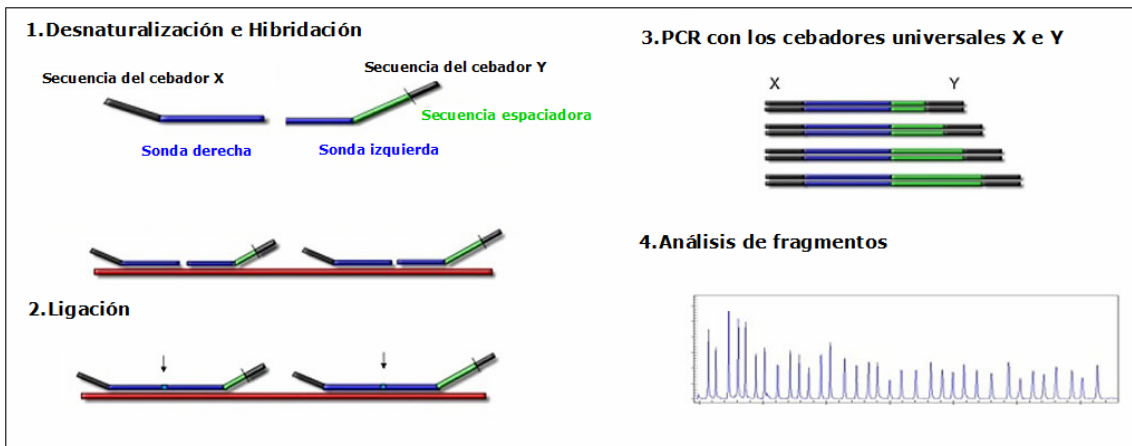


Figura PM-1: esquema de la técnica de MLPA.

Utilizamos los kits de MRC-Holland, SALSA[®] reagents for MLPA[®], reactions EK1 MLPA reagents. MRC-Holland, recomienda los termocicladores de biometra[®] TGRADIENT (Whatman biometra).

La SALSA MLPA P245 es un kit genérico para analizar una serie de síndromes. Se trata de un kit constituido por una mezcla de sondas específicas para identificar simultáneamente múltiples síndromes de microdelección en pacientes con retraso del desarrollo idiopático y/o retraso mental. Aquellos resultados que compatibles con una delección o duplicación de una región cromosómica específica debe confirmarse mediante otras técnicas o utilizando un kit MLPA específico de la región involucrada. Diferentes kits, como P371, P372, P373 y P374 analizan específicamente ciertas regiones cromosómicas involucradas en los síndromes analizados en P245.

La SALSA MLPA P245 contiene un número limitado de sondas para cada región cromosómica específica y por tanto no detecta todas las posibles causas de los síndromes analizados. Por ejemplo el 70 % de los casos de síndrome de Prader-willi se deben a delecciones en 15q que son identificados mediante las sondas contenidas en P245. Sin embargo, la metilación del gen SNRPN, que es otra causa fundamental de este síndrome, no se detectaría. En consecuencia, en pacientes con un resultado normal con P245 y clínica compatible con alguno de los síndromes han de ser reevaluados con kits específicos, aumentando el número de sondas analizadas, o mediante otras técnicas.

Una vez identificada una anomalía mediante la SALSA P245, ampliamos el estudio según el gráfico siguiente.

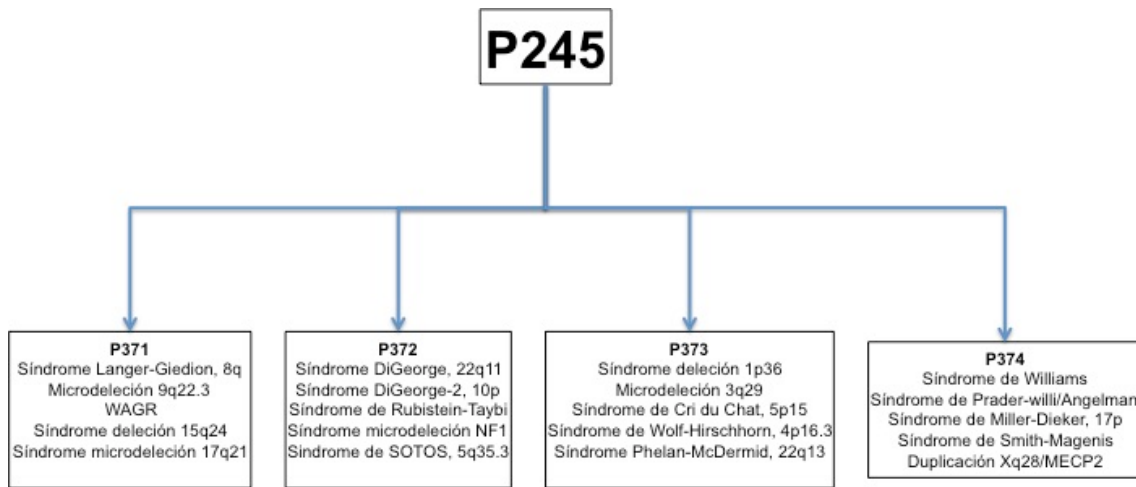


Figura PM-2: Algoritmo de confirmación mediante MLPA.

La SALSA MLPA P245 contiene 50 sondas para los diferentes síndromes, y otras 10 sondas que son utilizadas como control. Cuando un paciente presenta una deleción, se produce una reducción del 35-50% de los picos de amplificación. Los síndromes incluidos en P245:

(MV36 indica el cromosoma y la distancia al telómero del brazo corto).

2.5.1. Síndrome deleción 1p36

Longitud (nt)	SALSA MLPA	Gen	MV36	Secuencia parcial sonda	Distancia entre sondas
	02270-L01762	TNFRSF18	P069 / P070 para1p36		8 kb
130	02269-L01761	TNFRSF4	01-001.14	GCCGGCCAGCAA-TAGCTCGGACGC	609 kb
178 ¥	02890-L02511	GNB1	01-001.75	CTAAGATCGGAA-GATGAGTGAGCT	200 kb
166 ¥	04690-L04068	GABRD	01-001.95	CGGCGACTACGT-GGGCTCCAACCT	

Los kits P373 y P145 permiten el análisis de un mayor número de sondas para esta región.

2.5.2. Síndrome microdelección 2p16

Longitud (nt)	SALSA MLPA	Gen	MV36	Secuencia parcial sonda	Distancia entre sondas
226 *	17474-L22693	REL	02-061.00	TATCACAGAACC-CGTAACAGTAAA	127 kb
499 *	09870-L15194	PEX13	02-061.13	TGAGGATGACCA-TGTAGTTGCCAG	

El kit P371 permite el análisis de un mayor número de sondas para esta región.

2.5.3. Síndrome microdelección 2q23.1/MBD5

Longitud (nt)	SALSA MLPA	Gen	MV36	Secuencia parcial sonda	Distancia entre sondas
214 *	15311-L17110	MBD5, Exon 6	02-148.93	CCAGCTATACAA-GTTCCTGTGGGT	54 kb
411 *	15313-L22691	MBD5, Exon 15	02-148.99	CTGGAGATCTTC-CTCCTTTGGGT	

2.5.4. Síndrome microdelección 2q33.1/SATB2

Longitud (nt)	SALSA MLPA	Gen	MV36	Secuencia parcial sonda	Distancia entre sondas
485 *	15318-L19750	SATB2, Exon 12	02-199.90	TGCCATTTATGA-CGAGATCCAACA	110 kb
391 *	15315-L17114	SATB2, Exon 6	02-200.01	AGAGAAGAACAC-GCCGAGTTTGTC	

2.5.5. Síndrome microdelección 3q29

Longitud (nt)	SALSA MLPA	Gen	MV36	Secuencia parcial sonda	Distancia entre sondas
355	08395-L08249	DLG1	03-198.28	CTATGAAAGACA-GGATAAATGATG	231 kb
422 ¥	08401-L15187	DLG1	03-198.51	CAGCTCAGAAGT-TCCATAGAACGG	250 kb
	02013-L02052	BDH	Sonda P036		126 kb
	02690-L02842	KIAA0226	Sonda P069/P070 Localizada entre telómero y región deleción		

El kit P373 permite el análisis de un mayor número de sondas para esta región.

2.5.6. Síndrome de Wolf-Hirschhorn, 4p16.3

Longitud (nt)	SALSA MLPA	Gen	MV36	Secuencia parcial sonda	Distancia entre sondas
	02005-L02047	PIGG	Sonda P036 para 4p		1 kb
	1440-L16146	PIGG	Sonda P069 / P070 para 4p		308 kb
232	04190-L05920	LETM1	04-001.81	CCTGTGTACACA-TCCTCCAGAGGC	52 kb
454 *	10633-L14379	WHSC1	04-001.87	GTGGGCATTAT-TTCCCTTAATG	

Los kits P373, P096 MR2, P036 y P069/P70 permiten el análisis de un mayor número de sondas para esta región.

2.5.7. Síndrome de Cri du Chat, 5p15

Longitud (nt)	SALSA MLPA	Gen	MV36	Secuencia parcial sonda	Distancia entre sondas
	02791-L02233	CCDC127	Sonda P069 / P070 para 5p		109 kb
	01723-L1327	PDCD6	Sonda P036 para 5p		968 kb
445 ¥	03761-L22817	TERT	05-001.34	TCTTCTTTTAT-GTCACGGAGACC	8155 kb
283 *	14265-L22700	SEMA5A	05-009.49	ACTTGGGCTGGA-GTGCCACGTGG	

Los kits P373, P096 MR2, P036 y P069/P70 permiten el análisis de un mayor número de sondas para esta región.

2.5.8. Síndrome Sotos 5q35.3

Longitud (nt)	SALSA MLPA	Gen	MV36	Secuencia parcial sonda	Distancia entre sondas
154 ¥	02595-L23366	NSD1, Exon 14	05-176.62	ACCCACCCACTG-TTATGCAGAACA	32 kb
462 ¥	02600-L15191	NSD1, Exon 22	05-176.65	GGAAAGACTGTT-TGCAAATGTGGA	

Los kits P372 y P026 permiten el análisis de un mayor número de sondas para esta región.

2.5.9. Síndrome Williams, 7q11.23

Longitud (nt)	SALSA MLPA	Gen	MV36	Secuencia parcial sonda	Distancia entre sondas
364	01336-L00878	ELN, Exon 20	07-073.11	TTTCCCGGCTTT-GGTGTCGGAGTC	12 kb
315 ¥	16349-L22813	ELN, Exon 33	07-073.12	ACCTCATCAACG-TTGGTGCTACTG	

Los kits P374, P064 y P029 permiten el análisis de un mayor número de sondas para esta región.

2.5.10. Síndrome Langer-Giedion, 8q24.12

Longitud (nt)	SALSA MLPA	Gen	MV36	Secuencia parcial sonda	Distancia entre sondas
401	03081-L07411	TRPS1	08-116.75	CTCTTTTTTGGT-GCTGCTGGTTTC	2168 kb
429 *	15322-L17698	EXT1	08-118.92	GGTGATAATGTT-AAACCCACTTAA	

El kit P371 permite el análisis de un mayor número de sondas para esta región.

2.5.11. Síndrome microdelección 9q22.3

Longitud (nt)	SALSA MLPA	Gen	MV36	Secuencia parcial sonda	Distancia entre sondas
436 *	04460-L22816	FANCC	09-096.90	GATAACTCACGA-GATCATTTGGCTT	377 kb
323 *	03702-L22814	PTCH1	09-097.28	GTTAATGACTCC-CAAGCAAATGTA	

El kit P371 permite el análisis de un mayor número de sondas para esta región.

2.5.12. Síndrome DiGeorge región 2, 10p15

Longitud (nt)	SALSA MLPA	Gen	MV36	Secuencia parcial sonda	Distancia entre sondas
136	07632-L07317	GATA3, Exon 1	10-008.14	GAGCAACGCAAT-CTGACCGAGCAG	

Los kits P372 y P250 permiten el análisis de un mayor número de sondas para esta región.

2.5.13. Síndrome Prader-willi/Angelman, 15q11.2

Longitud (nt)	SALSA MLPA	Gen	MV36	Secuencia parcial sonda	Distancia entre sondas
	07291-L08858	MKRN3		Sonda P036 para "15p"	120 kb
	04026-L01542	NDN		Sonda P069 / P070 para "15p"	1134 kb
244 *	12178-L13826	SNRPN	15-022.63	ACCACCACCTGA-TGAAAGATACAC	138 kb
300 ¥	01318-L23196	SNRPN	15-022.76	GATTCTCGCTA-CTCCAATATGGC	441 kb
166 *	10877-L11547	UBE3A	15-023.20	AGTGTATTGGA-AGTGAGCCACCA	

El kit P374 permite el análisis de un mayor número de sondas para esta región.

El kit ME028 incluye un mayor número de sondas y detecta cambios de metilación.

2.5.14. Síndrome deleción 15q24

Longitud (nt)	SALSA MLPA	Gen	MV36	Secuencia parcial sonda	Distancia entre sondas
190 *	18316-L23369	SEMA7A	15-072.49	TACCCACAGAGA-CCTCCAGGTGG	308 kb
331 ¥	06811-L22815	CYP1A1	15-072.80	GTCAACCTGAAT-AATAATTCGGG	

El kit P371 permite el análisis de un mayor número de sondas para esta región.

2.5.15. Síndrome Rubinstein-Taybi, 16p13.3

Longitud (nt)	SALSA MLPA	Gen	MV36	Secuencia parcial sonda	Distancia entre sondas
172	03087-L02487	CREBBP	16-003.87	AGCAGGTGAAAA-TGGCTGAGAACT	

Los kits P372 y P313 permiten el análisis de un mayor número de sondas para esta región.

2.5.16. Síndrome de Miller-Dieker, 17p13.3

Longitud (nt)	SALSA MLPA	Gen	MV36	Secuencia parcial sonda	Distancia entre sondas
142	04120-L03532	PAFAH1B1 Exon 3	17-002.51	TGTAGGCACTCT-ATAGATCAAGCT	2 kb
238 ¥	16348-L22830	PAFAH1B1 Exon 5	17-002.52	CCAGAAAAATAT-GCATTGAGTGGT	

Los kits P374 y P061 permiten el análisis de un mayor número de sondas para esta región.

2.5.17. Síndrome Smith-Magenis, 17p11.2

Longitud (nt)	SALSA MLPA	Gen	MV36	Secuencia parcial sonda	Distancia entre sondas
471 *	11730-L15192	RAI1	17-017.57	CCAAGGATCTCA-TCTGGCCACCGC	264 kb
278 ¥	01452-L20745	LRRC48	17-017.83	CGGATCTCCAAG-ATCGACTCCCTG	245 kb
307 ¥	01453-L22689	LLGL1	17-018.08	CAGCAGTCTGCA-TCTCTGGGAGAT	8500 kb

Los kits P374 y P369 permiten el análisis de un mayor número de sondas para esta región.

2.5.18. Síndrome microdelección NF1, 17q11.2

Longitud (nt)	SALSA MLPA	Gen	MV36	Secuencia parcial sonda	Distancia entre sondas
339 *	02507-L22694	NF1, Exon 17	17-026.58	GGATCATGAAGA-ATTACTACGTAC	113 kb
260 *	11732-L13830	NF1, Exon 45	17-026.69	TCTTGTTGTCTT-TGGGTGTATTAG	

Los kits P372, P081 y P082 permiten el análisis de un mayor número de sondas para esta región.

2.5.19. Síndrome microdelección 17q21.31

Longitud (nt)	SALSA MLPA	Gen	MV36	Secuencia parcial sonda	Distancia entre sondas
272 *	08365-L22699	MAPT	17-041.46	GTCGCCAGTGGT-GTCTGGGGACAC	43 kb
346 *	18172-L22729	KANSL1	17-041.50	CCGCTTCTTACA-GCTCAGTACAGG	

Los kits P371 y P275 permiten el análisis de un mayor número de sondas para esta región.

2.5.20. Síndrome de DiGeorge 22q11 y región distal 22q11

Longitud (nt)	SALSA MLPA	Gen	MV36	Secuencia parcial sonda	Distancia entre sondas
	02725-L16344	IL17R	Sonda P069 / P070 para 22q11		647 kb
	01740-L01310	BID	Sonda P036 para 22q11		1285 kb
196	01218-L06270	CLDN5, AB-region	22-017.89	TTCGCCAACATT-GTCGTCCGCGAG	200 kb
208 ¥	05464-L15184	GP1BB, AB-region	22-018.09	CACAACCGAGCT-GGTGCTGACCGG	1480 kb
373 *	16748-L19368	SNAP29, CD-region	22-019.57	GTATCCACTTAC-CTGTATCATCCA	814 kb
220 *	07530-L22697	PPIL2; distal 22q11	22-020.38	GAAGAGCCCTCA-ACCAGTGCCACT	1354 kb
265 *	08484-L22698	RTDR1; distal 22q11	22-021.73	GGTGTGTCATTT-TGACGTCATCCC	

Los kits P372 y P250 permiten el análisis de un mayor número de sondas para esta región.

2.5.21. Síndrome de Phelan-McDermid, 22q13

Longitud (nt)	SALSA MLPA	Gen	MV36	Secuencia parcial sonda	Distancia entre sondas
	02707-L00661	ARSA	P069 / P070 probe for 22q13		48 kb
252 *	12031-L13828	SHANK3	22-049.46	AAGCGGCGAGTT-TATGCCCAGAAC	91 kb
382 *	06734-L05558	RABL2B	22-049.55	AATACACAAGCC-GTAAAAATCGAGT	

Los kits P373 y P188 permiten el análisis de un mayor número de sondas para esta región.

2.5.22. MECP2/duplicación Xq28, duplicación MECP2

Longitud (nt)	SALSA MLPA	MECP2	MV36	Secuencia parcial sonda	Distancia entre sondas
202 ¥	03409-L16570	Exon 1	X-153.02	CATTAATCCTTA-ACATTCAAATTC	65 kb
184 *	15319-L17592	Exon 3	X-152.95	ACTTGTCTGCA-GACTGGCATGTT	2 kb
148 ¥	09310-L13824	Exon 4	X-152.95	TTTCATCCTCCA-TGCCAAGGCCAA	

Los kits P374, P015 y P049 permiten el análisis de un mayor número de sondas para esta región.

Protocolo

Desnaturalización del ADN e hibridación de las sondas.

- ✓ Diluir las muestras, 1µl de ADN (100 ng) en H₂O a un volumen final de 5 µl.
- ✓ Calentar 5 min a 98 °C, enfriar a 25 °C.
- ✓ Agregar 1.5 µl de *Probe mix* + 1.5 µl de tampón MLPA (el tampón es viscoso y no se mezcla fácilmente; **NO** centrifugar, porque pueden precipitar las sondas más largas).
- ✓ Incubar 1 min a 95 °C, incubar 16 hrs a 60 °C (el tiempo de hibridación puede oscilar entre 12 y 24 hrs, aunque 12 hrs debe ser suficiente).

Factores limitantes:

- La muestra de ADN debe estar disuelta en TE (10mM TrisHCl pH: 8,2; 1mM EDTA.
- La concentración de EDTA en la muestra de ADN no debe de exceder de 1mM y el volumen de ADN de 5 µl. El volumen de la reacción influye en la velocidad de hibridación, la cual es dependiente de la concentración de sales y de las sondas. De la concentración de sales también depende la temperatura de fusión sonda-secuencia homóloga.
- Algunas sondas hibridan más rápidamente a su molde que otras, por ello la concentración de las sondas en el kit ha sido ajustada para que cada una de estas sondas tenga más de un 90% de hibridación en las 16 hrs de incubación a 60°C. Ciertos errores que pueden dar lugar a un fallo de hibridación:
 - Fallo en la desnaturalización de la muestra antes de añadir las sondas.
 - Incubación a 60°C 16 min en lugar de 16 horas.
 - Uso insuficiente de mezcla de sondas o del buffer de MLPA.
 - Fallos en la temperatura de la tapa de la PCR. Esto puede provocar evaporación de la muestra.

Ligación

La mezcla de ligación se puede preparar 1 hora antes de su uso, manteniendo en hielo: 3 µl de *buffer A ligase-65*, 3µl de *buffer B- ligase*, 25 µl de H₂O y 1 µl de *ligase-65*.

- ✓ Reducir la temperatura del termociclador a 54 °C. Manteniendo a 54 °C agregar 32 µl de la mezcla de ligación.
- ✓ Incubar 15 min a 54 °C, seguidamente calentar 5 min a 98 °C (después de inactivar la ligasa a 98 °C se pueden guardar las muestras hasta 1 semana a 4°C, si es necesario más tiempo se pueden conservar a -20 °C.

Reacción de amplificación (PCR).

La mezcla se puede preparar 1 hora antes de su uso, manteniendo en hielo: 2 µl de PCR-primers, 2 µl de *buffer Enzyme dilution*, 5,5 µl de H₂O y 0,5 µl de polymerase. Mezclar bien.

- ✓ Mantener los tubos con los 40 µl de la reacción de ligación en el termociclador a 60°C.
- ✓ Agregar 10 µl del *mix polymerase* a cada tubo y realizar la amplificación.

Condiciones de PCR para 33 ciclos:

- ✓ Desnaturalización: 95°C – 30 seg
- ✓ *Anneling*: 60 °C – 30 seg
- ✓ Extensión: 72 °C – 60 seg
- ✓ Último ciclo: 72 °C – 20 min
- ✓ Conservar a 4 °C

Las muestras se pueden guardar hasta 1 semana a 4°C, si es necesario más tiempo se pueden conservar a -20 °C, protegidos de la luz.

Electroforesis capilar.

- ✓ Diluir la muestra de la PCR, al menos 1/10 (esto dependerá de cada kit de MLPA).
- ✓ 1 µl de muestra diluida + 9 µl de formamida Hi-Di™ (Applied Biosystem) + 0,1 – 0,2 µl de marcador de tamaño GeneScan™-500LIZ™ Sized Standard (Applied Biosystems).

- ✓ Desnaturalizar 3 min a 95 °C e inmediatamente dejar a 4 °C hasta cargar las muestras.
- ✓ Condiciones de carrera ABI3730:
 - Inyección: Voltaje de 1,2 Kv durante 23 seg.
 - Electroforesis: polímero POP-7™ Performance Optimized Polymer (Applied Biosystems). Voltaje 15 Kv durante 40 min. Tampón de electroforesis 10x buffer con EDTA (Applied Biosystems).

Factores limitantes:

- Antes de la inyección del producto de PCR en el secuenciador hay que preparar la muestra. Es muy importante añadir formamida y desnaturalizar la mezcla. En caso contrario puede que fragmentos con bajo contenido en GC se desnaturalicen a temperatura ambiente, sin embargo fragmentos con un alto contenido en GC no se desnaturalicen si no calentamos la muestra al menos a 80 °C durante dos minutos.
- En este sentido hay que destacar que no por inyectar más muestras vamos a tener mejores resultados. Cuando inyectamos más volumen de PCR también aumentamos la concentración de sales, lo cual induce *reannealing* de los fragmentos de ADN. A veces se observan picos duplicados, realizando una dilución de las muestras se obtienen mejores resultados.
- La formamida tiende a transformarse en ácido, lo que puede dar lugar a la depurinación y fragmentación cuando se somete la muestra a desnaturalización.

Análisis de los resultados.

Análisis de los datos crudos.

Es muy importante analizar las características de los fragmentos relacionados con la cantidad de ADN, la calidad de la desnaturalización de las muestras y la ligación de las sondas. Estos fragmentos se analizan utilizando el programa Genemapper.

Parámetros de calidad:

- Cantidad de ADN: los picos indicativos de la cantidad de ADN son los correspondientes a 64, 70, 76 y 82nt. Estos fragmentos

denominados Q-fragments no son dependientes de la ligación y están presentes en pequeñas cantidades. Cuando la reacción de MLPA se ha desarrollado correctamente, estos picos no se detectan ya que su intensidad es muy baja.

Cuando el tamaño de estos 4 picos es superior a la mitad del pico del control de ligación de 92nt y de los picos correspondientes a las sondas del MLPA, puede haber fallado la reacción de PCR, la reacción de ligación o la cantidad de ADN empleada es insuficiente.

- Ligación: el pico indicativo de la reacción de ligación es el correspondiente a 92nt. Este pico es también un control de desnaturalización.
- Desnaturalización: la mayoría de los kits de MLPA contienen 3 controles de desnaturalización que incluye el de ligación (88, 92 y 96nt)(D-fragments). Al contrario de los controles de cantidad de ADN, éstos son dependientes de ADN y de ligación, por lo que se comportan como las sondas del kit de MLPA. Tendrán la misma intensidad que las sondas del MLPA cuando la reacción de ligación, la cantidad de ADN y la desnaturalización del mismo se ha desarrollado correctamente.

El fragmento de 92nt reconoce una secuencia de la región cromosómica 2q14, el de 88nt reconoce la isla CpG del gen FANCE y el de 96nt una isla CpG del gen TP73. Estas dos islas CpG tienen un alto porcentaje de GC, por lo que la desnaturalización es más difícil.

En el caso que las intensidades de las señales de los fragmentos de 88nt y 96nt sean mucho más bajas (<33%) que la correspondiente al fragmento de 92nt y otras sondas del kit, indicaría problemas de desnaturalización. Es posible que la desnaturalización del ADN haya sido incompleta y por lo tanto que no tengamos resultados de las sondas que detectan secuencias localizadas cercas de islas CpG (<5kb). En este caso observaremos que se ven afectadas las sondas correspondientes al exón 1 de los genes en estudio, ya que estos suelen tener un contenido alto de GC.

En ocasiones la desnaturalización incompleta se debe a un exceso de sales y metales en la muestra.

Los kits SALSA MLPA contienen dos sondas que nos indican el sexo de la muestra. La de 100nt es específica del cromosoma X y la de 105nt del cromosoma Y. Estos fragmentos, al igual que los controles de calidad, no suelen estar incluidos en los paneles de análisis. Por ello es importante analizarlos utilizando el programa GeneMapper.

Análisis semicuantitativo de las sondas MLPA.

Se analizan con el programa GeneMarker que normaliza las intensidades de los picos de los diferentes fragmentos obtenidos mediante su aplicación “análisis MLPA”, permitiendo la comparación por altura o área.

Cada kit SALSA MLPA consta de sondas específicas de los fragmentos que queremos estudiar y otras que hibridan con otras regiones del genoma y que vamos a utilizar como referencia para el análisis semicuantitativo de las sondas en estudio.

Datos a tener en cuenta para el análisis de los datos:

- ✓ La normalización sólo se podrá desarrollar sobre muestras:
 - Extraídas con el mismo método: aunque la reacción de MLPA, generalmente, es muy reproducible, factores como la extracción del ADN o su mantenimiento pueden influir en el patrón de los picos del MLPA. Esto no suele afectar porque cuando analizamos lo normal es que todas las muestras procedan del mismo tipo de muestra y se hayan extraído con el mismo procedimiento. Si no es así, la purificación de la muestra de ADN es de gran ayuda.
 - Se han separado mediante electroforesis en el mismo experimento.
 - Analizadas con el mismo lote de sondas.
- ✓ Confirmar que el panel de análisis que se está utilizando es el apropiado para el lote del kit que hemos utilizado en la reacción de MLPA.

- ✓ Por cada 21 muestras hay que incorporar 3 muestras de control por cada experimento de MLPA. Para más de 21 muestras se añade un control adicional por cada 7 muestras.
- ✓ En cada experimento debe incorporarse un control negativo.

MRC Holland, fabricante de los kits SALSA MLPA, define la señal relativa de cada sonda como el cociente entre el área del pico de la amplificación de cada producto amplificado y el área total de los picos correspondientes a los fragmentos de las sondas control de cada kit. Los resultados de esta normalización dependen del número de pacientes control que se introduzcan, sondas control, localización cromosómica de las sondas controles y el origen de las muestras que utilicemos como control.

Para cada kit de MLPA se recomienda una tipo de normalización determinado y adecuado al estudio que queremos realizar. GenMarker te indica si se quiere utilizar como medida de estudio el área o la altura del pico. Como normal general se utiliza el área, excepto en aquellos casos en los que los picos son anchos (*broad*) y se utiliza la altura.

Corrección de la pérdida de señal en las sondas más largas (*sloping*): en algunos kits el tamaño de las sondas más grandes son incluso 3 veces más largas que las sondas más pequeñas del mismo lote. Este tipo de errores se deben de corregir cuando la pérdida de señal de las sondas correspondientes a la muestra en estudio respecto a la de los controles es diferente.

El sistema permite emitir un informe estándar con los resultados del análisis. En el informe se recogen todos los datos técnicos utilizados para el análisis, una imagen gráfica del resultado de los picos de fluorescencia y su tamaño, así como una tabla con todas las sondas utilizadas y la dosis de cada una de ellas en la muestra de estudio. Si la dosis de una sonda difiere del control, pérdida o ganancia, aparece sombreado.

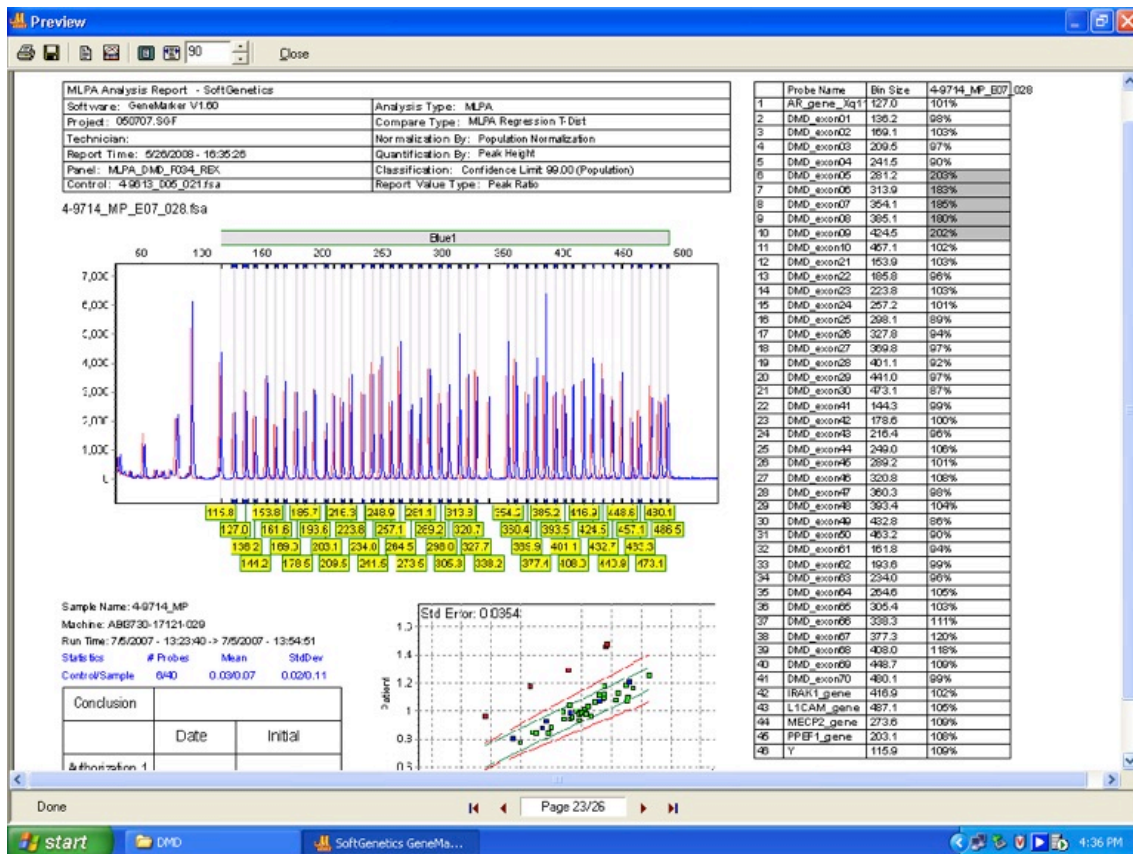


Figura PM-3: Informe estándar del análisis de fragmentos de MLPA con el programa GeneMarker.

2.6. Hibridación in situ fluorescente

En aquellos pacientes donde se identificó una microdelección/microduplicación realizamos un análisis, mediante hibridación in situ fluorescente, con sonda específica. Para ello utilizamos las preparaciones que teníamos de los análisis citogenéticos, mediante técnicas de bandeado cromosómico, realizados. Estas preparaciones cromosómicas presentaban tanto células en interfase como células en metafase.

Mediante un microscopio de contraste de fases (Nikon Diaphot) valoramos la calidad de la preparación.

Fundamentalmente se valoró, el número de metafases, longitud de cromosomas y presencia de citoplasma. Si las preparaciones no fueran adecuadas, se realizaron nuevas preparaciones a partir de la muestra almacenada en fijador carnoy a -20 °C.

Alternativamente en aquellas preparaciones con presencia de abundantes restos citoplasmáticos, realizamos un lavado:

- ✓ 2xSSC (pH7,4) durante 13 min a 72 °C.
- ✓ Solución de pepsina (10 ml. HCl 0,01N/ 100 mg. de pepsina) durante 13 min a 37 °C.
- ✓ PBS a temperatura ambiente durante 5 min.
- ✓ Solución de formaldehído (PBS/formaldehído) a temperatura ambiente durante 5 min.
- ✓ PBS a temperatura ambiente durante 5 min.
- ✓ Deshidratación por sucesivos lavados en solución de etanol al 70%, 80% y 100% a temperatura ambiente durante 1 min en cada solución.
- ✓ Dejar secar a temperatura ambiente.

Hemos utilizado sondas comerciales (Vysis) para confirmar el análisis mediante MLPA y para identificar posibles reordenamientos familiares. Las diferentes tipos de sondas empleadas son:

- ✓ Locus específicas: son pequeños fragmentos de ADN que hibridan en una localización cromosómica concreta.
- ✓ Centroméricas: están constituidas por fragmentos de ADN que hibridan específicamente en el centrómero cromosómico. Actualmente hay disponibles sondas centroméricas para la mayoría de los cromosomas.
- ✓ Sondas subteloméricas: dado que las secuencias teloméricas son comunes a todos los cromosomas, se han diseñado sondas próximas a esta región, para cada brazo cromosómico.

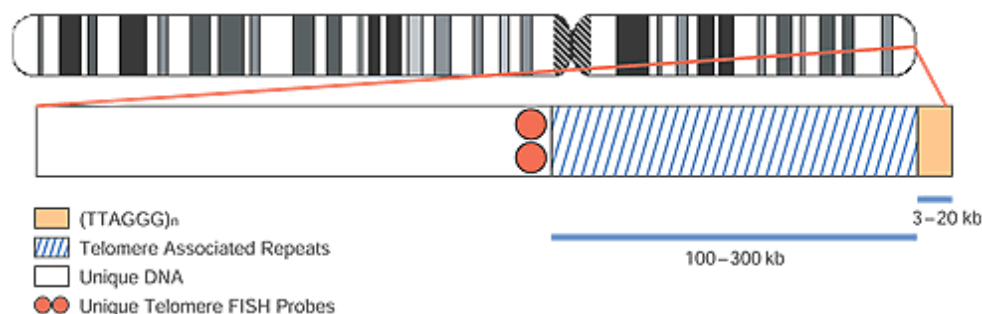


Figura PM-4: Localización de las sondas subteloméricas.

La relación de sondas utilizadas:

2.6.1. Microdelección 1p36. La mezcla de sondas LSI está constituida por:

Sonda	Locus	Fuorocromo
1pTEL	1pTEL	SpectrumGreen
LSI p58	1p36	SpectrumOrange
LSI 1q25	1q25	SpectrumAqua

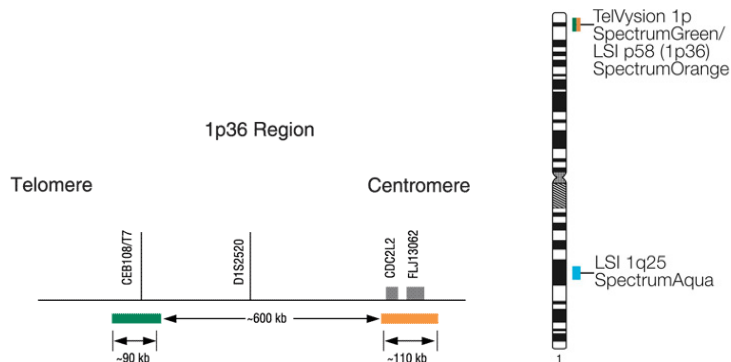


Figura PM-5. Localización de las sondas e idiograma, región 1p36.

Patrón de hibridación. El kit está constituido por dos sondas en la región 1p36. Una sonda telomérica 1pTEL y una sonda proximal 1p36. Estas dos sondas permiten identificar patrones de microdelecciones totales o parciales de la región 1p36. La sonda LSI 1q25 se utiliza como control de hibridación.

2.6.2. Microdelección/Microduplicación 3q29.

Sonda	Locus	Fuorocromo
TelVysion 3p	<i>D3S4559</i>	SpectrumGreen
TelVysion 3q	<i>D3S4560</i>	SpectrumOrange

Patrón de hibridación. Hibridamos con la sonda subtelomérica TelVysion 3q localizada en 3q29 y utilizamos como control de hibridación la sonda TelVysion 3p localizada 3p26.

2.6.3. Síndrome de Wolf-Hirschhorn (Microdelección 4p16.3). La mezcla de sondas está formada por la sonda LSI *WHS* y la sonda centromérica CEP 4.

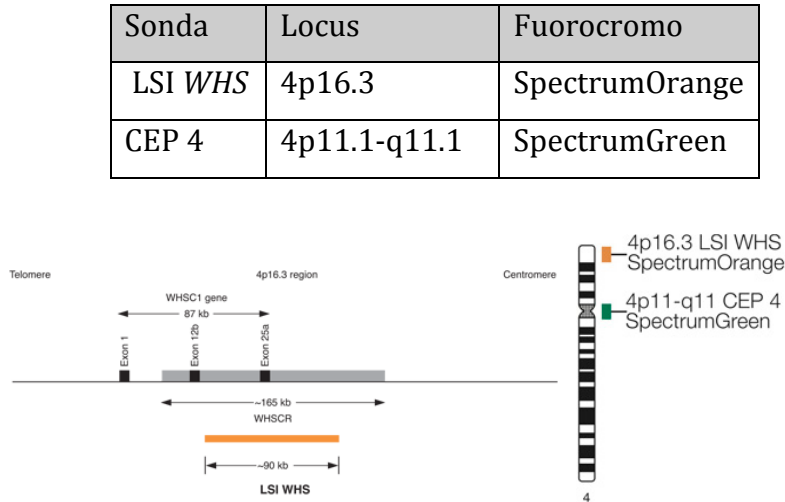


Figura PM-6. Localización de la sonda LSI *WHS* e idiograma, región 4p16.3.

Patrón de hibridación. En pacientes con síndrome de Wolf-Hirschhorn se observa la ausencia de la sonda específica LSI *WHS*. La sonda centromérica CEP 4 se utiliza como control de hibridación.

2.6.4. Síndrome de Cri-du-Chat (Microdelección 5p15.2). La mezcla de sondas está constituida por la sonda LSI *D5S23*, *D5S721* y la sonda LSI *EGR1*.

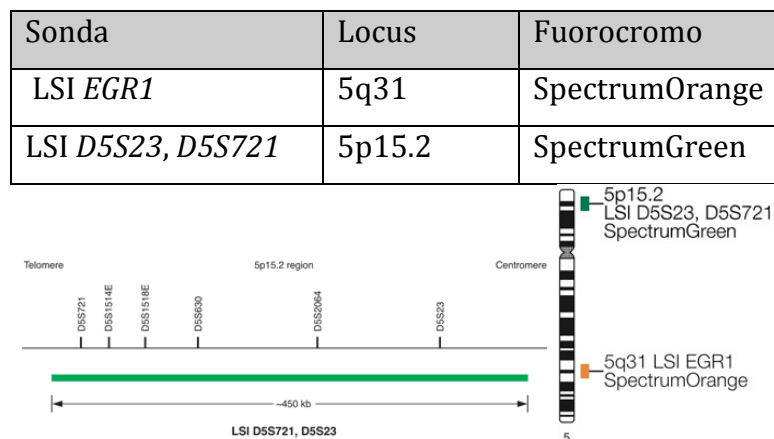


Figura PM-7. Localización de la sonda LSI *D5S23*, *D5S721* e idiograma, región 5p15-2.

Patrón de hibridación. En pacientes con síndrome de Cri-du-Chat se observa la ausencia de la sonda específica LSI *D5S23/D5S721*. La sonda LSI *EGR1* se utiliza como control de hibridación.

2.6.5. Síndrome de Sotos (Microdelección 5q35). La mezcla de sondas está constituida por la sonda LSI *NSD1* y la sonda LSI *D5S23, D5S721*.

Sonda	Locus	Fuorocromo
LSI <i>NSD1</i>	5q35	SpectrumOrange
LSI <i>D5S23, D5S721</i>	5p15.2	SpectrumGreen

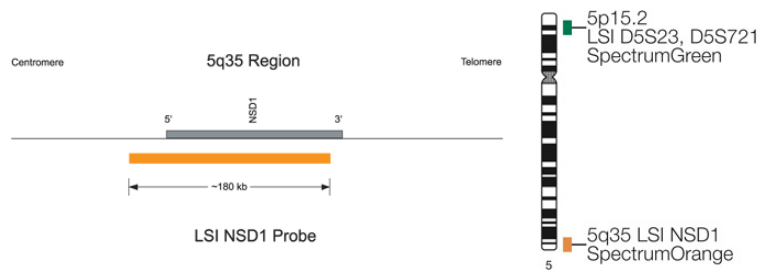


Figura PM-8. Localización de la sonda LSI *NSD1* e idiograma, región 5p15-2.

Patrón de hibridación. En pacientes con síndrome de Sotos se observa la ausencia de la sonda específica LSI *NSD1*. La sonda LSI *D5S23, D5S721* localizada en 5p15.2 se utiliza como control de hibridación.

2.6.6. Síndrome de Williams (microdelección 7q11.23). La mezcla de sondas está formada por la sonda LSI *ELN* y la sonda LSI *D7S486, D7S522*.

Sonda	Locus	Fuorocromo
LSI <i>ELN</i>	7q11.23	SpectrumOrange
LSI <i>D7S486, D7S522</i>	7q31	SpectrumGreen

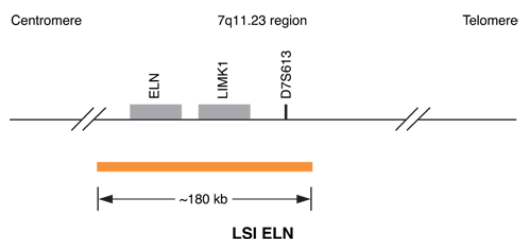


Figura PM-9. Localización de la sonda LSI *ELN* e idiograma, región 7q11-23.

Patrón de hibridación. En pacientes con síndrome de Williams se observa la ausencia de la sonda específica LSI *ELN*. La sonda LSI *D7S486*, *D7S522* se utiliza como control.

2.6.7. Síndrome de Prader-Willi/Angelman (microdeleción 15q11-13). La mezcla de sondas está constituida por la sonda LSI *PML*, LSI *SNRPN* y LSI *D15Z1*.

Sonda	Locus	Fuorocromo
LSI <i>PML</i>	15q22	SpectrumGreen
LSI <i>SNRPN</i>	15q11-13	SpectrumOrange
LSI <i>D15Z1</i>	15p11.2	SpectrumAqua

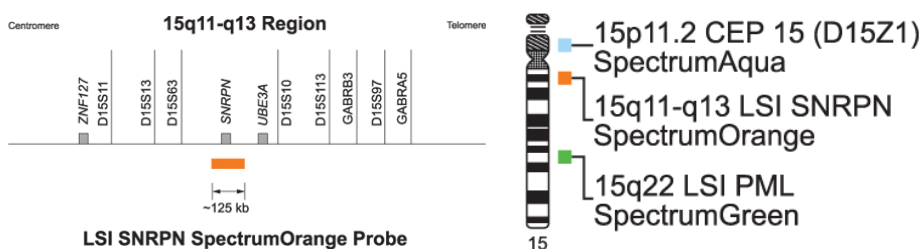


Figura PM-10. Localización de la sonda LSI *SNRPN* e idiograma, región 15q11-q13.

Patrón de hibridación. En los pacientes con síndrome de Prader-Willi/Angelman debido a la deleción de la región 15q11-13 paterna y materna respectivamente se observa la ausencia de la sonda específica LSI *SNRPN*. Las sondas LSI *D15Z1* y LSI *PML* se utilizan como sondas control.

2.6.8. Síndrome de Miller-Dieker / Lisencefalia (microdeleción 17p13.3).

La mezcla de las sondas está constituida por LSI *LIS1* y LSI *RARA*.

Sonda	Locus	Fuorocromo
LSI <i>RARA</i>	17q21.1	SpectrumGreen
LSI <i>LIS1</i>	17p13.3	SpectrumOrange

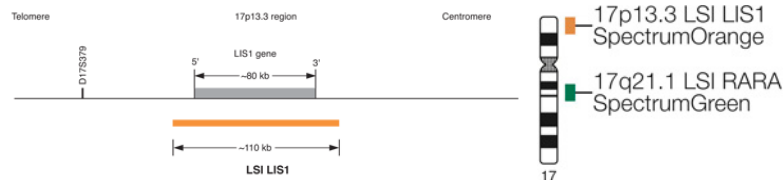


Figura PM-11. Localización de la sonda LSI *LIS1* e idiograma, región 17p13.3.

Patrón de hibridación. En pacientes con síndrome de Miller-Dieker se observa la ausencia de la sonda específica LSI *LIS1*. La sonda LSI *RARA* se utiliza como sonda control.

2.6.9. Síndrome de Smith-Magenis / Potocki-Lupski (microdeleción / microduplicación 17p11.2). La mezcla de las sondas está formada por LSI *SMS* y LSI *RARA*.

Sonda	Locus	Fuorocromo
LSI <i>RARA</i>	17q21.1	SpectrumGreen
LSI <i>SMS</i>	17p11.2	SpectrumOrange

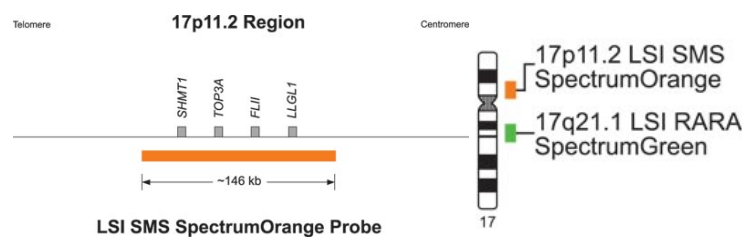


Figura PM-12. Localización de la sonda LSI *SMS* e idiograma, región 17p11.2.

Patrón de hibridación. En pacientes con síndrome de Smith-Magenis se observa la ausencia de la sonda LSI *SMS*. En pacientes con síndrome de Potocki-Lupski se observa una señal extra correspondiente a la sonda LSI *SMS*. La sonda LSI *RARA* se utiliza como sonda control.

2.6.10. Síndrome microdelección 17q21. La sonda de se extiende a lo largo del gen *MAPT*.

Sonda	Locus	Fuorocromo
LSI <i>MAPT</i>	17q21	SpectrumGreen

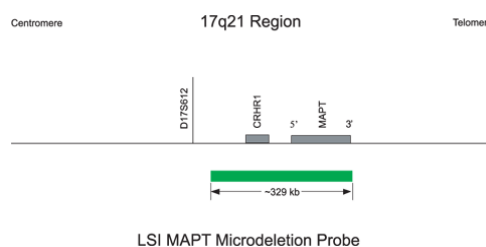


Figura PM-13. Localización de la sonda LSI *MAPT* (17q21).

Patrón de hibridación. En pacientes con microdelección 17q21 se observa la ausencia de la sonda específica LSI *MAPT*.

2.6.11. Síndrome de DiGeorge (Microdelección 22q11.2). La mezcla de sondas está constituida por la sonda LSI *TUPLE1* y TelVysion 22q.

Sonda	Locus	Fuorocromo
TelVysion 22q	22q13.3	SpectrumGreen
LSI <i>TUPLE1</i> (<i>HIRA</i>)	22q11.2	SpectrumOrange

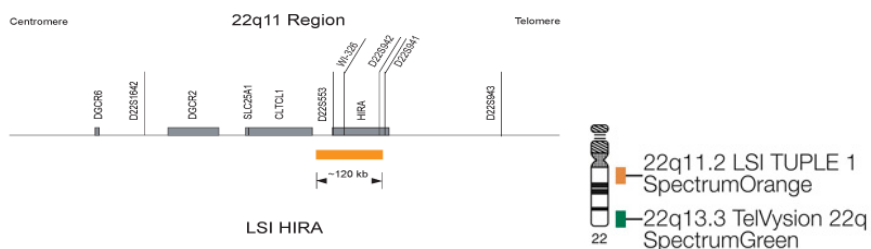


Figura PM-14. Localización de la sonda LSI *TUPLE1* (*HIRA*) e idiograma, región 22q11.2.

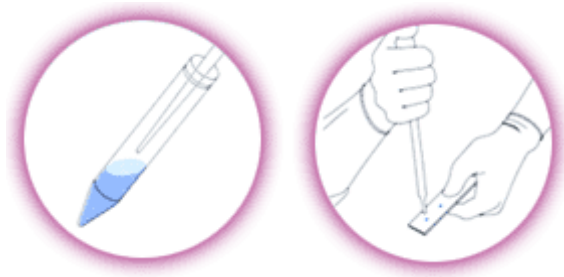
Patrón de hibridación. En pacientes con síndrome de DiGeorge se observa ausencia de la sonda específica LSI *TUPLE1*. La sonda TelVysion 22q se utiliza como sonda control.

Protocolo

En general se obtienen mejores resultados si las preparaciones están recién preparadas y dejarlas secar a temperatura ambiente. Es importante evaluar la preparación, previa a la hibridación, y si la calidad no es óptima es preferible preparar una nueva extensión.

i. Hibridación.

- ✓ Identificar la zona donde se localizan las células.



- ✓ Preparar el baño a 73 °C.

Las sondas para hibridación in situ fluorescente son sensibles a la luz, a partir de este paso hay que trabajar en un ambiente con poca luz.

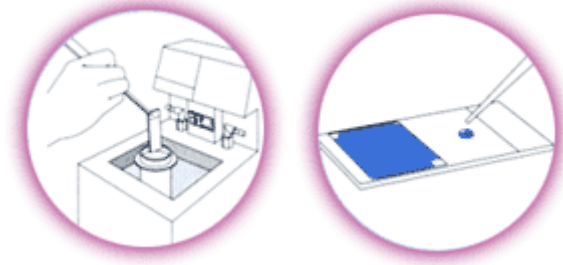
- ✓ Preparar las sondas que están a -20 °C. En general es suficiente sacarlas 5-10 min. antes de su utilización. Preparación de la sonda:

- Vortex
- Pulso durante 30 seg.
- Cóctel de hibridación

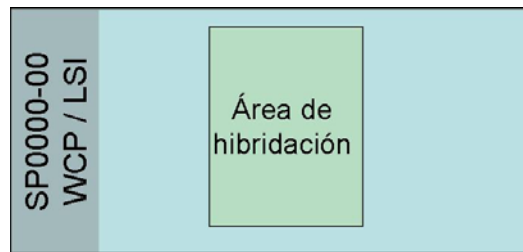
Sonda	1 μ l
Agua	2 μ l
Tampón de hibridación (LSI/CEP o WCP)	7 μ l

- ✓ Vortex
- ✓ Pulso durante 30 seg.
- ✓ Colocar las preparaciones en el Hybrate.

- ✓ Añadir, sobre la zona previamente seleccionada, los 10 µl de la solución de la sonda.
- ✓ Poner un cubre sobre la superficie de hibridación. Asegurarse que no se forman burbujas.



Cubrir la zona de hibridación con un Parafilm



- ✓ Seleccionar el programa en el Hybrate:

Programas:

Programa 1: Linfocitos

WCP	73 °C – 3 min	37°C-16hrs.
CEP	73 °C – 1 min	37°C- 45 min - 16hrs.
LSI	73 °C – 2 min	37°C-16hrs.

Programa 2: Células de líquido amniótico

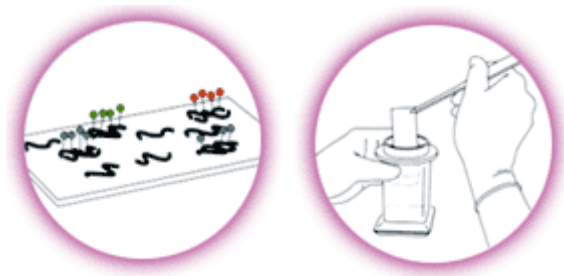
LSI	73 °C – 2 min	37°C-16hrs.
-----	---------------	-------------

ii. Lavado de las muestras de hibridación in situ fluorescente.

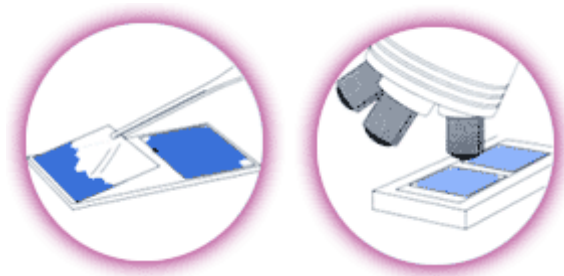
- ✓ Preparar un pocillo coplin con solución de lavado 1: 0.4xSSC/0.3% NP-40 y dejar en un baño a 73 °C (*en general, el pocillo coplin deberá*

introducirse a temperatura ambiente, si se mete a 73 °C existe un alto riesgo de que se rompa por la temperatura).

- ✓ La solución de lavado 2: 2xSSC/0.1%NP-40 en coplin a temperatura ambiente.
- ✓ Lavar las preparaciones hibridadas en la solución de lavado 1 durante 2 min a 73 °C.
- ✓ Lavar las preparaciones hibridadas en solución de lavado 2 durante 1 min a temperatura ambiente.



- ✓ Secar a temperatura ambiente en oscuridad.
- ✓ Aplicar 10 µl de contratinción DAPI II y cubrir con cubre-objetos.
- ✓ Valorar en microscopio de luz UV.



Solución de lavado 1	
20xSSC	20 ml.
NP-40	3 ml.
Agua csp	1 L.

- ✓ Ajustar pH 7.0-7.5 con NaOH. Filtrar y conservar a temperatura ambiente.

Solución de lavado 2	
20xSSC	100 ml.
NP-40	1 ml.
Agua csp	1 L.

- ✓ Ajustar pH 7.0-7.5 con NaOH. Filtrar y conservar a temperatura ambiente.

iii. Valoración de una muestra de hibridación in situ

En general cuando se hibrida con dos o más sondas es posible valorar la muestra bien con filtros individuales o con filtros multibanda. Sin embargo, las células con núcleos pequeños o condensados son más difíciles valorar con filtros multibanda, debido fundamentalmente a la disposición espacial de la señal de la sonda en el núcleo o a la dificultad de identificar baja intensidad de la señal.

- ✓ No valorar células en contacto o superpuestas.
- ✓ Las señales difusas se valoran si están separadas del resto de las señales.
- ✓ Señales desdobladas ("*split*"): dos señales pequeñas muy próximas. Se valoran como una única señal. Las dos señales representan un complemento cromosómico único.
- ✓ Contar como una señal cuando dos señales estén conectadas por un hilo fluorescente.
- ✓ No valorar células que no contengan señales aún cuando estén rodeadas de células que contengan señales.
- ✓ No valorar núcleos que estén dañados y no estén en toda su integridad.
- ✓ No valorar núcleos con señales superpuestas de diferente color.
- ✓ No contar señales de hibridación no específicas. Estas señales se pueden reconocer por su baja intensidad y diferente morfología.
- ✓ No valorar núcleos con señales localizadas en la periferia.
- ✓ Contar solo núcleos en los que se pueda realizar un conteo exacto de las señales, obviar el resto.

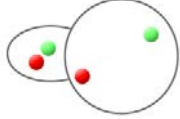
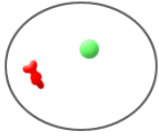
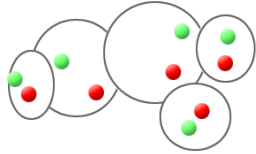
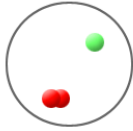
<p>No valorar. Los núcleos están superpuestos, no son visibles todas las áreas de los núcleos.</p>	
<p>Contar como una señal roja y una señal verde. La señal roja está difusa.</p>	
<p>No valorar. Los núcleos están demasiado juntos como para poder identificar los límites de cada uno de ellos.</p>	
<p>Contar como una señal roja y una señal verde. La señal roja está desdoblada.</p>	

Figura PM-15: Valoración de las señales FISH.

El resultado de la hibridación se observa mediante un microscopio de fluorescencia con los filtros específicos para cada fluorocromo. Las imágenes se captan con una cámara CCD y se procesan con el *software* específico (*Cytovision, Applied Imagin, Sunderland, UK*).

Se analizaron al menos 10 metafases en las que las señales control estuvieran presentes. En los síndromes de microduplicación, se analizaron células en interfase adicionales.

2.7. Análisis molecular mediante marcadores microsatélites del cromosoma 15.

Hemos realizado el análisis, mediante microsatélites del cromosoma 15, con el siguiente panel de STRs.

La secuencia de los primers utilizados para la amplificación de cada STR es la siguiente:

Locus	Secuencia (5' to 3')	Tamaño
<i>D15S541F</i>	GCATTTTTGGTTACCTGTATG	137-149
<i>D15S541R</i>	GTCTTCCAGGTTTATGGTTGTC	
<i>D15S11F</i>	GACATGAACAGAGGTAAATTGGTGG	130-132
<i>D15S11R</i>	GCTCTCTAAGATCACTGGATAGG	
<i>GABRB3CAF</i>	CTCTTGTTCTGTTGCTTTCAATACAC	188-193
<i>GABRB3CAR</i>	CACTGTGCTAGTAGATTCAGCTC	
<i>D15S131F</i>	GAAAGGCACCTCATCTCG	248-262
<i>D15S131R</i>	TTAAAACTCTGGAGCAGCG	
<i>D15S984F</i>	GCAGACACGCTCGCAT	219-226
<i>D15S984R</i>	GAGGCTCCGAGGGCAG	

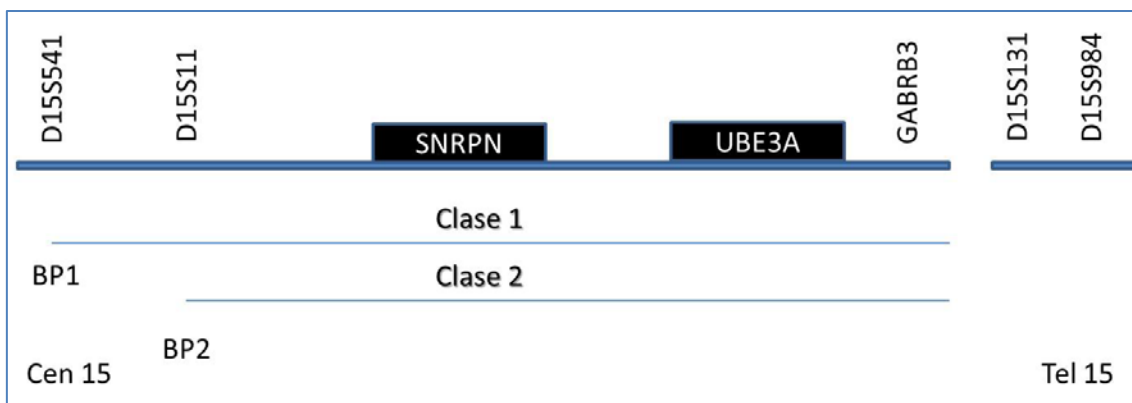


Figura PM-16: Posición de los microsatélites del cromosoma 15 utilizados en el estudio. Los marcadores *D15S541* y *D15S11* permiten determinar el punto de rotura proximal al centrómero. El marcador *GABRB3* se encuentra distal a *UBE3A* dentro de la región deleciónada en los síndromes de Prader-Willi / Angelman. Los marcadores *D15S131* y *D15S984* se encuentran fuera de la región deleciónada y son utilizados como control del cromosoma 15.

Protocolo PCR.

Para todos los marcadores utilizados, la química de la reacción de PCR inicial es la misma:

Reactivo	Cantidad
ADN	25 ng (1 µl de alícuotas a 25 ng/µl)
Buffer 10x	1 µl
Primers Forward/Reverse (10 µM)	1/1 µl
dNTPs (1.25mM)	1.6 µl
Taq DNA polimerasa (Roche Diagnostics)	0.2 µl
Agua c.s.p	10 µl

Programas de PCR:

- *D15S541, D15S11 y GABRB3*

File 55MICRO: (95°-5') → [(95°-1') → (55°-1') → (72°-1')]x 35 → (72°-7') → (4°--)

- *D15S131 y D15S984*

File 58MICRO: (95°-5') → [(95°-1') → (58°-1') → (72°-1')]x 35 → (72°-7') → (4°--)

Condiciones electroforesis capilar :

<i>Pre run voltage</i>	15 Kv
<i>Pre run time</i>	180 seg
<i>Injection voltage</i>	2 Kv
<i>Injection time</i>	10 seg
<i>Run voltage</i>	15 Kv
<i>Current stability</i>	30 µA
<i>Data delay</i>	120 seg
<i>Run time</i>	1200 seg

Inyección :

Producto PCR	1 µl
Genescan 500 Liz	0,05 µl
Formamida	9 µl

Capilar : 36 cm

Polímero : POP7

Análisis de fragmento : Software GeneMapper V4.0.

RESULTADOS

Hemos analizado 1001 pacientes según la metodología descrita, Cariotipo/FISH/MLPA. Se han identificado 102 pacientes con microdelección/microduplicación de las regiones cromosómicas analizadas. Dado que este estudio no recoge las anomalías cromosómicas más frecuentes (trisomías, monosomías ...) se han identificado anomalías en el 10,19 % de los pacientes estudiados que no se hubieran identificado mediante los estudios citogenéticos clásicos.

En aquellos casos con microdelección/microduplicación se comprobó mediante FISH la alteración observada. Igualmente se amplió el estudio familiar para descartar un posible reordenamiento.

1. Síndrome de delección 1p36 (OMIM #607872).

El síndrome de delección 1p36 se caracteriza por anomalías craneofaciales típicas (ojos deprimidos, cejas rectas, puente nasal ancho y deprimido, barbilla afilada), microbraquicefalia, epicanto y orejas anómalas y de implantación baja. Típicamente presentan retraso del desarrollo, hipotonía y retraso mental en grado variable. Son frecuentes anomalías cerebrales, defectos cardiacos congénitos, problemas de visión, sordera, anomalías esqueléticas, de los genitales y renales.

La delección 1p36 puede estar causada por diferentes mecanismos genéticos. Una gran parte de los pacientes (52%) presentan una delección terminal de la región 1p36, el 29% presentan una delección intersticial y el 12% presentan reordenamientos complejos que incluyen delecciones y/o duplicaciones de la región 1p36.

Hemos analizado un total de 10 pacientes con características clínicas compatibles. La indicación principal fue hallazgos craneofaciales típicos, retraso del desarrollo e intelectual e hipotonía.

Síndrome de delección 1p36	
No alteración identificada	8
Microdelección	1
Otras patologías	
Síndrome de Cri-du-Chat (del 5p15.2)	1
Total	10

En el paciente identificado con la microdelección realizamos un estudio mediante cariotipo/FISH con la sonda distal y proximal de la región 1p36 mostrando una delección típica. El estudio cariotipo/FISH familiar fue igualmente normal, considerándose que la anomalía era *de novo*.

En este grupo de pacientes identificamos una delección de la región crítica del síndrome de Cri-du-Chat, el análisis mediante cariotipo/FISH con la sonda de la región crítica y con la sonda subtelomérica del brazo corto del cromosoma 5, confirmó que se trataba de una delección 5p15.2pter. El análisis familiar fue normal. Se consideró que la anomalía era *de novo*.

2. Duplicación 3q29 (OMIM#611936).

Las características clínicas de los pacientes con duplicación 3q29 incluyen microcefalia, cara redonda, nariz bulbosa, fisuras palpebrales, pies planos y retraso mental leve o moderado.

Hemos realizado el estudio familiar de una duplicación 3q29.

Síndrome de duplicación 3q29	
No alteración identificada	2
Microduplicación	2
Total	4

Hemos identificado un niño con duplicación parcial de la región 3q29 con retraso mental, microcefalia y cara redondeada, nariz bulbosa en el grupo general de estudio con microdelecciones. El estudio familiar ha revelado la presencia de la misma duplicación 3q29 en el padre (I-1) y en uno de los hermanos (II-2) que adicionalmente presentaba una trisomía 21. La madre (I-2) y el hermano mayor (II-1) fueron normales.

El estudio lo realizamos con la SALSA MLPA P245 y la P373 que incluye un total de 5 sondas para la región involucrada (Figura A1-1 y A1-2 del anexo 1).

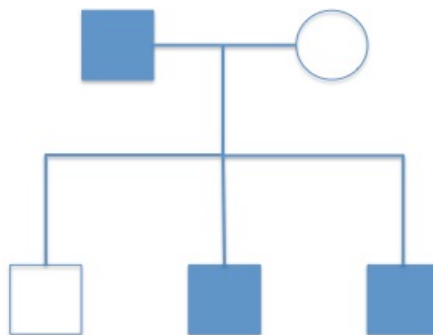


Figura R-1: Árbol genealógico de la familia con duplicación parcial de la región 3q29.

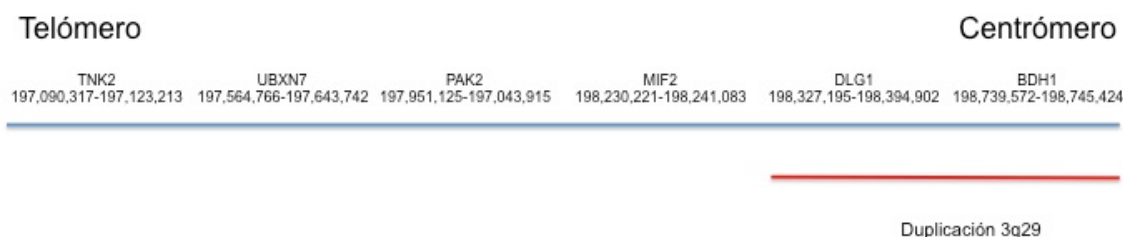


Figura R-2: Mapa de la duplicación parcial 3q29. En la parte superior se indican los locus de la región analizada.

El análisis mediante FISH con la sonda telomérica 3QTEL05 (D3S4560) localizada a 300kb del final del cromosoma 3 no incluye la región duplicada. En consecuencia, esta técnica no permite identificar la duplicación o un posible reordenamiento. Por tanto y dada las características de la familia lo más probable es que se trate de una duplicación en tándem.

3. Síndrome de Cri-du-Chat, delección 5p15.2 (OMIM#123450).

Las principales características clínicas incluyen un llanto agudo característico, microcefalia, raíz nasal ancha, epicanto, micrognatia, retraso mental y psicomotor severo. Diferentes malformaciones, aún no frecuentes, pueden estar presentes: anomalías cardíacas, renales y neurológicas, sindactilia, hipospadia y criptoquidia. La delección varía entre 5 y 40 Mb, presentando una amplia variedad clínica que se relaciona con el tamaño de la delección, presencia de una translocación en desequilibrio, mosaicismos u otros tipos de reordenamientos.

Hemos estudiado dos pacientes con características de síndrome de Cri-du-Chat, mediante MLPA con el kit P245 y ampliado el estudio con el kit P373.

Síndrome de Cri-du-Chat (del 5p15.2)	
No alteración identificada	1
Microdelección	1
Total	2

El estudio mediante FISH del paciente con la sonda de la región crítica y con la sonda subtelomérica del brazo corto del cromosoma 5, confirmó que se trataba de una delección 5p15.2pter.

El análisis familiar fue normal. Se consideró que la anomalía era *de novo*.

4. Síndrome de duplicación 5q35

Las características clínicas de la duplicación 5q35 parecen deberse a una sobreexpresión del gen NSD1 responsable del síndrome de SOTOS.

El estudio familiar de un paciente con duplicación 5q35 y clínicamente con retraso del lenguaje y problemas de aprendizaje mediante MLPA con los kits SALSA P245 y P372 y cariotipo/FISH nos permitió identificar otros miembros de la familia con la misma anomalía (Figuras A1-3 Anexo 1).

El estudio de la segregación familiar se encuentra en la figura A1-4 del anexo 1.

Síndrome de duplicación 5q35	
No alteración identificada	1
Microduplicación	2
Total	3

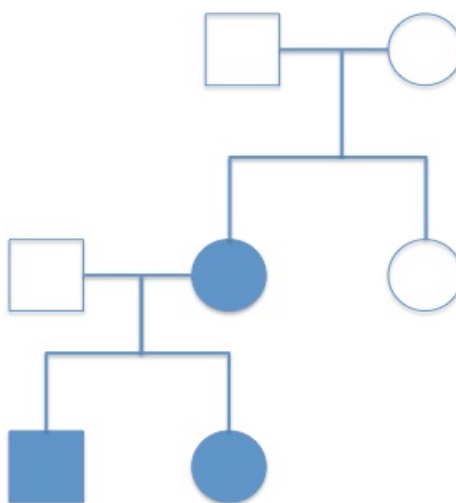


Figura R-3: Árbol genealógico. El estudio de la madre (II-2) y una hermana (III-2) reveló la presencia de la duplicación, la tía (II-3) resultó normal.

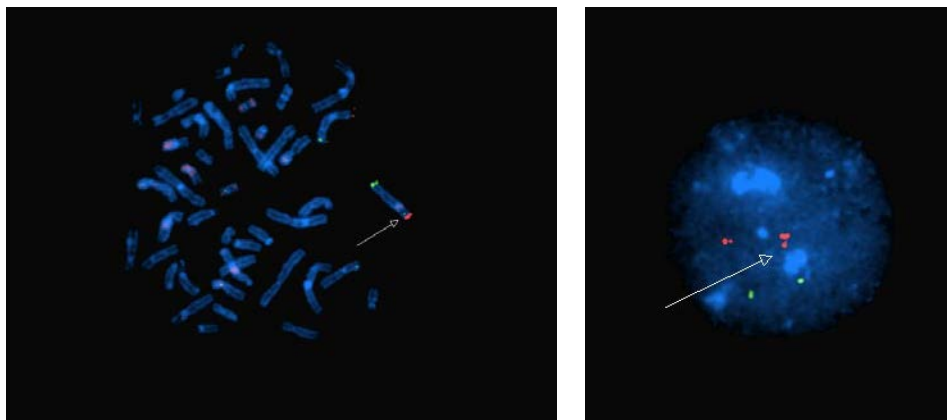


Figura R-4: El análisis mediante cariotipo/FISH en células en interfase era compatible con una dosis extra. El estudio en metafase no reveló una señal adicional, pero si una aumento de la intensidad de la señal.

5. Síndrome de Williams, del7q11.3(OMIM#194050).

El síndrome de Williams se caracteriza por la delección de genes contiguos de la región crítica del síndrome de Williams-Beuren, que incluye el gen de la elastina (ELN), y que es el responsable de una de las características fundamentales de este síndrome, la enfermedad cardiovascular (arteropatía, estenosis pulmonar periférica, estenosis aórtica supravalvular, hipertensión). Otros hallazgos clínicos incluyen facies características, anomalías del tejido conectivo, retraso intelectual (generalmente moderado), patrón cognitivo específico, personalidad característica, anomalías del crecimiento y anomalías endocrinas (hipercalcemia, hipercalciuria, hipotiroidismo). En la infancia suelen presentar dificultades de succión. La hipotonía puede dar lugar a un retraso en el desarrollo motor.

Un total de 34 pacientes fueron analizados por presentar un fenotipo compatible con síndrome de Williams. Las indicaciones más frecuente fue enfermedad cardiovascular, facies característica o problemas de aprendizaje.

Síndrome de Williams (del7q11.3)	
No alteración identificada	24
Microdelección	10
Total	34

6. Síndrome de Prader-Willi, del 15q11-q13 (OMIM#176270).

El síndrome de Prader-Willi se caracteriza por una hipotonía severa, fallo de medro, comportamiento compulsivo con la comida que le lleva a obesidad. Trastornos del comportamiento, hipogonadismo, hipoplasia genital, talla baja, facies característica, estrabismo y escoliosis son hallazgos frecuentes. La mayor parte de los pacientes (99%) presentan una deleción de la región q11-q13 del cromosoma 15 paterno o disomía uniparental materna.

Un total de 77 pacientes con hipotonía, retraso mental y talla baja, compatible con síndrome de Prader-Willi fueron estudiados.

Síndrome de Prader-Willi (del15q11-q13)	
No alteración identificada	74
Microdeleción	3
Total	77

El análisis familiar de los pacientes y progenitores mediante STRs localizados en el cromosoma 15 demostraron la presencia exclusivamente de haplotipos maternos y por tanto la microdeleción tiene lugar en el cromosoma 15 paterno.

7. Síndrome de Angelman, deleción 15q11.3(OMIM#105830).

El síndrome de Angelman se caracteriza por un severo retraso del desarrollo y retraso mental, ausencia del lenguaje, anomalías del comportamiento, microcefalia y epilepsia. Desde el año 2005 existe un consenso diagnóstico. La mayoría de los pacientes (70%) presentan una deleción de la región q11-q13 en el cromosoma 15 materno. Otros mecanismos genéticos responsables incluyen disomía uniparental paterna, defectos de impronta y mutaciones en el gen *UBE3A*. Sin embargo, el 10% de los pacientes son diagnosticados clínicamente no pudiéndose identificar la causa genética responsable.

Hemos analizado un total de 32 pacientes para síndrome de Angelman. La indicación más frecuente para este estudio fue: hipotonía y/o epilepsia.

Síndrome de Angelman (del 15q11-q13)	
No alteración identificada	27
Microdeleción	2
Otras patologías	
Síndrome dup17p11.2	1
Total	30

El análisis familiar de los pacientes y progenitores mediante STRs localizados en el cromosoma 15 demostraron la presencia exclusivamente de haplotipos paternos y por tanto la microdelección tiene lugar en el cromosoma 15 materno.

Estudio familiar en gemelos dizigóticos.

Dos pacientes, gemelos dizigóticos, presentaban delección 15q11-q13. El estudio mediante STRs del cromosoma 15 permitió identificar el origen materno del cromosoma 15 deletado.

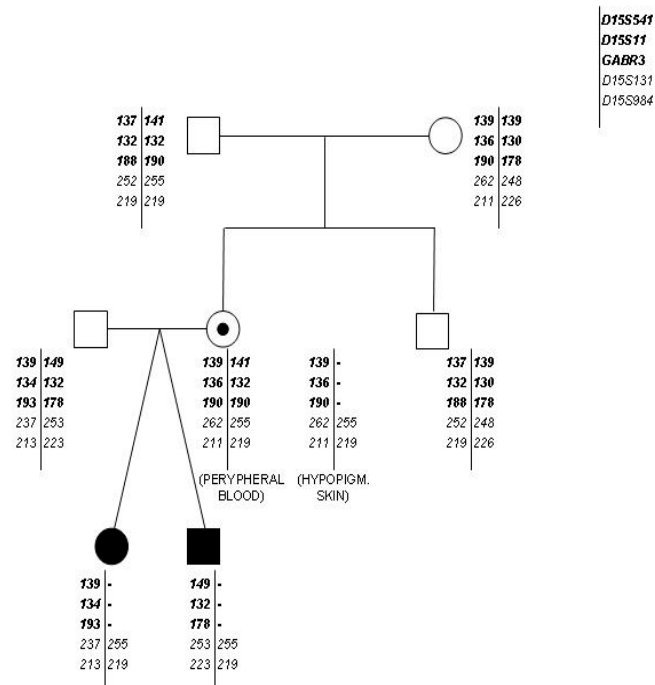


Figura R-5: Estudio familiar mediante STRs del cromosoma 15. En la madre adicional al estudio en sangre periférica se analizó tanto la piel con pigmentación normal, como la piel hipopigmentada.

El estudio familiar cariotipo/FISH/MLPA/STRs en sangre periférica resultó normal. La madre presentaba dos zonas hipopigmentadas en la cara interior de ambos antebrazos.

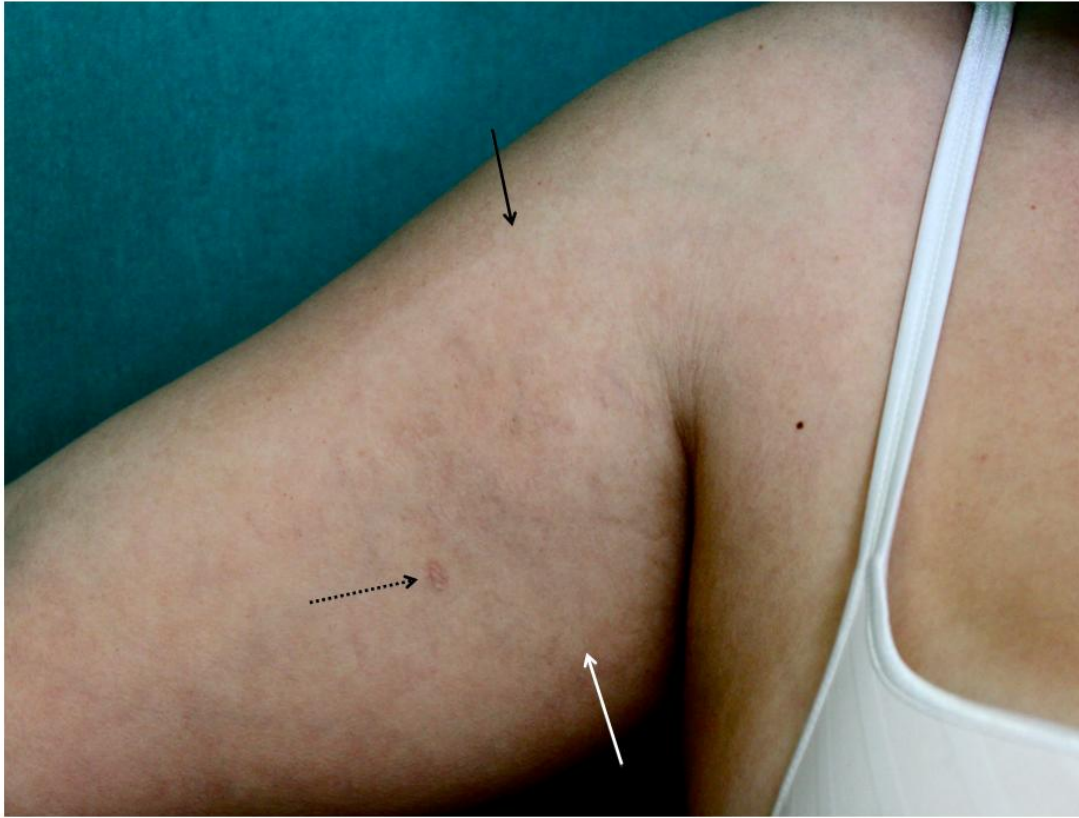


Figura R-6: Imagen de la cara interior de uno de los antebrazos. La flecha blanca y negra delimitan la zona de piel hipopigmentada. La flecha punteada indica la zona de extracción de la biopsia de piel.

El estudio citogenético/FISH/MLPA/STRs en cultivo de fibroblastos de la piel con coloración normal fue normal. La zona de piel hipopigmentada presentaba un mosaicismo con dos líneas celulares. Una línea normal y otra línea con una deleción del cromosoma 15 paterno.

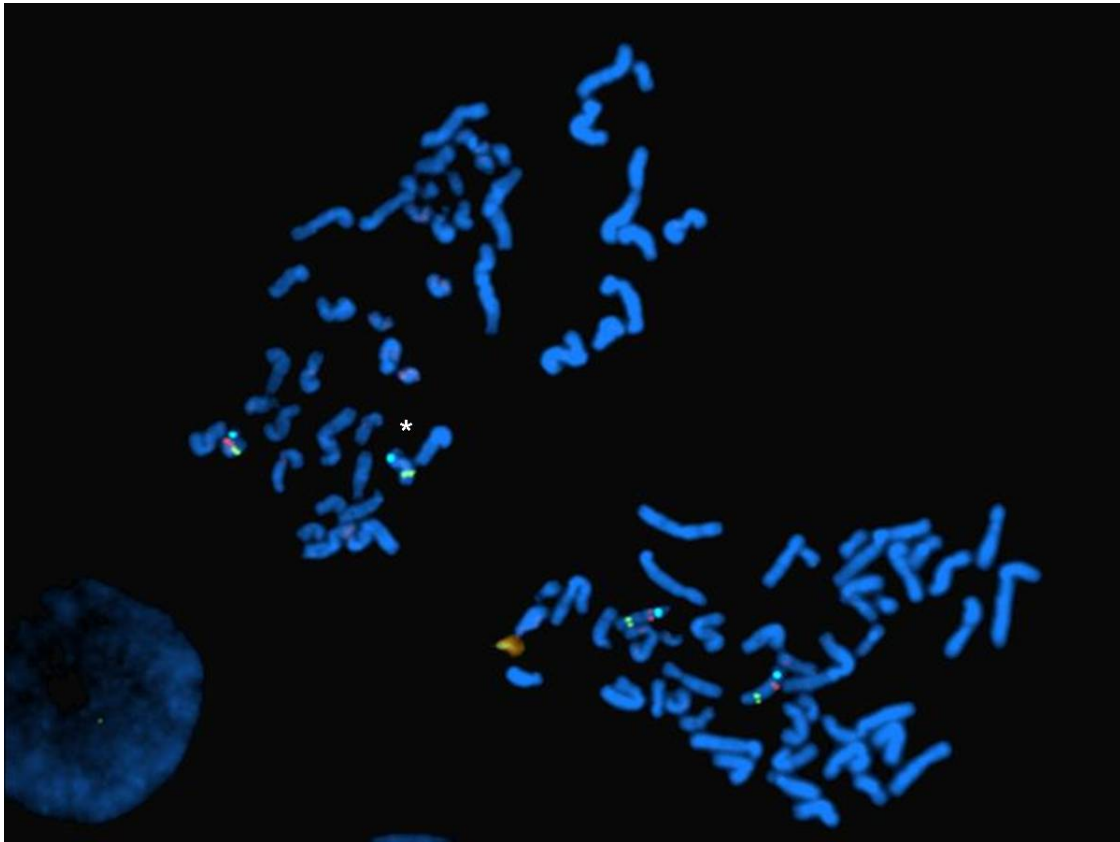


Figura R-7: Análisis mediante FISH con las sondas D15Z1/SNRPN/PML del cultivo de fibroblastos de la zona hipopigmentada materna. El asterisco en la metafase superior indica el cromosoma deleciónado. La metafase inferior presenta una dotación normal.

La madre presentaba un mosaicismo somático y germinal para una deleción de 15q11-q13, heredado de su padre, y que justifica el síndrome de Angelman observado en sus hijos gemelos.

8. Síndrome de Miller-Dieker, del 17p13(OMIM#247200).

El síndrome de Miller-Dieker es debido a la deleción de genes contiguos de la región 17p13, incluyendo el gen LIS1. El síndrome de Miller-Dieker se caracteriza por anomalía del desarrollo cerebral (lisencefalia). Los pacientes con este síndrome presentan una disminución de los pliegues y surcos del córtex cerebral. Esta anomalía cerebral causa déficit intelectual severo, retraso del desarrollo, epilepsia, espasticidad, hipotonía y dificultades de succión. La esperanza de vida de estos pacientes es corta y rara vez superan la infancia.

Dos pacientes fueron estudiados por signos clínicos compatibles con el síndrome de Miller-Dieker. Los dos pacientes presentaban anomalías cerebrales compatibles con lisencefalia según recogía la RMN.

Síndrome de Miller-Dieker (del 17p13)	
No alteración identificada	2
Microdelección	0
Total	2

9. Síndrome de Potocki-Lupski, dup 17p11.2(OMIM#610883).

El síndrome de Potocki-Lupski se debe a la duplicación de la región delecionada en el síndrome de Smith-Magenis. Las características clínicas incluyen hipotonía infantil, fallo de medro, retraso mental, trastorno autista, apnea del sueño y anomalías cardiovasculares estructurales.

Un total de 10 pacientes presentaban hipotonía, retraso del crecimiento, retraso mental, trastornos generalizados del desarrollo y anomalías congénitas compatible con un síndrome de duplicación 17p11.2.

Hemos identificado un paciente con una microduplicación 17p11.2 que se corresponde con la región delecionada en el síndrome de Smith-Magenis.

El análisis mediante FISH del paciente con dup17p11.2 confirmó la presencia de tres señales de la sonda SMS en células en interfase. El estudio en metafase identificó solo dos señales, indicando que la duplicación era en tándem. El análisis familiar del paciente con microduplicación 17p11.2 mediante FISH en células en interfase/metafase fue normal. Se consideró que la anomalía era *de novo*.

Síndrome de Potocki-Lupski (dup17p11.2)	
No alteración identificada	9
Microdelección	1
Total	10

10. Síndrome microdelección NF1, del 17q11.2(OMIM#162200).

La deleción 17q11 es una rara forma severa de neurofibromatosis tipo 1. Se caracteriza por leves dismorfia faciales, retraso del desarrollo e intelectual y

presencia de neurofibromas. Tan solo el 5% de los pacientes presentan delección del gen NF1.

Hemos analizado dos pacientes con signos clínicos compatibles con microdelección NF1. Ambos presentaban retraso mental, dismorfia facial y retraso del desarrollo.

Síndrome de microdelección NF1 (del 17q11.2)	
No alteración identificada	2
Microdelección	0
Total	2

11. Síndrome de DiGeorge, del22q11(OMIM#188400).

El síndrome de delección 22q11 se caracteriza por cardiopatía congénita (74%), malformaciones conotruncuales (tetralogía de Fallot, interrupción del arco aórtico, defectos del septo ventricular y truncus arterioso), anomalías palatinas (69%), anomalías faciales, dificultades del lenguaje, deficiencia inmunitaria, hipocalcemia, fallo de medro, anomalías renales, sordera, epilepsia, enfermedad autoinmune, anomalías del sistema nervioso central, anomalías oftalmológicas o anomalías esqueléticas.

Se han analizado 159 pacientes para la microdelección 22q11. La indicación fundamental para estos estudios fue cardiopatía congénita, tetralogía de Fallot, hipocalcemia.

Delección 22q11	
No alteración identificada	141
Microdelección 22q11	15
Otras patologías identificadas en este grupo	
Síndrome de Prader-Willi	1
Síndrome midrodelección 1p36	1
Síndrome dup17p11.2	1
Total	159

El análisis familiar de los 15 pacientes con microdelección 22q11 mediante FISH en interfase/metafase fue normal. No se identificó ningún reordenamiento o progenitor con la misma anomalía. Se consideró que todos los pacientes presentaron la anomalía *de novo*.

12. Síndrome duplicación Xq28, dupXq28 (OMIM#300815).

Un paciente varón con encefalopatía neonatal, síndrome de Lubs, y enfermedad de Hirschsprung presentó una duplicación de Xq28 que involucraba los genes *MECP2* y *L1CAM*. El paciente presentaba hipotonía y fallo de medro durante el periodo neonatal. Presentó obstrucción severa, con abdomen distendido y la biopsia intestinal confirmó la enfermedad de Hirschsprung con aganglionosis que se extendía hasta el sigmoide. Otros signos clínicos incluían rasgos dismórficos, ausencia de habla, no deambulación, se mantiene sentado. Como se muestra en la figura, un primo presentaba los mismos signos clínicos, siendo exitus al año de vida.

El estudio familiar de la madre, hermana, tres tías maternas y dos primas maternas, reveló la misma duplicación en la madre, dos de las tías y una de las primas.

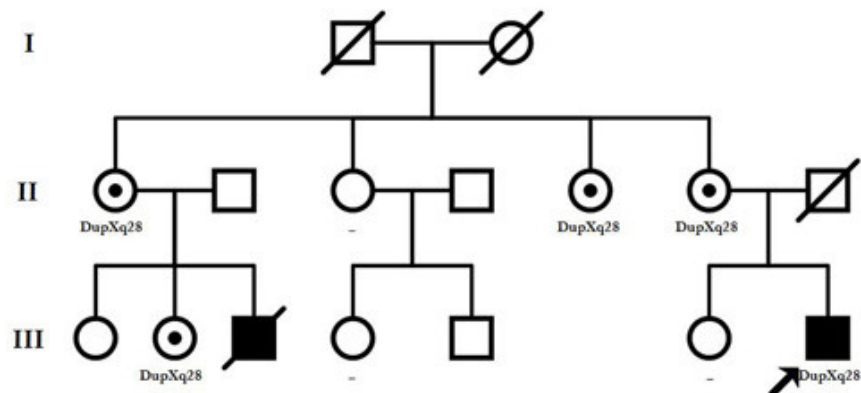


Figura R-9: Árbol genealógico de la familia.

13. Síndrome microdelecionales

Este apartado recoge todos los pacientes que no presentaban un fenotipo claro compatible con alguno de los síndromes característicos.

Reúne un total de 663 pacientes de los que hubo 55 (8,29%) pacientes con algún tipo de anomalía identificada mediante MLPA y confirmada mediante cariotipo/FISH.

Relación de síndromes y número de pacientes identificados.

Síndrome	Tipo de anomalía	Localización	Número pacientes
Delección 1p36	Delección	1p36	5
Delección 3q29	Delección	3q29	3
Duplicación 3q29	Duplicación	3q29	1
Wolf-Hirschhorn	Delección	4p16	4
Duplicación 4p16	Duplicación	4p16	1
Delección 5q35	Delección	5q35	1
Duplicación 5q35	Duplicación	5q35	3
Williams	Delección	7q11.3	2
Duplicación 7q11.3	Duplicación	7q11.3	1
DiGeorge Tipo II	Delección	10p15.1	2
WAGR	Delección	11p13	1
Prader-Willi	Delección	15q11-q13	1
Angelman	Delección	15q11-q13	2
Duplicación 15q11-q13	Duplicación	15q11-q13	1
Duplicación 15q24	Duplicación	15q24	1
Smith-Magenis	Delección	17p11.2	3
Potocki-Lupski	Duplicación	17p11.2	4
Duplicación 17p13.3	Duplicación	17p13.3	1
Neurofibromatosis tipo I	Delección	17q11.2	1
Koolen-De Vries	Delección	17q21	3
Delección 22q11	Delección	22q11	9
Duplicación 22q11	Duplicación	22q11	2
Phelan-McDermid	Delección	22q13	2
Duplicación 22q13	Duplicación	22q13	1

13.1. Delección 1p36

Cuatro de los cinco pacientes detectados presentaban la delección típica 1p36.

Un paciente presentaba una delección parcial 1p36. El análisis mediante hibridación in situ fluorescente reveló una disminución de la intensidad de la señal correspondiente a la sonda proximal CDC2L2/FLJ3062 con respecto al cromosoma homólogo. Esta observación es compatible con una delección parcial de la región analizada:

46,XY.ish del(1)(p36.1p36.3)(CDC2L2/FLJ3062 dim).

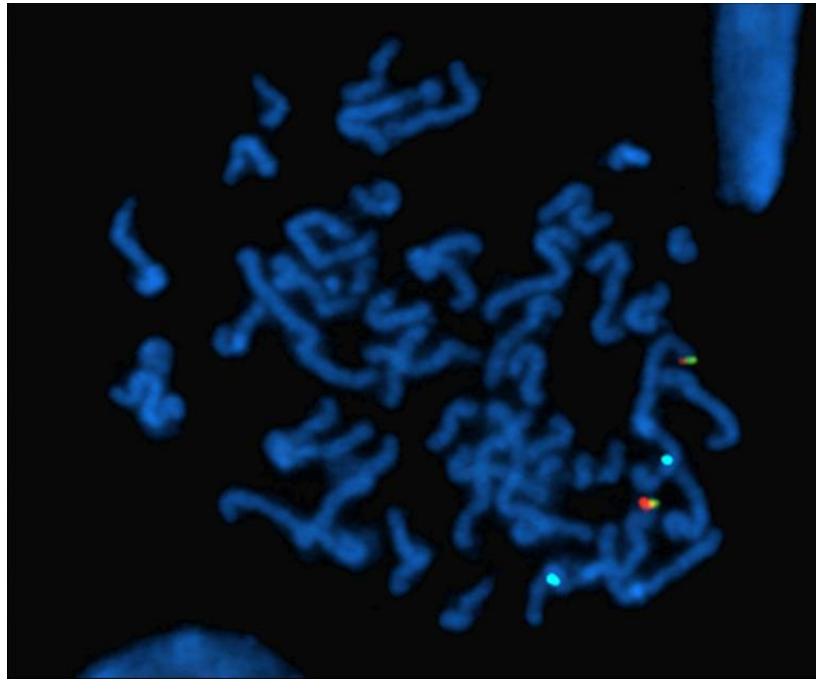


Figura R-10: Hibridación in situ fluorescente en metafase con las sondas 1p36: AGRN (1pTEL), CDK11B/CDK11A/RH65426 (1p36). Se observa que en uno de los cromosomas homólogos la sonda SpectrumRed correspondiente a los loci *CDK11B/CDK11A/RH65426* presenta una clara disminución de la intensidad de la señal.

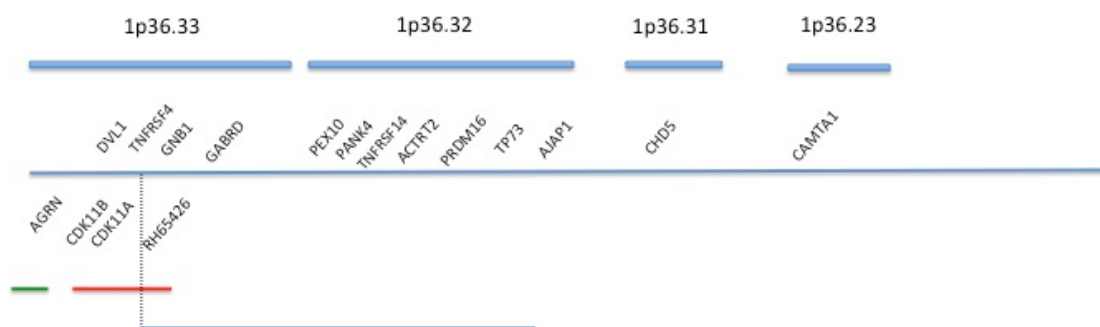


Figura R-11: Mapa deleción parcial 1p36. Mediante MLPA/FISH se pudo identificar el punto de corte, distal a *GNB1* y proximal a *CDK11A* en la región telomérica y proximal a *AJAP1* en la región centromérica. La sonda FISH centromérica, presenta una reducción de la intensidad de la señal dado que la deleción afecta exclusivamente al locus *RH65426*, mientras que los otros dos loci *CDK11B* y *CDK11A* están presentes.

El análisis mediante MLPA, con las SALSA P245 y P373, puso de manifiesto la presencia del locus *TNFRSF4*, lo que implica que el punto de corte se sitúa proximal al citado locus. Según la posición de los diferentes loci el punto de corte se situaría entre 1,149,548 y 1,716,725 (Genome Browser Feb. 2009(GRCH37/hg19)) en la zona telomérica y en la posición 4,843,851 en la región centromérica en consecuencia la deleción se situaría entre 3,694,304 pares de bases y 3,127,127 pares de bases.

13.2. Deleción 3q29

Todos los pacientes identificados mostraron una deleción 3q29 típica. Comprobamos por FISH tanto a los pacientes como a sus progenitores, no detectándose reordenamientos y por tanto eran casos *de novo*.

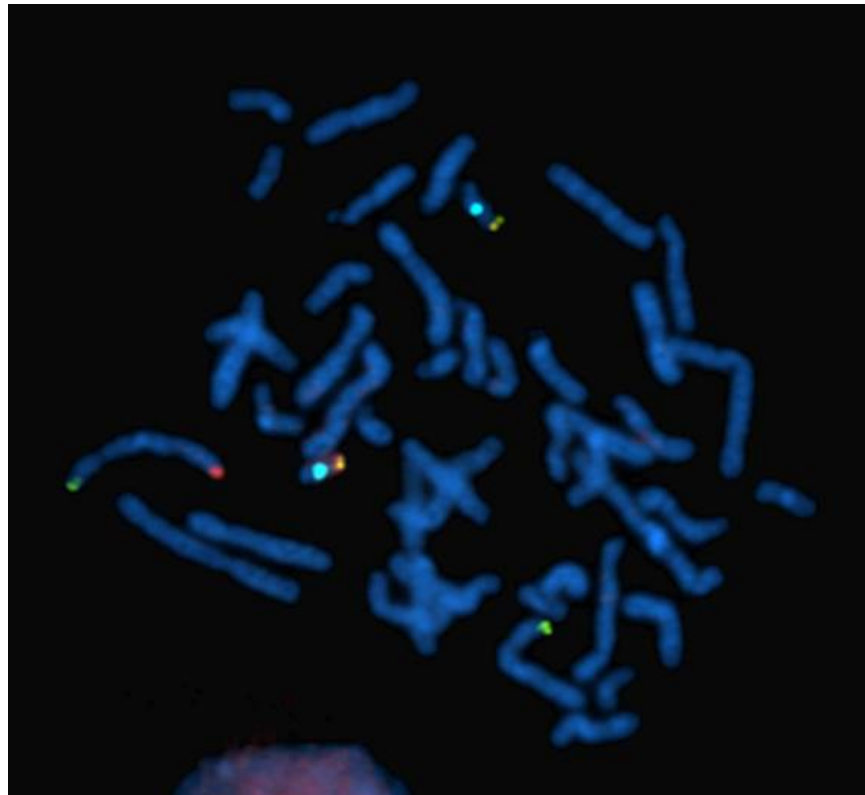


Figura R-12: Metafase analizada con el MIX3 TotalVysion, con deleción de la sonda 3qter en uno de los cromosomas del par 3.

SpectrumGreen:3pter / SpectrumRed:3qter

SpectrumGreen/SpectrumRed: 22q / SpectrumAqua: LSI BCR22

13.3. Delección / Duplicación 4p16

La identificación de un paciente con delección 4p16 (síndrome de Wolf-Hirschhorn) nos ha permitido identificar la segregación de una translocación cromosómica familiar responsable de la anomalía.

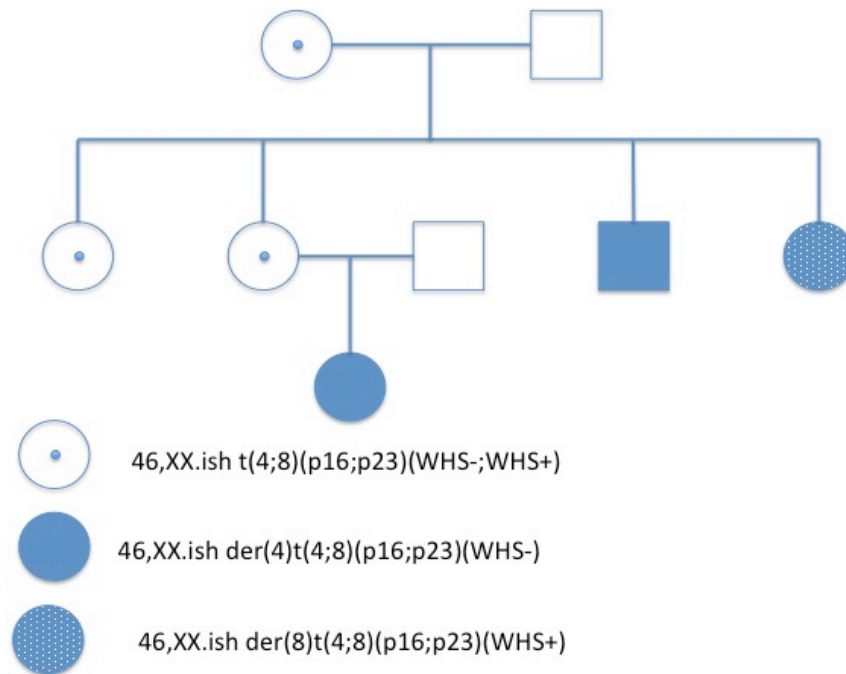


Figura R-13: Segregación de la translocación en la familia.

El paciente index III-1 presentaba un fenotipo típico de Wolf-Hirschhorn. El estudio mediante MLPA demostró la delección de la región crítica del síndrome de Wolf-Hirschhorn (WHSCR) localizada en 4p16. El estudio del paciente mediante FISH con la sonda específica confirmó la delección. El cariotipo/FISH en ambos padres reveló la presencia de una translocación entre un cromosoma 4 y un cromosoma 8 en la madre (II-2). En consecuencia, el paciente index presentaba una delección 4p16 y una trisomía 8pter. El estudio del resto de los familiares nos ha permitido identificar una tía (II-1) y la abuela (I-1) igualmente portadoras de la translocación. La extensión al resto de familiares puso de manifiesto un tío (II-3) con un cuadro característico de Wolf-Hirschhorn que presentó la translocación en desequilibrio. La tía (II-4) presentaba un cuadro dismórfico, con retraso mental, trastornos de conducta como consecuencia de una trisomía de la región crítica WHS y una monosomía 8pter.

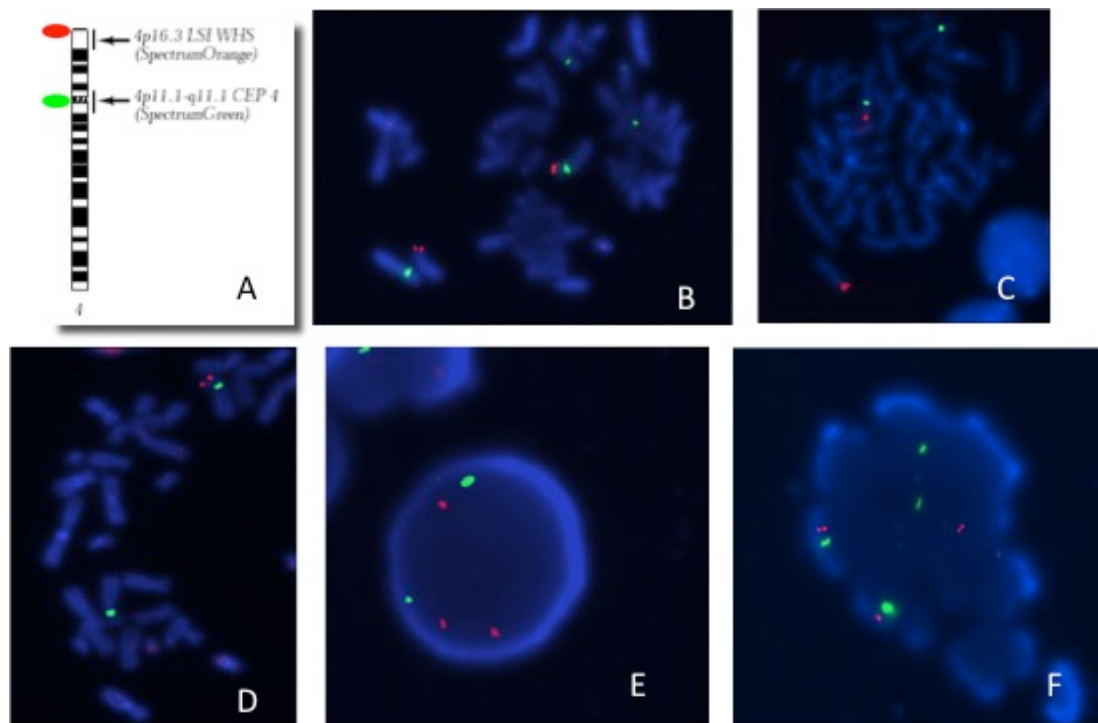


Figura R-14: Análisis familiar mediante FISH con la sonda WHS localizada en la región crítica responsable del síndrome de Wolf-Hirschhorn. A- Esquema de la localización de las sondas utilizadas. B-C Metafases correspondiente a II-2 portadora de una translocación equilibrada. D- Metafase de III-1 con la translocación en desequilibrio, delección 4p16. E-F Núcleos interfásicos con la translocación en desequilibrio y trisomía de la región WHS.

En esta situación los riesgos de futuros embarazos para II-1 y II-2 vienen determinados por el tipo de segregación de la translocación. Únicamente una segregación alterna dará lugar a gametos equilibrados. Sin embargo, la segregación adyacente-1 dará lugar a monosomía y trisomía de las regiones involucradas. Es poco probable que una segregación adyacente-2 o 3:1 lleguen a ser evolutivas dado los desequilibrios a los que daría lugar.

Otro paciente presentaba una monosomía 4p16 y una duplicación 22q13. El análisis familiar mediante cariotipo/FISH con las sondas específicas reveló la presencia de una translocación recíproca equilibrada en la madre. El paciente diagnosticado en los primeros días de vida presentó un crecimiento intraútero muy severo, con rasgos dismórficos y facies característica de yelmo griego. Es probable

que el fenotipo, aun cuando presente ciertas características de la dup22q13, sea debido a la del4p16.

13.4. Síndrome de DiGeorge tipo 2, del10p15.1 (OMIM%601362)

Hemos identificado un paciente con rasgos dismórficos, leve retraso mental y cardiopatía, portador de una deleción de la región 10p15.1.

El estudio, mediante cariotipo/FISH con la sonda subteloamérica 10p, con la sonda específica del síndrome de DiGeorge tipo 2 del paciente con deleción 10p15.1 identificado mediante MLPA reveló que se trataba de una deleción intersticial 10p. El estudio familiar mediante cariotip/FISH reveló en la madre una inserción de la región 10p15.1 en el brazo largo de un cromosoma del par 16.

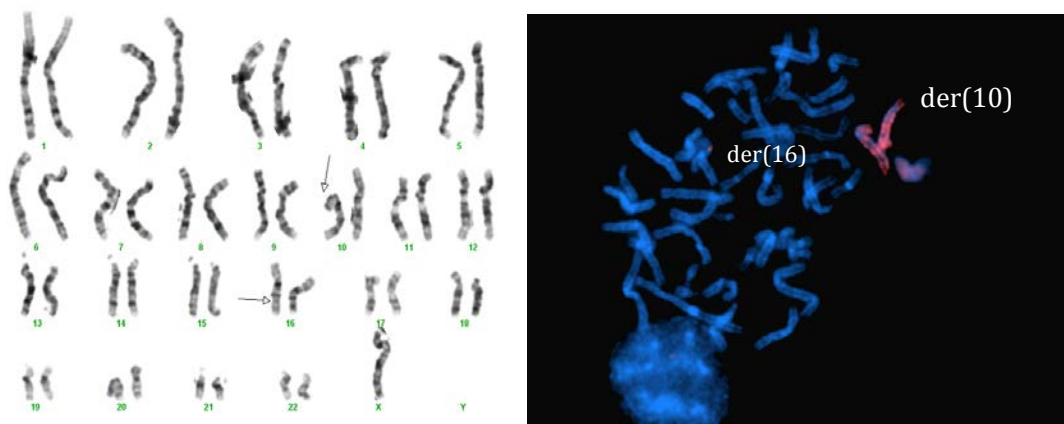


Figura R-15: Cariotipo de la madre (46,XX,ins(16;10)(q22;p13p15.2).ish ins(16;10)(16qTEL013+,wcp10+;10pTEL006+)) con una inserción en el cromosoma 16 de la región 10p15.1. Las flechas indican los cromosomas involucrados. A la derecha metafase con WCP(10) mostrando una zona de hibridación en 16q.

La ampliación del estudio al resto de familiares, puso de manifiesto que un hermano (II-4) de la madre (II-1) presentaba un cuadro clínico similar al paciente index (III-1) y que compartía el mismo fenotipo, como consecuencia de heredar el reordenamiento en desequilibrio y por tanto presentar la deleción 10p15.1. Un tío (II-3) y la abuela (I-2) del paciente index presentaban el reordenamiento equilibrado.

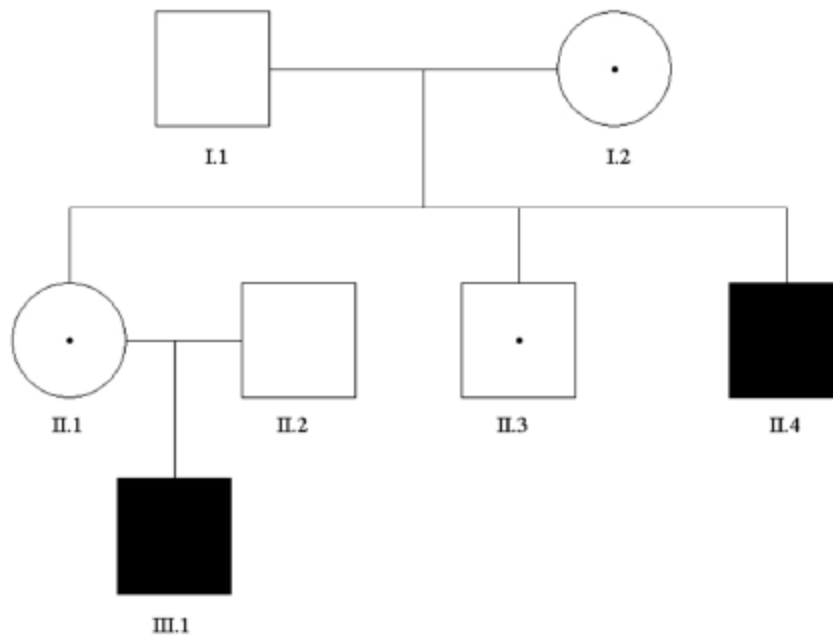


Figura R-16: Arbol genealógico de la familia con $ins(16;10)$. Mediante el estudio del paciente index (III-1) y posterior análisis familiar, permitió identificar a su tío (II-4) con el mismo reordenamiento en desequilibrio, y su madre (II-1), tío (II-3) y abuela (I-2) con la $ins(16;10)$ equilibrada.

13.5. Delección 15q11-q13

El estudio MLPA identificó tres pacientes con delección. El estudio mediante STRs del cromosoma 15 demostró la presencia exclusivamente de la región 15q11 materna en dos pacientes, síndrome de Prader-Willi, y de la región 15q11 paterna en un único paciente, síndrome de Angelman.

En un paciente con síndrome de Angelman por delección, el análisis citogenético reveló la presencia de un cromosoma X extra, síndrome de Klinefelter, y de la delección en 15q11-q13: $47,XXY.ish\ del(15)(q11.2q11.2)(SNRPN-)$. El análisis de los microsatélites del cromosoma 15 ha confirmado la delección de la región crítica del SPW / AS en el cromosoma 15 materno. El estudio de microsatélites localizados en el cromosoma X demostró que el cromosoma X extra era de origen paterno. Por tanto, la no disyunción X-Y y la delección 15q11-q13 eran eventos independientes.



Figura R-17: Metafase, cariotipo y FISH del paciente.

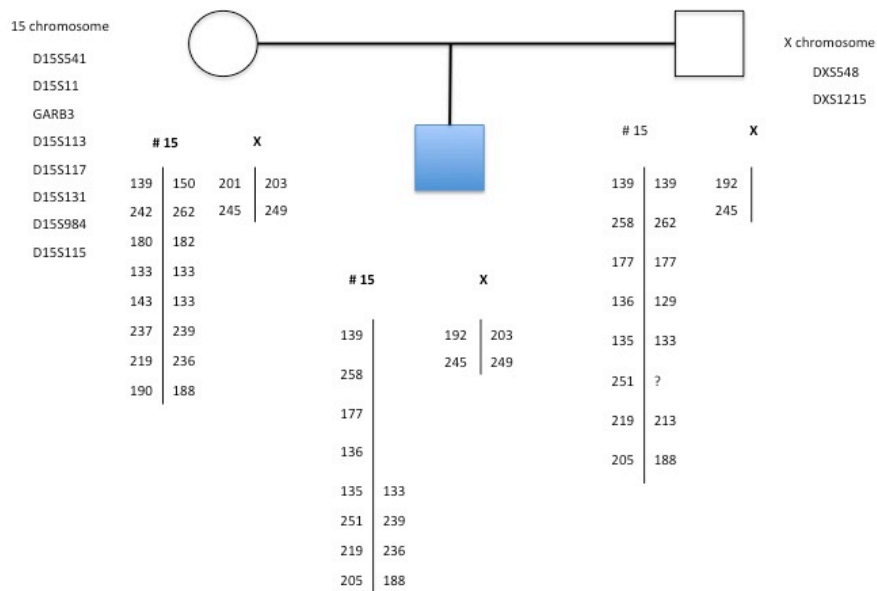


Figura R-18: Análisis mediante microsatélites del cromosoma 15 y del cromosoma X.

13.6. Síndrome de Potocki-Lupski (dup17p11.2).

De los cuatro pacientes con duplicación de la región del síndrome de Smith-Magenis (17q11.2), uno presentaba una duplicación parcial no característica.

El paciente presentaba una duplicación del locus *LLGL1* localizado en la región crítica del síndrome de Smith-Magenis. Los análisis tanto con la SALSA P245 y como con la SALSA P369, que incluyen 21 sondas de la región crítica del síndrome de Smith-Magenis / Potocki-Lupski y que incluye entre otros los loci *COPS3*, *RAI1*, *MIR33B*, *TOM1L2*, *LRRC48*, *LLGL1*, *PRPSAP2* y *MF4AP4*, han revelado que exclusivamente el locus, *LLGL1*, se encuentra duplicado. Este gen codifica una proteína que es similar a un supresor de tumor en *Drosophila*. Esta proteína es parte del citoesqueleto y está asociada con la cadena pesada miosina II y con una quinasa que fosforila específicamente esta proteína en los residuos de serina.

El análisis citogenético en el paciente, padres y una hermana fue normal. El estudio, mediante FISH, con la sonda del síndrome de Smith-Magenis es compatible con una dotación y localización normal en todos los individuos estudiados. Estos resultados indicarían una duplicación en tándem del locus duplicado. La técnica FISH, por tanto, no es apropiada para estudios prenatales de esta familia.

Los otros tres pacientes pertenecen a la misma familia como consecuencia de un padre afecto con dos hijas afectas al heredar el cromosoma con la duplicación. Aun cuando todos los pacientes presentan el mismo cromosoma 17 con la duplicación, hemos observado variabilidad clínica entre los diferentes miembros. El padre y una de la niñas (I-1 y II-1) presentaban pequeños rasgos dismórficos y un leve retraso mental Sin embargo II-2 presentaba claros signos dismórficos, profundo retraso mental y trastorno de espectro autista.

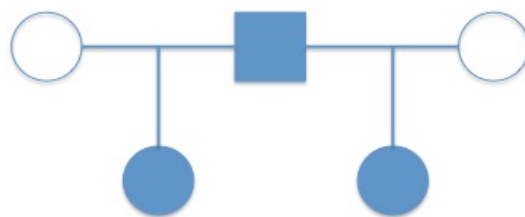


Figura R-19: Árbol genealógico de la familia con síndrome de Potocki-Lupski.



Figura R-20: Mapa de los loci analizados mediante MLPA con la salsa P369 y la sonda utilizada en el estudio mediante FISH. En rojo, *RAI1*, el locus involucrado en el síndrome de Smith-Magenis. En naranja, *LLGL1*, el locus duplicado en el paciente.

La figura A-5 del anexo 1 recoge el plot del análisis mediante MLPA con la SALSA P369 que analiza específicamente la región del síndrome de Smith Magenis, confirmando la duplicación observada con la SALSA P245.

13.7. Duplicación 22q11.2

La identificación en un paciente, con escasos rasgos dismórficos, hiperactividad y discreto retraso mental, de una duplicación 22q11.2 nos permitió diagnosticar igualmente a su madre con la misma duplicación. La madre no presentaba rasgos dismórficos, pero si un ligero trastorno del comportamiento. Un segundo hijo era normal.

El riesgo de recurrencia es del 50%. Sin embargo, dada la variabilidad clínica no es posible predecir un fenotipo claro. El gen *TBX1* se considera el responsable fundamental del genotipo, tanto en la delección como en la duplicación de 22q11.2.



Figura R-21: Representación de la región involucrada en el síndrome de microdelección/microduplicación 22q11. En rojo la cobertura de la región duplicada.

14. Diagnóstico prenatal en sangre fetal y líquido amniótico.

Hemos analizado 24 casos prenatalmente. De estos, 15 casos corresponden a sangre fetal obtenida a las 20-22 semanas de gestación y 9 casos mediante líquido amniótico obtenido a las 15-16 semanas de gestación.

En todos los casos se realizó estudio citogenético y análisis FISH/MLPA. El estudio se realizó por hallazgos compatibles con una posible anomalía cromosómica o síndrome de microdeleción/microduplicación.

14.1. Análisis del síndrome de Miller-Dieker (liscencefalia).

Hemos analizado tres casos de fetos diagnosticados ecográficamente de malformación cerebral compatible con liscencefalia.

En dos el resultado fue normal.

En uno se identificó una anomalía consistente en un reordenamiento cromosómico en desequilibrio entre un cromosoma 17 y un cromosoma 21. El estudio mediante MLPA con la SALSA P245 era compatible con un microdeleción de la región crítica del síndrome de Miller-Dieker. El análisis mediante FISH permitió situar el punto de corte proximal a *LIS1* y distal a *LSI SMS*, dando lugar a una monosomía de 17p11.2pter.

El análisis citogenético/FISH en ambos padres fue normal, considerándose el reordenamiento *de novo*.

Ref.	Indicación	Resultado
C035-10	Malformación cerebral	46,XY.ish 17p13.3(LIS1x2)
C056-10	Malformación cerebral	46,XY.ish 17p13.3(LIS1x2)
C126-13	Liscencefalia	45,XY,-21,der(17;21)(p11.2;q11.2). ish der (17;21)(LSI SMS+,LIS1-;LSI 21+)

14.2. Análisis del síndrome de DiGeorge (deleción 22q11.1).

Dentro de los estudios prenatales, se viene realizando ecografías morfológicas para identificar posibles cardiopatías fetales. En aquellos embarazos que se detectó una malformación cardiaca fetal que sugiriese una posible anomalía cromosómica o un síndrome de deleción 22q11 se ofreció una prueba invasiva.

Ref.	Tipo de Muestra	Indicación	Resultado
BT46-07	SF	Cardiopatía	46,XX.ish 22q11.2(TUPLE1,ARSA)x2
C027-09	SF	Tetralogía de Fallot	46,XX.ish 22q11.2(TUPLE1,ARSA)x2
C054-10	SF	Cardiopatía	46,XX.ish 22q11.2(TUPLE1,ARSA)x2
C066-11	SF	Cardiopatía	46,XY.ish 22q11.2(TUPLE1,ARSA)x2
C075-11	SF	Cardiopatía	46,XX.ish 22q11.2(TUPLE1,ARSA)x2
C083-11	SF	Tetralogía de Fallot	nuc ish(DXZ1,D18Z1)x2, (RB1,D21S259,D21S341,D21S342)x2 nuc ish del(22)(q11.2q11.2)(TUPLE1-)
C092-12	SF	Cardiopatía	47,XX,+21.ish 22q11.2(TUPLE1,ARSA)x2
C096-12	SF	Cardiopatía Malformación pulmonar	46,XY.ish 22q11.2(TUPLE1,ARSA)x2
C099-12	SF	Dextrocardia	46,XX.ish 22q11.2(TUPLE1,ARSA)x2
C112-13	SF	Cardiopatía	46,XY.ish 22q11.2(TUPLE1,ARSA)x2
C113-12	SF	Cardiopatía	46,XY,t(2;9)(p22;p13).ish t(2;9)(p22;p13)(CDKN2A+wcp9+;ALK+, N-MYC+,wcp2+),del(22)(q11.2q11.2)(TUPLE1-)
C128-13	SF	Cardiopatía	47,XX,+21.ish 22q11.2(TUPLE1,ARSA)x2
LA2849-05	LA	Cardiopatía	46,XX.ish 22q11.2(TUPLE1,ARSA)x2
LA3948-09	LA	Cardiopatía	46,XX.ish 22q11.2(TUPLE1,ARSA)x2
LA4369-10	LA	Cardiopatía	46,XX.ish 22q11.2(TUPLE1,ARSA)x2
LA4075-10	LA	Cardiopatía	46,XY.ish 22q11.2(TUPLE1,ARSA)x2
LA4285-10	LA	Cardiopatía	46,XY.ish 22q11.2(TUPLE1,ARSA)x2
LA4533-11	LA	Cardiopatía	46,XY.ish 22q11.2(TUPLE1,ARSA)x2
LA4585-11	LA	Cardiopatía	46,XY.ish 22q11.2(TUPLE1,ARSA)x2
LA4287-10	LA	Cardiopatía	47,XY,+21.ish 22q11.2(TUPLE1,ARSA)x2
LA4224-10	LA	Tetralogía de Fallot	46,XX.ish 22q11.2(TUPLE1-)

SF – Sangre Fetal; LA – Líquido Amniótico

Hemos identificado tres fetos con delección del locus *TUPLE1* responsable del síndrome de delección 22q11.

En el caso C083-11 no obtuvimos crecimiento de la muestra para obtención del cariotipo fetal, por contaminación de la muestra de sangre fetal con líquido amniótico. Sin embargo, la posibilidad de realizar el estudio FISH en células no cultivadas así como el estudio MLPA nos permitió identificar la anomalía.

El caso C113-12 presentaba adicionalmente a la delección 22q11 una translocación recíproca equilibrada *de novo*.

14.3. Otros estudios prenatales.

Ofrecimos un diagnóstico prenatal invasivo en aquellas familias con un hijo anterior con algún tipo de microdelección/microduplicación. Se realizó estudio

citogenético y del síndrome específico diagnosticado previamente mediante FISH y/o MLPA.

Relación de síndromes y número de casos analizados.

Síndrome	Número de casos
Angelman	3
Delección 1p36	1

En todos los casos se diagnosticó una dotación normal.

15. Relación del número de pacientes diagnosticados en los diferentes síndromes identificados en el presente estudio.

El gráfico representa el número de pacientes y las anomalías identificadas.

Las dos anomalías más frecuentes han sido la delección 22q11 con 24 casos identificados, que representa el 2,40% del total, pero el 23,53% del total de anomalías diagnosticadas, seguido del síndrome de Williams con el 0,7%, que constituye 6,86% del total de patologías.

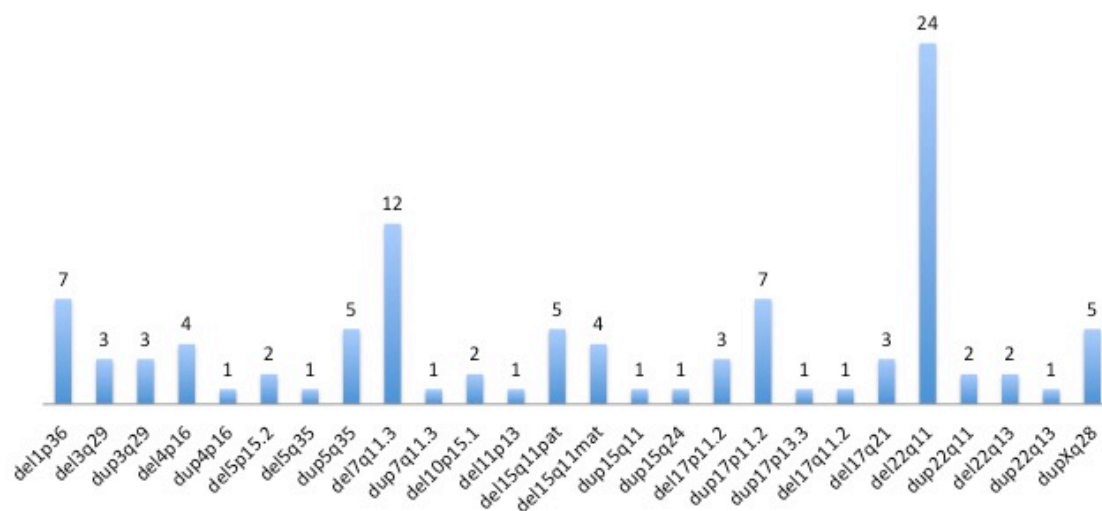


Figura R-22: Gráfico con el número de pacientes identificados en cada una de las patologías.

16. Número de pacientes con algún tipo de anomalía.

Del total de 1001 pacientes analizados, hemos encontrado anomalía (microdelección/microduplicación) en 102 pacientes, que representa el 10,19% del total de la muestra estudiada.

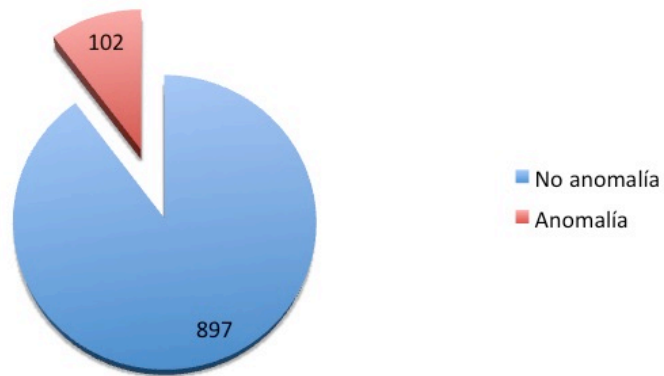


Figura R-23: Gráfico representando el número de pacientes con anomalías identificadas en el presente estudio.

DISCUSIÓN

1. Variabilidad clínica en los síndromes de microdelección/microduplicación.

Dada la alta variabilidad clínica, realizar un test genético dirigido en base exclusivamente a las características clínicas del paciente puede resultar difícil y en la mayoría de los casos no es posible. La disponibilidad de técnicas, como la MLPA, que permite realizar un cribado de los principales síndromes de microdelección / microduplicación aumenta las posibilidades de conseguir un diagnóstico en aquellos pacientes, tanto con un cuadro clínico característico como en pacientes con unas particularidades clínicas poco claras.

Mediante el método utilizado en este estudio, hemos podido diagnosticar algo más del 10% de los pacientes estudiados, que con los estudios citogenéticos de rutina no hubiésemos identificado la causa del fenotipo.

Este estudio ha puesto de manifiesto que el fenotipo asociado a los síndromes de microdelecciones es posiblemente más severo que sus homólogos síndromes de microduplicaciones. Así los síndromes de microdelecciones detectados suponen el 72,55% de los casos diagnosticados, mientras que los síndromes de microduplicaciones suponen el 27,45%. Igualmente cabe la posibilidad que el fenotipo de los síndromes microdelecciones estén mejor estudiados y por tanto sean más fácilmente reconocidos por los diferentes especialistas. Incluso los síndromes de microduplicaciones pueden asociarse a fenotipos en los límites de los parámetros considerados como normalidad y por tanto no se identifiquen como una posible causa genética.

Aún cuando no hemos recogido la edad al diagnóstico, sí observamos que los pacientes con dos anomalías son diagnosticados en edades más tempranas. Un claro ejemplo es el niño con síndrome de Klinefelter y síndrome de Angelman (J. Sánchez y cols., 2014). El síndrome de Klinefelter (47,XXY), en la mayoría de los casos no se diagnostica hasta la edad adulta, dado que se asocia a azoospermia. El síndrome de Angelman, suele diagnosticarse a partir de los dos años de vida, donde se producen alteraciones características del EEG. La presencia de dos anomalías puede que se traduzca en un fenotipo más severo y por tanto sea posible su identificación, aún cuando no presente un fenotipo claro de ninguna de las dos anomalías.

En la familia en la que identificamos la duplicación 3q29, encontramos un paciente con síndrome de Down. La duplicación 3q29 en este paciente no fue posible identificarla hasta que realizamos un estudio familiar. Este paciente, no obstante presentaba un fenotipo severo con características clínicas que no se asocian al síndrome de Down, con lo que resulta razonable suponer la presencia de alguna alteración adicional a la trisomía 21.

Así estos casos son un claro ejemplo que en aquellos pacientes con un diagnóstico y un fenotipo no coincidente, no hay que descartar la posibilidad de una segunda anomalía. Consideramos que la presencia de dos anomalías diferentes es probable que den lugar a un fenotipo severo con predominio de aquellas características clínicas típicas de la anomalía asociada a un cuadro clínico más severo.

En los casos que detectamos una anomalía ampliamos el estudio a los progenitores. Esto nos ha permitido identificar a familias con riesgo de transmitir una anomalía genética y por tanto realizar un consejo genético y ofrecer un diagnóstico de la enfermedad en futuros embarazos. Igualmente, los estudios familiares han revelado que no se han observado progenitores con síndromes de microdeleciones, pero si hemos identificado familias donde uno de los progenitores era portador de la misma microduplicación observada en su hijo.

En la familia con duplicación parcial 3q29 con dos hijos afectados, identificamos la misma duplicación en el padre (Figura R-1). Sin embargo, las características clínicas del paciente index (II-3) son claramente diferentes, con marcada dismorfia y moderado retraso mental, frente a los otros dos miembros de la familia. Es posible que la duplicación parcial presente una penetrancia incompleta, exista variabilidad clínica entre diferentes pacientes o que el paciente index presente anomalías adicionales no detectadas por las técnicas utilizadas. Dado que la madre (II-2) presenta un discreto retraso mental y ciertos rasgos dismórficos es necesario estudios adicionales que descarten la presencia de otra anomalía genética responsable de la diferencia clínica observada en la familia. En estas circunstancias el riesgo de recurrencia de duplicación parcial 3q29 es del 50%.

Hemos identificado una familia con tres miembros con síndrome de SOTOS. En este caso la madre presentaba una duplicación en tándem de la región 5q35.

Hemos observado variabilidad clínica entre los diferentes miembros de la familia. Mientras que la madre y su hijo (paciente index) presentaban leves rasgos dismórficos y leve déficit de aprendizaje, la hija presentaba un fenotipo más severo, con microcefalia, talla baja y retraso mental, no sospechándose una anomalía genética. El riesgo de recurrencia para los portadores de la duplicación es del 50%.

Actualmente hay una tendencia a utilizar técnicas genéticas de muy alta resolución que permiten escrutar el genoma completo, como los arrays CGH, en el diagnóstico de pacientes con retraso mental y múltiples anomalías congénitas. Sin embargo, diferentes razones impiden aplicar estas técnicas en todos los casos: (i) no disponibilidad de estas técnicas en todos los laboratorios (ii) mayor coste (iii) necesidad de contar con personal especializado en la interpretación de los resultados (iv) ciertos resultados no son el motivo de estudio (en ciertos aCGH se incluyen no solo los síndromes de microdelección, sino también susceptibilidad ciertas enfermedades algunas de aparición tardía) a o de interpretación dudosa (v) resultados de dudosa validez clínica o no descritos previamente no pudiéndose correlacionarse con el fenotipo con seguridad (vi) no detecta mosaicismos de bajo nivel y (vii) limitación de la cantidad de muestra disponible. Es esperable que en un futuro estas técnicas estén accesibles en la mayoría de los laboratorios.

En este trabajo hemos realizado estudios mediante técnicas altamente contrastadas: cariotipo / FISH / MLPA que permiten un diagnóstico rápido, fiable y a menor coste. El estudio se realiza tras descartar aquellas anomalías más frecuentes, como las trisomías 13, 18 y 21, así como las aneuploidias de los cromosomas sexuales y el síndrome de fragilidad del cromosoma X.

Los estudios aquí realizados mediante MLPA presentan una serie de ventajas, (i) permiten estudiar simultáneamente los síndromes de microdelecciones/microduplicaciones más frecuentes (ii) no es muy limitante de la cantidad de ADN, pues solo se requiere de 100 ng de ADN (iii) actualmente disponemos de diferentes kits-SALSA tanto para el cribado de diversos síndromes como para detectar posibles deleciones atípicas (iv) es posible confirmar el diagnóstico mediante otras técnicas, como la FISH (v) es rápido, seguro, fiable y de menor coste que otras técnicas (vi) permite diseñar sondas específicas para una

región cromosómica concreta (vii) existe una buena relación fenotipo-genotipo de los síndromes incluidos.

Sin embargo, como todas las técnicas también tiene sus limitaciones: (i) se analizan un máximo de 50 regiones simultáneamente (ii) no detecta reordenamientos equilibrados (iii) no detecta mutaciones puntuales o fuera de las sondas utilizadas (iv) ciertos polimorfismos en las regiones de ligación puede dar lugar a fallos diagnósticos.

En 663 pacientes, que representan el 66,23 %, fueron enviados para estudio genérico de síndrome de microdeleciones al no presentar un cuadro clínico característico. El estudio, tanto prenatal como postnatal, más solicitado de forma específica fue la microdelección 22q11, posiblemente porque se asocia a una característica clínica, cardiopatía, fácilmente identificable. El hecho de que se solicite un estudio concreto y el paciente sea diagnosticado de otro síndrome podría indicar: la variabilidad clínica de este grupo de pacientes, o que ciertas características clínicas propias de un síndrome concreto no están presentes en el paciente.

2. Mosaicismo germinal/somático como causa de síndrome de Angelman.

Los diferentes síndromes de microdelección /microduplicación pueden estar causados por diferentes mecanismos genéticos. Determinar la causa genética responsable de la anomalía puede ser esencial para determinar los riesgos de recurrencia y por tanto poder realizar un consejo genético / reproductivo seguro y fiable. Diferentes anomalías genéticas pueden causar el síndrome de Angelman (AS): el 70% de los pacientes presentan una delección de la región 15q11-q13 en el cromosoma de origen materno, el 3% presentan disomía uniparental paterna, confirmando en esta región la presencia de genes con impronta, el 2-5% presentan mutaciones en el centro de la impronta, y el 10% son debidos a mutaciones en el gen *UBE3A*. Un porcentaje variable (<10%) de pacientes son diagnosticados clínicamente no pudiéndose identificar la causa genética de la enfermedad. Los riesgos de recurrencia pueden ser tan bajos como <1% en los casos de delección hasta el 50% en los defectos de impronta debido a delección del centro de la

impronta o mutaciones en *UBE3A* si la madre es portadora de la misma mutación. En ciertas ocasiones, la madre de pacientes AS son portadoras de reordenamientos que dan lugar a segregaciones en desequilibrio, y como resultado se originan deleciones de la región responsable de AS. En estos casos el riesgo de recurrencia puede ser alto (Stalker y cols., 1998; Campubrí y cols., 2010).

La mayoría de las deleciones de la región 15q11-q13 se clasifican a nivel molecular en clase I y clase II de acuerdo con el punto de rotura próximas (BP1 y BP2 respectivamente) con un punto distal común (BP3). Se han descrito puntos distales adicionales (BP4, BP5 y BP6) en unos pocos pacientes. La deleción clase I está presente en el 40% de los pacientes, el punto de rotura proximal (BP1) se localiza centromérico al marcador *D15S541*, mientras que la deleción clase II es responsable en el 50% de los casos.

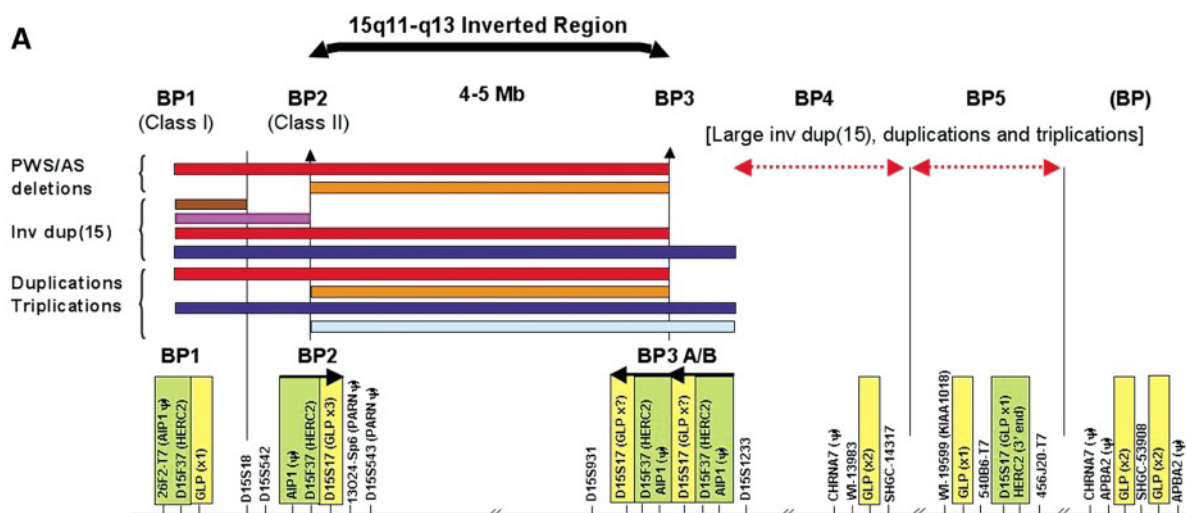


Figura D-1: Mapa del cromosoma 15. Los puntos de corte teloméricos BP1 y BP2 permiten distinguir entre dos tipos de deleciones en el síndrome de Angelman. (Figura 1A modificada de Gimelli et al., 2003)

Una proporción de madres con hijos con AS con deleción BP2/3 son portadoras de una inversión polimórfica de un gran segmento duplicado que se encuentra altamente conservado localizado en los puntos de rotura. Estas inversiones se han propuesto como un estado intermedio que favorecería las

deleciones BP2/3 y que podría explicar los puntos de roturas comunes en pacientes con AS. Estas mismas inversiones no se han identificado en madres de pacientes con deleciones BP1/3, posiblemente debido a la complejidad de la región (Gimelli y cols., 2003).

En nuestro estudio hemos identificado unos gemelos dizigóticos con síndrome de Angelman, debido a la deleción 15q11-q13 (J. Sánchez y cols., 2014). El estudio con marcadores del cromosoma 15 nos ha permitido identificar que la deleción afecta al marcador *D15S541* por tanto es una deleción clase I (BP1/3). Esta deleción incluye el dominio completo con impronta y varios genes no afectados por la impronta, extendiéndose unos 6 Mb.

El mosaicismo germinal se ha propuesto como posible mecanismo para explicar la recurrencia de varias enfermedades genéticas (Zlotogora., 1998; Gajęcka y cols., 2010; Tosca y cols., 2010; Pillozzi-Edmonds y cols., 2011; Shanske y cols., 2012; Steinbusch y cols., 2012; Slavin y cols., 2012). En el AS solo dos familias con deleción podrían justificar la presencia de un mosaicismo germinal materno. En 1998 Williams y cols. describieron una familia con un paciente con AS por deleción y su madre con una expresión parcial. Sin embargo, aunque la hija presentaba la típica deleción 15q, en la madre no se identificó en linfocitos, no estudiándose otros tejidos. Posteriormente Kokkonen y cols. identificaron una familia con dos miembros afectos de AS con la misma deleción, sugiriéndose la posibilidad de mosaicismo germinal. Igualmente el estudio de los padres fue normal en sangre periférica no estudiándose otros tejidos. En ambos casos el mosaicismo germinal podría explicar la recurrencia, sin embargo dada la frecuencia de AS en la población es igualmente posible que sea simplemente un evento al azar (Connerton-Moyer y cols., 1997). El mosaicismo germinal puede originarse por dos mecanismos diferentes: (i) la mutación se produce en la célula germinal que continúa dividiéndose, (ii) la mutación tiene lugar en una células somática previa a la separación y por tanto la mutación está presente en mosaico (Zlotogora., 1998). Dado que las células germinales derivan de más de una célula germinal ancestral (Soriano y cols., 1986), el riesgo de recurrencia dependerá de la proporción de células germinales presentes con la mutación, que puede suponer hasta el 50%. Sin embargo, los portadores de mutaciones tanto en células germinales como en somáticas pueden ser asintomáticos o presentar unos pocos

signos fenotípicos. Parece claro que identificar la presencia de un mosaicismo germinal en un progenitor es crucial para determinar el riesgo en futuros embarazos. La dificultad para acceder a las células germinales maternas, los ovocitos, sugiere que sospechar un mosaicismo germinal materno en ausencia de células somáticas con la mutación o sin clínica, solo es posible si tiene más de un hijo afecto. Aunque en estos casos eventos al azar recurrentes podrían ser posibles aunque poco probables.

Una de las características clínicas algunos pacientes AS con deleciones clase I es la hipopigmentación de la piel y ojos, debido a la haploinsuficiencia del gen *OCA2* (Williams., 2010) y desregulación de la expresión de *MC1R* (Low y cols., 2011), próximos a *UBE3A*. La madre de los gemelos con AS no presentaba clínica de AS, pero sí presentaba dos zonas hipopigmentadas en la cara interna de ambos antebrazos. El estudio mediante cariotipo/FISH de la sangre materna y de la zona de piel normocoloreada fue normal. Sin embargo, las zonas hipopigmentadas presentaban un mosaicismo con una línea normal y otra con la misma microdelección presente en sus hijos. Este hallazgo implica que la mutación que da lugar al mosaicismo germinal se originó durante la embriogénesis antes de la separación en los diferentes tejidos, lo que explicaría la presencia en células somáticas. El AS se origina por la deleción de la región crítica en el cromosoma 15 materno. Si la deleción tiene lugar en el 15 paterno da lugar a un síndrome diferente, el síndrome de Prader-willi. El gen responsable del AS es *UBE3A*. Mientras que en células no neuronales el gen *UBE3A* se expresa en ambos cromosomas 15, en tejido neuronal y debido a un proceso de impronta, solo la copia materna es expresada (Chamberlain y cols., 2010). En neuronas de pacientes con AS, no hay expresión de *UBE3A*, lo que causa una alteración en la sinapsis de las neuronas afectadas, por modificación de proteoma, especialmente por acumulación de la proteína sináptica específica Arc (Greer y cols. 2010). La ausencia de síntomas clínicos en la madre, otros de las zonas hipopigmentadas en la piel, únicamente puede significar que solo unas pocas células presentan la deleción y que se restringe a un área de piel específica y que no está presente en otros tejidos o áreas. Posiblemente las células con la deleción no están presentes en el cerebro. Pero si las hubiera, estas no se localizarían en las áreas sensibles ya que de otra forma producirían síntomas neurológicos.

Esta familia es el primer caso demostrado de mosaicismo germinal en AS, y que aunque es un evento poco frecuente, es factible y por tanto ha de considerarse como factor que puede influir en el riesgo de recurrencia. Nuestro hallazgo implica la necesidad de ofrecer un diagnóstico prenatal, aún cuando no se haya detectado ningún reordenamiento en sangre periférica en los progenitores, debido a la posibilidad de mosaicismo germinal.

3. Reordenamientos cromosómicos como causa de síndromes de microdelección/microduplicación.

3.1. Segregación familiar de una translocación entre un cromosoma 4 y un cromosoma 8 como causa de síndrome de Wolf-Hirschhorn.

El síndrome de Wolf-Hirschhorn puede presentar, en ciertos pacientes, inconsistencias genotipo-fenotipo, que en un principio se justificó por una variabilidad fenotípica del síndrome. La $t(4;8)(p16;p23)$ se ha descrito tanto en su versión equilibrada como en su versión en desequilibrio. Esta translocación, que es difícil identificarla en los estudios citogenéticos de rutina, es la segunda translocación recíproca más frecuente tras la $t(11;22)$. Los portadores de la translocación en desequilibrio $der(4)t(4;8)$ presentan el síndrome de Wolf-Hirschhorn, mientras que los portadores de $der(8)t(4;8)$ presentan unas características un fenotipo mucho menos severo.

Diversos estudios han demostrado que los heterocigotos para una inversión submicroscópica pueden predisponer a reordenamientos cromosómicos y estas inversiones son relativamente frecuentes (Giglio y cols., 2001). Aun cuando en un principio estas inversiones se consideraron polimórficas, se han identificado reordenamientos recurrentes en 8p como consecuencia de una inversión polimórfica – mediada por dos *clusters* del gen del receptor olfatorio (OR) – presente en uno de los progenitores con un hijo con una enfermedad cromosómica relacionada. Dado que el *cluster* del gen OR está presente tanto en 4p16 como en 8p23.1, los dobles heterocigotos para la inversión polimórfica que está presente en cromosomas no homólogos pueden tener una predisposición a reordenamientos intercromosómicos. Este hecho explicaría la alta frecuencia de la

t(4;8) por detrás de la t(11;22) que constituye la translocación más frecuente en el hombre.

La presencia de la t(4;8) justificaría la frecuencia y variabilidad clínica de pacientes con síndrome de Wolf-Hirschhorn (WHS) debido a la translocación en desequilibrio. En nuestro estudio hemos identificado una t(4;8) familiar. El estudio familiar de la segregación de la translocación nos ha permitido diagnosticar tres miembros con la translocación en desequilibrio. Dos de ellos con der(4)t(4;8) presentaban un fenotipo similar, con un cuadro clínico severo, y similar al WHS. El otro miembro de la familia presentaba un fenotipo leve, portador de der(8)t(4;8). En esta familia se observa que los portadores de der(4)t(4;8) presentan un cuadro severo de WHS, debido posiblemente a un doble desequilibrio cromosómico, la delección 4p y la trisomía 8p. Sin embargo, el portador del reordenamiento en desequilibrio der(8)t(4;8), con trisomía parcial 4p y monosomía 8p, presenta un cuadro menos severo. Parece claro que la monosomía 4p da lugar a un fenotipo severo modificado por la trisomía 8p. Sin embargo, la monosomía 8p junto con la trisomía 4p da lugar a un fenotipo leve. Igualmente hemos identificado un total de tres mujeres portadoras de la translocación en equilibrio, que nos ha permitido realizar un consejo genético seguro y fiable.

3.2. Segregación familiar de una translocación entre un cromosoma 4 y un cromosoma 22 como causa de síndrome de Wolf-Hirschhorn.

Recientemente identificamos un niño con horas de vida, con un retraso de crecimiento intrauterino <P3 y rasgos dismórficos compatibles con WHS. El estudio mediante MLPA era compatible con una delección 4p y una trisomía 22q. El cariotipo/FISH confirmó que un segmento del cromosoma 22 se localizaba en 4p. El estudio familiar reveló que la madre era portadora de una t(4;22) y por tanto su hijo presentaba la translocación en desequilibrio der(4)t(4;22). El fenotipo severo del probandus se debe a la combinación de delección 4p (WHS) y trisomía 22q (síndrome de Phelan-McDermid). Durante el embarazo se observaron hallazgos ecográficos compatibles con una anomalía cromosómica, sin embargo la pareja rechazó una prueba invasiva. El diagnóstico tan temprano, a las pocas horas de nacer, fue posible a los últimos avances en ecografía, los seguimientos del embarazo, y los cuidados neonatales y la alta especialización pediátrica,

igualmente por la disponibilidad de técnicas genéticas de mayor resolución. Un diagnóstico rápido y seguro es importante para el pronóstico, tratamiento y evolución de este tipo de pacientes. Igualmente permite realizar un estudio familiar y detectar posibles reordenamientos familiares y por tanto identificar otros familiares con reordenamientos tanto equilibrados como en desequilibrio y que dada la variabilidad clínica presentar un fenotipo leve que no se valoró como una posible alteración genética.

Mientras que en WHS la mayoría de los reordenamientos son de *novo* y el riesgo de recurrencia es bajo, hay casos de reordenamientos familiares en los que el riesgo de recurrencia es alto. Por tanto, estas familias son susceptibles de en futuros embarazos un diagnóstico prenatal específico para detectar cualquier tipo de segregación. En los últimos años es posible la realización de un diagnóstico genético preimplantatorio. Sin embargo, hay que considerar que a nivel embrionario es posible cualquier tipo de segregación: alterna, adyacente-1, adyacente-2 o incluso 3:1, que aunque la mayoría de ellas no serían viables y no llegarían a desarrollar un embrión en fase de implantación sí sería posible detectarlos en un diagnóstico genético preimplantatorio. Por otra parte es importante informar a las familias que todos los embriones puedan estar en desequilibrio y no sea posible una transferencia.

3.3. Segregación familiar de una inserción intersticial del brazo corto de un cromosoma 10 en el brazo largo de un cromosoma 16 como causa de un síndrome de DiGeorge tipo 2 familiar.

La monosomía parcial 10p (OMIM#1362, ORPHA1580) es un síndrome de genes contiguos con al menos dos regiones críticas, involucrando dos síndromes diferentes. Dependiendo de la delección se han definido dos síndromes específicos. La haploinsuficiencia de la región distal 10p14 es responsable del síndrome HDR (*Hypoparathyroidism, sensorineural Deafness, and Renal Disease*; Hipoparatiroidismo, sordera neurosensorial y enfermedad renal OMIM#146255), también conocido como síndrome de Barakat (Barakat y cols., 1977), siendo el gen responsable la subunidad A de la glutamil-amidotransferasa (*GATA3*) (OMIM*131320). Este gen se localiza a 8,1 Mb del telómero del brazo corto del

cromosoma 10, perteneciente a la familia de factores de transcripción *zinc finger* involucrado en el desarrollo embrionario de la paratiroides, sistema auditivo y riñón. Por otra parte, la haploinsuficiencia de la región centromérica 10p13p14 se asocia a defectos cardíacos congénitos y aplasia/hipoplasia del timo (síndrome DiGeorge tipo 2, DGS2, OMIM#601362), con una región crítica que se ha situado entre los marcadores *D10S547* (a 10,6 Mb de 10pter) y *D10S585* (a 11,3 Mb de 10pter). Actualmente se desconoce con exactitud el gen responsable de esta patología.

Lindstrand y cols., 2010 propusieron que las deleciones parciales 10p14p15 representan un síndrome con un fenotipo característico, identificando una región de 1,6 Mb en 10p15.1 asociada a retraso mental y del lenguaje, así como una segunda región de 4,3 Mb en 10p14 asociada con rasgos dismórficos y autismo. La monosomía 10p es extraordinariamente rara (<1/1000000) con apenas unos 50 casos descritos, la mayoría de ellos debido a reordenamientos *de novo* en el paciente.

Durante nuestro estudio hemos identificado a dos pacientes de diferentes generaciones con una deleción intersticial 10p debido a una inserción intersticial de la región 10 en el brazo largo de un cromosoma 16 (ins(16;10)(q22;p13p15.2))(Fernandez RM y cols., 2015). Mediante MLPA con las SALSA P245 y P372 identificamos en uno de los pacientes con retraso mental y cariotipo normal (realizado en laboratorio externo) una deleción 10p que correspondía con el síndrome de DiGeorge tipo 2. El estudio familiar reveló la presencia de un tío del paciente con la misma deleción y mediante cariotipo/FISH la presencia de un reordenamiento cromosómico en la abuela, madre y otro tío no afecto del paciente. La identificación de reordenamientos familiares es importante ante los riesgos de recurrencia en futuros descendientes de este tipo de reordenamientos equilibrados. Esta familia constituye el primer caso descrito de monosomía parcial 10p debido a una segregación en desequilibrio de una inserción equilibrada familiar en dos generaciones.

Nuestro paciente presentaba una deleción que incluía tanto la región crítica HDR como DGCR2, aunque no presentaba las características clínicas de ambos síndromes. Diferentes hipótesis tratan de explicar esta situación: el “modelo de un único gen”, donde un gen es responsable de la mayoría de las características

clínicas, tal y como se estableció con el gen *GATA3* en el contexto del síndrome HDR.; los “modelos cis-epistasis” donde uno o varios genes son necesarios y suficientes para causar el fenotipo, pero que las interacciones epistásicas modulan la expresión y penetrancia de los fenotipos. Este último modelo parece más acorde con la variabilidad clínica observada en nuestros pacientes.

La identificación de esta alteración nos permitirá realizar un seguimiento exhaustivo de los pacientes, permitiendo identificar hipoparatiroidismo en ambos pacientes o posibles ataques epilépticos en el niño.

Esta familia es un claro ejemplo de la importancia de combinar diferentes técnicas tales como cariotipo, FISH o MLPA que permiten delimitar las regiones involucradas, consiguiéndose una mejor correlación genotipo-fenotipo y realizar un consejo genético en la familia.

4. Diagnóstico prenatal de síndromes de microdelección/microduplicación.

Las técnicas genéticas han transformado el diagnóstico prenatal porque permiten realizar un diagnóstico seguro a partir de pequeñas cantidades de material fetal, incluso a partir de una única célula en el diagnóstico preimplantatorio. La utilización de la FISH o de otras técnicas moleculares como la PCR cuantitativa fluorescente (QF-PCR) permite un diagnóstico rápido, a partir de células de líquido amniótico no cultivadas o de vellosidades coriales, en apenas 24 h, de las principales aneuploidias (13, 21, 18, X e Y).

Recientemente se están desarrollando técnicas no invasivas, y con el fin de evitar los riesgos asociados a la amniocentesis o biopsia de vellosidades coriales. Es posible detectar ADN fetal libre en sangre materna proveniente de células de vellosidades coriales. Sin embargo, en la actualidad no es posible separar la fracción de ADN materno de la fracción de ADN fetal, y por tanto el estudio presenta ciertas limitaciones (Lo JO y cols., 2014).

En Andalucía, dentro del Plan de Genética se viene desarrollando el Plan Andaluz de Cribado de Anomalías Congénitas (PACAC) donde se ofrece el cribado

de primer trimestre de cromosomopatías y el cribado de malformaciones fetales en el segundo trimestre.

Uno de los mayores avances en diagnóstico prenatal, la ecografía de 20 semanas, permite identificar fetos con malformaciones que hasta hace unos años pasaban desapercibidas. La posibilidad de realizar resonancia magnética nuclear durante el embarazo permite identificar estructuras fetales hasta ahora imposibles de estudiar.

En aquellas familias con un hijo con microdelección / microduplicación o con malformaciones ecográficas compatibles con algunos de los síndromes estudiados se les ofreció un diagnóstico prenatal tanto citogenético como del síndrome de microdelección/ microduplicación por MLPA/FISH.

Las malformaciones cardíacas constituyen las anomalías congénitas letales más frecuentes. Actualmente el estudio cardíaco fetal se ha constituido como una de las principales disciplinas en pediatría cardiológica y medicina materno-fetal. Durante las últimas décadas la evaluación detallada del corazón fetal tanto normal como patológico ha permitido identificar un gran porcentaje de malformaciones cardíacas que han resultado fundamentales para el control del embarazo, parto y durante el periodo neonatal.

4.1. Diagnóstico prenatal de la microdelección 22q11 en mujeres con antecedentes de microdelección 22q11 o en embarazos con fetos con cardiopatía.

En nuestro trabajo, hemos incorporado el estudio de rutina de la microdelección 22q11 en aquellas mujeres con antecedentes de hijo con esta alteración o con una malformación cardíaca fetal diagnosticada ecográficamente. De los 21 casos estudiados hemos detectado tres casos con microdelección 22q11.

En uno de los casos identificados no fue posible el crecimiento de la muestra para obtener el cariotipo fetal. Sin embargo, aún cuando la muestra no era óptima para los estudios citogenéticos, si pudimos realizar una extracción de ADN para la realización del estudio molecular mediante MLPA, a partir de la muestra constituida tanto por sangre fetal como por células de líquido amniótico, identificando la anomalía. Dado que la técnica de FISH no requiere de división celular pudimos confirmar la delección 22q11. Aún cuando el cariotipo puede

proporcionar información adicional, poder realizar técnicas basadas en ADN suponen una gran ventaja, en especial para aquellos casos de fallo de cultivo o de limitación de la muestra.

El cuadro clínico de la microdelección 22q11 puede ir desde un fenotipo aparentemente normal a presentar un cuadro clínico severo. Sin embargo, realizar un diagnóstico precoz es fundamental tanto para proporcionar información a la familia como para realizar una preparación médica adecuada. Dado que la mayoría de los pacientes presentan malformaciones conotruncales, anomalías palatinas, inmunodeficiencia y dificultades de aprendizaje el tratamiento neonatal de estos pacientes implica múltiples disciplinas. El diagnóstico precoz permite una preparación del parto con la presencia de cardiólogos, neonatos ... evitando posibles efectos no deseados (Noël AC y cols., 2014).

4.2. Diagnóstico prenatal en fetos con malformación cerebral

Las malformaciones cerebrales fetales se asocian a un mal pronóstico. El diagnóstico ecográfico con anomalías cerebrales permite identificar posibles anomalías cromosómicas y poder determinar posibles riesgos de recurrencia. Durante la ecografía de las 20 semanas de gestación, se identificó un feto con lisencefalia. Realizamos prueba invasiva y resonancia magnética nuclear (RMN) que confirmó los hallazgos ecográficos. El cariotipo en cultivo de linfocitos fetales permitió identificar un reordenamiento en desequilibrio entre un cromosoma 17 y un cromosoma 21. El análisis MLPA/FISH puso de manifiesto la delección de la región 17p11.2pter que incluye al gen *LIS1*, responsable de lisencefalia. Dado que el estudio familiar mediante cariotipo/FISH resultó normal, se consideró que la anomalía era *de novo*. En estos casos los riesgos de recurrencia, probabilidad de tener otro hijo con la misma anomalía, viene determinado por la el origen del reordenamiento. Mientras que si el reordenamiento es *de novo* se considera un riesgo bajo y probablemente sería <0,5% al no poderse descartar un posible mosaicismo germinal, el riesgo aumenta considerablemente sí el reordenamiento es de origen familiar y depende de los cromosomas y segmentos cromosómicos involucrados.

CONCLUSIONES

1. En el análisis mediante MLPA en los pacientes con retraso mental y/o anomalías congénitas estudiados hemos identificado 102 pacientes con microdeleciones / microduplicaciones lo que supone algo más del 10% de los pacientes estudiados y que no fueron identificados mediante técnicas de rutina.
2. Casi tres de cada cuatro pacientes con anomalía detectada en el presente estudio presentaban una microdelección, indicando que lo más probable es que el fenotipo asociado a esta anomalía sea más severo que la correspondiente microduplicación.
3. Los kits de MLPA empleados presentan una alta fiabilidad, identificando incluso a pacientes con microdeleciones / microduplicaciones atípicas difícilmente identificables con otras técnicas. Dado que existen sondas comerciales de FISH para los síndromes estudiados, es posible tanto la comprobación en el paciente como el estudio familiar.
4. Los estudios familiares han revelado la presencia de ocho familias con riesgo elevado de tener otro hijo con anomalía, proporcionando un cálculo de riesgo y la posibilidad de un diagnóstico prenatal y/o un diagnóstico genético preimplantatorio en futuras gestaciones.
5. Hemos identificado el síndrome de Angelman en un par de gemelos dicigóticos, como consecuencia de un mosaicismo somático y germinal en su madre asintomática, poniendo de manifiesto que el mosaicismo germinal es una posibilidad hasta ahora no contemplada.
6. En los casos con una anomalía genética diagnosticada y un fenotipo atípico, no hay que descartar la posibilidad de una segunda anomalía tanto del cariotipo como de otros síndromes de microdelección / microduplicación.

7. Los pacientes en los que hemos identificado dos anomalías presentaban un fenotipo más severo realizándose el diagnóstico en edades más tempranas.
8. Se ha observado una amplia variabilidad clínica, especialmente en los casos de microduplicaciones donde hemos identificado progenitores asintomáticos de pacientes con un fenotipo anómalo.
9. La posibilidad realizar un diagnóstico prenatal e identificar fetos con anomalías genéticas, permite realizar un consejo genético encaminado a informar de un pronóstico, evolución y posibles tratamientos tanto prenatales intra-utero como postnatales.

BIBLIOGRAFIA

- Barakat AY, D'Albora JB, Martin MM, Jose PA. Familial nephrosis, nerve deafness, and hypoparathyroidism. *J Pediat* 91:61-64 (1977).
- Bejjani BA, Saleki R, Ballif BC et al: Use of targeted array-based CGH for the clinical diagnosis of chromosomal imbalance: is less more? *Am J Med Genet* 134: 259–267 (2005).
- Campubrí C, Coll MD, Gabau E, Guitart M. Prader-Willi and Angelman syndromes: genetic counseling. *Eur J Hum Gen* 18:154-156 (2010).
- Caspersson T, Zech L, Johansson C, Modest EJ. Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents. *Chromosoma* 30: 215-227 (1970).
- Chamberlain SJ, Lalonde M. Angelman syndrome, a genomic imprinting disorder of the brain. *J Neurosci.* 30(30): 9958-63 (2010).
- Cheung SW, Shaw CA, YuWet al: Development and validation of a CGH microarray for clinical cytogenetic diagnosis. *Genet Med* 7: 422– 432 (2005).
- Concolino P, Mello E, Toscano V, Ameglio F, Zuppi C, Capoluongo E. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay for the detection of CYP21A2 gene deletions/duplications in congenital adrenal hyperplasia: first technical report. *Clin Chim Acta.* 2009 Apr;402(1-2):164-70.
- Connerton-Moyer NJ, Nicholls RD, Schwartz S, Driscoll DJ, Hendrickson HE, Williams CA, Pauli RM. Unexpected Familial Recurrence in Angelman Syndrome. *Am J Med Genet* 70:253-260 (1997).
- Drets ME, Shaw MW. Specific banding patterns in human chromosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68(9):2073-2077 (1971).
- Dutrillaux B, Lejeune J. Sur une nouvelle technique d'analyse du cariotype humain. *C. R. Acad. Sci. Paris* 272:2638-2640 (1971).
- Edwards JH, Harnden DG, Cameron AH y cols. A new trisomic syndorme. *Lancet* i:787-790 (1960).
- Eldering E, Spek CA, Aberson HL, Grummels A, Derks IA, de Vos AF, McElgunn CJ, Schouten JP. Expression profiling via novel multiplex assay allows rapid assessment of gene regulation in defined signalling pathways. *Nucleic Acids*

- Res. 31(23):e153 (2003).
- Faas BH, Nillesen W, Vermeer S, Weghuis DO, de Leeuw N, Smits AP, van Ravenswaaij-Arts CM. Detection of cryptic subtelomeric imbalances in fetuses with ultrasound abnormalities. *Eur J Med Genet.* 51(6):511-9 (2008).
- Fernández RM, Sánchez J, García-Díaz L, Pelaez-Nora Y, González-Meneses A, Antiñolo G, Borrego S. Interstitial 10p deletion derived from a maternal ins(16;10)(q22;p13p15.2): Report of the first familial case of 10p monosomy affecting to two familial members of different generations. *Am J Med Genet* (enviado).
- Ford, C. E., Miller, O. J., Polani, P. E., de Almeida, J. C. & Briggs, J. H. A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet* **1**, 711–713 (1959).
- Fortna A, Kim Y, MacLaren E et al: Lineage-specific gene duplication and loss in human and great ape evolution. *PLoS Biol* 2: E207 (2004).
- Gajecka M, Saitta SC, Gentles AJ, Campbell L, Ciprero K, Geiger E, Catherwood A, Rosenfeld JA, Shaikh T, Shaffer LG. Recurrent interstitial 1p36 deletions: Evidence for germline mosaicism and complex rearrangement breakpoints. *Am J Med Genet* 152A(12): 3074-3083 (2010).
- Gall JG, Pardue ML. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 63:378–383 (1969).
- Gimelli G, Pujana MA, Patricelli MG, Russo S, Giardino D, Larizza L, Cheung J, Armengol L, Schinzel A, Estivill X, Zuffardi O. Genomic inversions of human chromosome 15q11-q13 in mothers of Angelman syndrome patients with class II (BP2/3) deletions. *Hum Mol Genet.* 12(8):849-58 (2003).
- Grati FR, Chinetti S, Malgara R, Rognoni G, Grimi B, De Toffol S, Milani S, Dulcetti F, Frascoli G, Di Meco AM, Liuti R, Trotta A, Coffa J, Maggi F, Simoni G. Prenatal detection by subtelomeric FISH and MLPA of unbalanced meiotic recombinants resulting from parental pericentric inversions. *Mol Cell Probes.* 22(5-6):316-9 (2008).
- Greer PL, Hanayama R, Bloodgood BL, Mardinly AR, Lipton DM, Flavell SW, Kim TK,

- Griffith EC, Waldon Z, Maehr R, Ploegh HL, Chowdhury S, Worley PF, Steen J, Greenberg ME. The Angelman Syndrome protein Ube3A regulates synapse development by ubiquitinating arc. *Cell*. 140(5):704-16 (2010).
- Hsu LY. *Human and Mammalian Cytogenetics: A Historical Perspective*. Springer-Verlag (1979).
- Klein OD, Cotter PD, Albertson DG, Pinkel D, Tidyman WE, Moore MW, Rauen KA. Prader-Willi syndrome resulting from an unbalanced translocation: characterization by array comparative genomic hybridization. *Clin Genet*. 65(6):477-82 (2004).
- Jacobs, P. A. & Strong, J. A. A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature* **183**, 302–303 (1959).
- John HA, Birnstiel ML, Jones KW. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223:582–587 (1969).
- Kokkonen H, Leisti J. 2000. An unexpected recurrence of Angelman syndrome suggestive of maternal germ-line mosaicism of del(15)(q11q13) in a Finnish family. *Hum Genet* 107(1): 83-85 (2000).
- Langer PR, Waldrop AA, Ward DC. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:860-921 (2001).
- Lansdorp PM, Verwoerd NP, van de Rijke FM, Dragowska V, Little MT, Dirks RW, Raap AK, Tanke HJ. Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum Mol Genet* 5: 685-692 (1996).
- Lindstrand A, Malmgren H, Verri A, Benetti E, Eriksson M, Nordgren A, Anderlid BM, Golovleva I, Schoumans J, Blennow E. Molecular and clinical characterization of patients with overlapping 10p deletions. *Am J Med Genet* 152:1233-1243 (2010).
- Lejeune, J., Gautier, M. & Turpin, M. R. Etude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **248**, 1721–1722 (1959).
- Low D, Ken-Shiung Chen. UBE3A regulates MC1R expression: a link to

- hypopigmentation in Angelman syndrome. *Pigment Cell Melanoma Res* 24: 944-952 (2011).
- Lo JO, Cori D F, Norton ME, Caughey AB. Noninvasive prenatal testing. *Obstet Gynecol Surv.* 69(2):89-99 (2014).
- Lupski JR. Genomic Disorders: structural features of the genome can lead to DAN rearrangements and human disease traits. *Trends Genet* 14: 415-420 (1998).
- Manning M, Hudgins L; Professional Practice and Guidelines Committee. Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. *Genet Med.* 12(11):742-5 (2010).
- Matera AG, Baldini A, Ward DC. An oligonucleotide probe specific to the centromeric region of human chromosome 15. *Genomics* 18:729–731 (1993).
- Matsui S, Sasaki M. Differential staining of nucleolus organisers in mammalian chromosomes. *Nature.* 246(5429):148-50 (1973).
- Nicholl J, Waters W, Mulley JC, Suwalski S, Brown S, Hull Y, Barnett C, Haan E, Thompson EM, Liebelt J, Mcgregor L, Harbord MG, Entwistle J, Munt C, White D, Chitti A, Baulderstone D, Ketteridge D; Array Referral Consortium, Friend K, Bain SM, Yu S. Cognitive deficit and autism spectrum disorders: prospective diagnosis by array CGH. *Pathology.* 46(1):41-5 (2014).
- Nielsen PE Egholm M, Berg RH, Buchardt O. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* 254: 1497-1500 (1991).
- Nowell P, Hungerford D. A minute chromosome in chronic granulocytic leukemia. *Science* 132(3438): 1497 (1960).
- Noël AC, Pelluard F, Delezoide AL, Devisme L, Loeuillet L, Leroy B, Martin A, Bouvier R, Laquerriere A, Jeanne-Pasquier C, Bessieres-Grattagliano B, Mechler C, Alanio E, Leroy C, Gaillard D. Fetal phenotype associated with the 22q11 deletion. *Am J Med Genet A.* 164A(11):2724-31 (2014).
- Patau K. The identification of individual chromosomes, especially in man. *Am J Hum Genet* 12: 250-276 (1960).

- Plan Andaluz para el Cribado de Anomalías Congénitas (PACAC). Servicio Andaluz de Salud. Consejería de Salud. Junta de Andaluz. (2009).
- Plan de Genética de Andalucía. Servicio Andaluz de Salud. Consejería de Salud. Junta de Andaluz.
- Pilozzi-Edmonds L, Maher TA, Basran RK, Milunsky A, Al-Thihli K, Braverman NE, Alfares A. Fraternal twins with Aarskog-Scott syndrome due to maternal germline mosaicism. *Am J Med Genet* 155A(8): 1987-1990 (2011).
- Schmickel RD. Contiguous gene síndromes: a component of recognizable syndromes. *J Pediatr* 109: 231-241 (1986).
- Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273:494-497 (1996).
- Schwaenen C, Nessling M, Wessendorf S, Salvi T, Wrobel G, Radlwimmer B, Kestler HA, Haslinger C, Stilgenbauer S, Döhner H, Bentz M, Lichter P. Automated array-based genomic profiling in chronic lymphocytic leukemia: development of a clinical tool and discovery of recurrent genomic alterations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(4):1039-44 (2004).
- Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, Månér S, Massa H, Walker M, Chi M, Navin N, Lucito R, Healy J, Hicks J, Ye K, Reiner A, Gilliam TC, Trask B, Patterson N, Zetterberg A, Wigler M. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science*. 305(5683):525-8 (2004).
- Shaffer LG, Bejjani BA. A cytogeneticist's perspective on genomic microarrays. *Hum Reprod Update* 10(3): 206-211 (2004).
- Shaw-Smith C, Redon R, Rickman L, Rio M, Willatt L, Fiegler H, Firth H, Sanlaville D, Winter R, Colleaux L, Bobrow M, Carter NP. Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. *J Med Genet*. 41(4):241-8 (2004).
- Shanske AL, Goodrich JT, Ala-Kokko L, Baker S, Frederick B, Levy B. Germline mosaicism in Shprintzen-Goldberg syndrome. *Am J Med Genet* 158A(7):1574-

1578 (2012).

- Slavin TP, Lazebnik N, Clark DM, Vengoechea J, Cohen L, Kaur M, Konczal L, Crowe CA, Corteville JE, Nowaczyk MJ, Byrne JL, Jackson LG, Krantz ID. Germline mosaicism in Cornelia de Lange syndrome. *Am J Med Genet A*. 158A(6):1481-5 (2012).
- Soriano P, Jaenishc R. Retroviruses as probes for mammalian development: allocation of cells to the somatic and germ cell lineages. *Cell* 46:19-29 (1986).
- Steinbusch C, van Roozendaal K, Tserpelis D, Smeets E, Kranenburg-de Koning T, de Waal K, Zweier C, Rauch A, Hennekam R, Blok M, Schrandt-Stumpel C. Somatic mosaicism in a mother of two children with Pitt-Hopkins syndrome. *Clin Genet* doi: 10.1111/j.1399-0004.2012.01857.x (2012).
- Summer AT- A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 75: 304-306 (1972).
- Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 12:368–375 (1996).
- Stalker HJ, Williams CA. Genetic Counseling in Angelman Syndrome: The Challenges of Multiple Causes. *Am J Med Gen* 77:54-59 (1998).
- Taneja KL, Chavez EA, Coull J, Lansdorp PM. Multicolor fluorescence in situ hybridization with peptide nucleic acid probes for enumeration of specific chromosomes in human cells. *Genes Chromosomes Cancer* 30: 57-63 (2001).
- Tjio, H. J. & Levan, A. The chromosome numbers of man. *Hereditas* **42**, 1–6 (1956).
- Tosca L, Brisset S, Petit FM, Lecerf L, Rousseau G, Bas C, Laroudie M, Maurin ML, Tapia S, Picone O, Prevot S, Goossens M, Labrune P, Tachdjian G. 2010. Recurrent 70.8 Mb 4q22.2q32.3 duplication due to ovarian germinal mosaicism. *Eur J Hum Genet* 18(8): 882-8 (2010).
- Van Opstal D, Boter M, Noomen P, Srebniak M, Hamers G, Galjaard RJ. Multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) for rapid distinction between unique sequence positive and negative marker chromosomes in prenatal

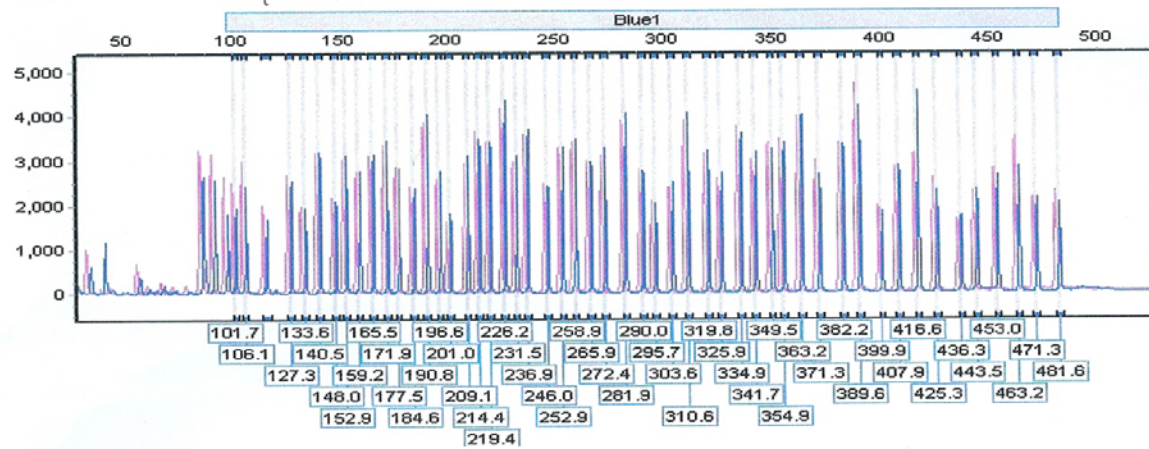
- diagnosis. *Mol Cytogenet.* 4:2 (2011).
- van Veghel-Plandsoen MM, Wouters CH, Kromosoeto JN, den Ridder-Klünne MC, Halley DJ, van den Ouweland AM. Multiplex ligation-dependent probe amplification is not suitable for detection of low-grade mosaicism. *Eur J Hum Genet.* 19(9):1009-12 (2011).
- Williams CA, Hendrickson JE, Cantú ES, Donlon TA. 1998. Angelman syndrome in a daughter with del(15)(q11q13) associated with brachycephaly, hearing loss, enlarged foramen magnum, and ataxia in the mother. *Am J Med Genet* 32: 333-338 (1998).
- Williams CA, Driscoll DJ, Dagi AI. Clinical and genetic aspects of Angelman syndrome. *Gen Med* 12(7): 385-395 (2010).
- Wilton L, Williamson R, McBain J, Edgar D, Voullaire L: Birth of a healthy infant after preimplantation confirmation of euploidy by comparative genomic hybridization. *N Engl J Med* 345: 1537– 1541 (2001).
- Zlotogora J. Germ line Mosaicism. *Hum Genet* 102: 381-386 (1998).

ANEXO

MLPA Analysis Report - SoftGenetics	
Software: GeneMarker V1.75	Analysis Type: MLPA
Project: Untitled	Compare Type: MLPA Regression T-Dist
Technician:	Normalization By: Population Normalization
Report Time: 08/20/2012 - 13:35:18	Quantification By: Peak Height
Panel: RM245-r	Classification: Confidence Limit: 99.00 (Population)
Control: M-15766_044_E12.fsa	Report Value Type: Peak Ratio

M-15724_046_C12.fsa

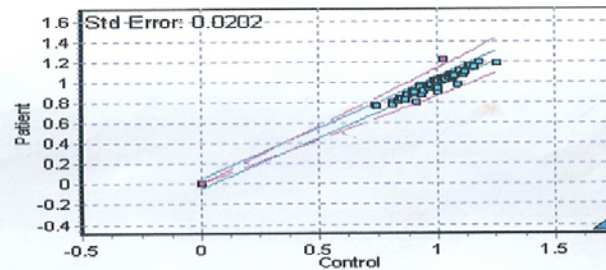
HOMBRE



Sample Name: M-15724
 Machine: ABI3730-17121-029
 Run Time: 08/20/2012 - 09:07:53 -> 08/20/2012 - 09:50:07

Statistics	# Probes	Mean	StdDev
Control/Sample	0/51	0.00/0.03	0.00/0.04

Conclusion		
	Date	Initial
Authorization 1		
Authorization 2		

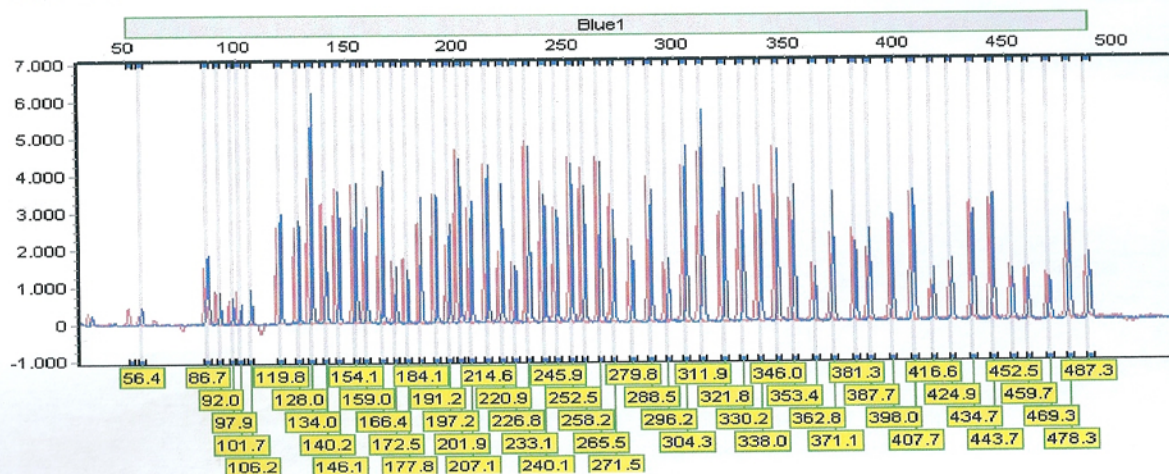


	Probe Name	Bin Size	M-15724_046_C12
1	15q24 del synd	190.5	104%
2	15q24 deletion	325.9	105%
3	17q21 mdeletion	471.2	100%
4	17q21 microd 2	341.8	106%
5	17q21 microdel	226.2	104%
6	1p36 del synd a	127.3	95%
7	1p36 del synd b	165.6	101%
8	1p36 del synd c	177.5	99%
9	2p16.1 delet sy	481.9	89%
10	2p16.1 deletion	266.2	99%
11	3q29 deletion	354.8	98%
12	3q29 deletion b	416.8	145%
13	9q22.3 deletion	408.2	101%
14	9q22.3 syndrom	319.8	102%
15	Cri du Chat	282.1	104%
16	Cri du chat b	436.6	106%
17	DGeorge 10p	133.8	98%
18	DGeorge 22q	196.6	108%
19	DGeorge 22q b	209.1	106%
20	DGeorge syndr	371.6	89%
21	DGeorge(10p) 2	349.5	96%
22	Langer-Gedionb	400.3	94%
23	Langer-Gedionc	425.3	88%
24	MECP2/Xq28dup	148.0	96%
25	MECP2/Xq28dup	184.6	97%
26	MECP2/Xq28dup	201.1	110%
27	Miller Dieker	237.0	103%
28	Miller-Dieker	140.5	100%
29	NF1 microdelet	259.0	102%
30	NF1 microdelet2	335.0	96%
31	PW/Angelman	159.1	100%
32	PW/Angelman b	214.5	94%
33	PW/Angelman c	245.9	98%
34	PW/Angelman d	290.2	99%
35	Phelan M22q13	253.0	101%
36	Phelan M22q13b	382.4	99%
37	Rubinstein Tayb	172.0	103%
38	Smith Magenis	272.4	106%
39	Smith Magenis b	303.4	105%
40	Smith-Magenis s	463.2	80%
41	Sotos syndrome	453.1	94%
42	Sotos syndrome	152.9	102%
43	Wagr syndrome	219.4	100%
44	Williams synd b	363.3	100%
45	Williams synd c	389.8	89%
46	Williams syndr	310.6	104%
47	Wolf-Hirschhorn	231.6	105%
48	Wolf-Hirschhorn	443.7	103%
49	X	101.8	77%
50	X control probe	295.7	97%
51	Y	106.1	81%
52	Y	115.8	-1

Figura A1-1: Plot MLPA. Análisis con la SALSA P245, con duplicación de una única sonda, de la región 3q29.

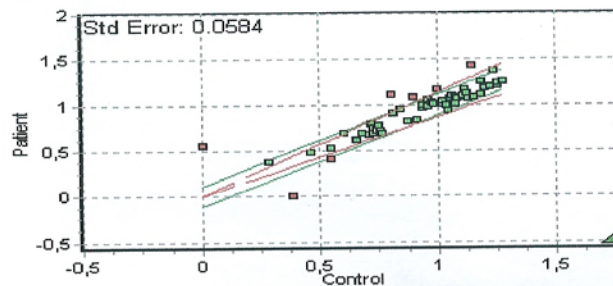
MLPA Analysis Report - SoftGenetics	
Software: GeneMarker V1.75	Analysis Type: MLPA
Project: MICROS373aNAp.SGF	Compare Type: MLPA Regression T-Dist
Technician:	Normalization By: Population Normalization
Report Time: 06/06/2013 - 13:37:02	Quantification By: Peak Height
Panel: Ana P373	Classification: Confidence Limit: 99.00 (Population)
Control: A3-373_046_C11.fsa	Report Value Type: Peak Ratio

17023_041_H11.fsa



Sample Name: 17023
Machine: ABI3730-17121-029
Run Time: 06/06/2013 - 11:58:46 -> 06/06/2013 - 12:39:53
Statistics # Probes Mean StdDev
Control/Sample 0/55 0.00/0.06 0.00/0.06

Conclusion		
	Date	Initial
Authorization 1		
Authorization 2		



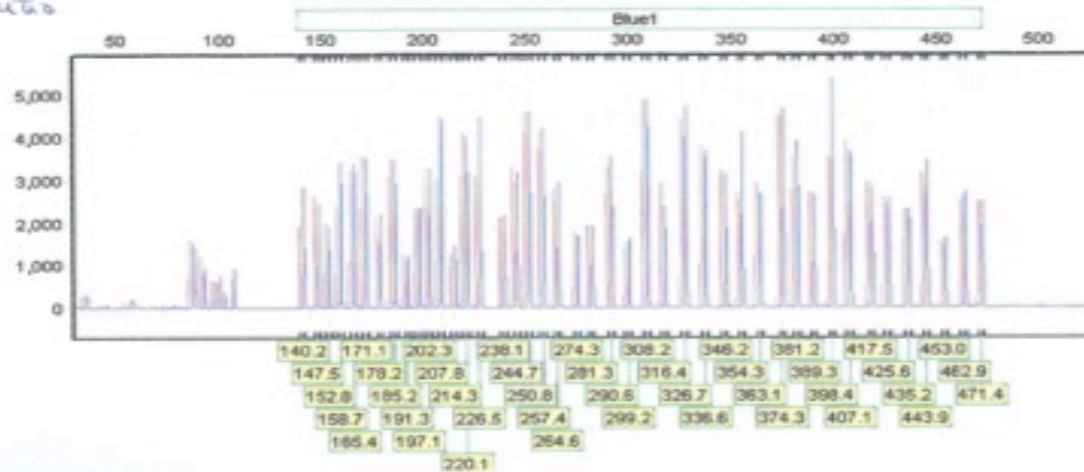
	Probe Name	Bin Size	17023_041_H11
1	102	101.5	58%
2	106	106.0	100%
3	120	119.7	114%
4	128	127.9	107%
5	134	133.9	159%
6	140	140.2	81%
7	146	146.2	98%
8	154	154.1	101%
9	159	159.0	112%
10	166	166.2	111%
11	172	172.4	91%
12	178	177.7	82%
13	184	184.1	124%
14	191	191.1	100%
15	197	197.1	128%
16	202	201.9	94%
17	207	207.1	105%
18	215	214.6	99%
19	221	220.9	197%
20	227	226.9	94%
21	233	233.2	98%
22	240	240.2	91%
23	246	246.0	98%
24	253	252.6	96%
25	258	258.2	88%
26	266	265.5	96%
27	272	271.5	87%
28	280	279.9	90%
29	289	288.5	91%
30	296	296.2	105%
31	304	304.3	113%
32	312	311.8	125%
33	322	321.6	139%
34	330	330.1	105%
35	338	337.9	99%
36	346	346.0	99%
37	354	353.5	110%
38	363	363.0	93%
39	371	371.3	145%
40	382	381.5	85%
41	388	387.9	126%
42	398	398.2	105%
43	408	407.9	103%
44	417	416.8	133%
45	425	425.1	107%
46	435	434.8	93%
47	444	443.8	104%
48	453	452.6	93%
49	460	459.8	103%
50	469	469.4	90%

Figura A1-2 Plot MLPA. Análisis con la SALSA P373 que permite analizar la región 3q29 con duplicación de cinco de las sondas, demostrando la duplicación parcial.

MLPA Analysis Report - SoftGenetics	
Software: GeneMarker V1.75	Analysis Type: MLPA
Project: Untitled	Compare Type: MLPA Regression T-Test
Technician:	Normalization By: Population Normalization
Report Time: 05/14/2013 - 12:14:23	Quantification By: Peak Height
Panel: microdeletion372	Classification: Confidence Limit: 99.00 (Population)
Control: A1-372_036_BDG.fsa	Report Value Type: Peak Ratio

11795_040_A09.fsa

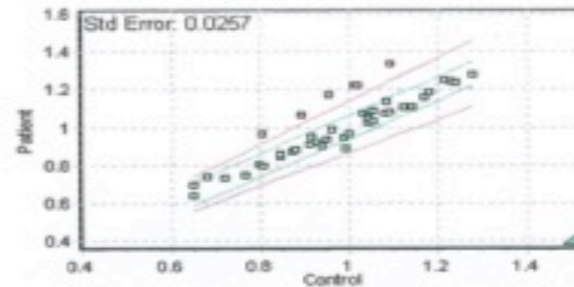
MLPA



Sample Name: 11795
Machine: AB0730-17121-029
Run Time: 05/08/2013 - 13:46:29 -> 05/08/2013 - 14:17:33

Statistics	# Probes	Mean	StdDev
Control/Sample	0/43	0.000/0.05	0.000/0.07

Conclusion		
	Date	Initial
Authorization 1		
Authorization 2		



Probe Name	Bin Size	11795_040_A09
1 ADAP2	290.9	107%
2 ATAD5	290.9	99%
3 GDC45	463.0	108%
4 CLYCL1	191.5	97%
5 COMT	245.1	98%
6 COMTb	374.3	103%
7 CREBBP	274.2	98%
8 CREBBPb	316.8	81%
9 CREBBPc	348.2	97%
10 CREBBPd	383.8	92%
11 CREBBPe	407.1	94%
12 CREBBPf	425.8	100%
13 CREBBPg	471.5	100%
14 DGCR8	147.8	93%
15 DGCR8b	381.4	111%
16 FGFR4	354.3	151%
17 GATA3	185.5	104%
18 GATA3b	214.5	118%
19 GATA3c	264.6	109%
20 GATA3d	299.2	119%
21 GNB1L	326.7	107%
22 KLHL22	281.4	101%
23 LZTR1	417.5	94%
24 NF1	197.0	101%
25 NF1b	308.1	100%
26 NF1c	336.8	98%
27 NF1d	380.3	98%
28 NF1e	444.0	106%
29 NF1f	453.1	105%
30 NSD1	140.2	148%
31 NSD1b	158.9	142%
32 NSD1c	226.7	144%
33 NSD1d	207.8	147%
34 NSD1e	366.4	150%
35 PRCP1	171.2	99%
36 RNF135	220.4	99%
37 SUZ12	185.3	99%
38 TCEB1P3	152.9	97%
39 TCEB1P3b	178.3	103%
40 TCEB1P3c	435.3	100%
41 TXNIP32	238.5	101%
42 UTR6	257.7	101%
43 ZNF74	202.6	100%

5q35

5q35

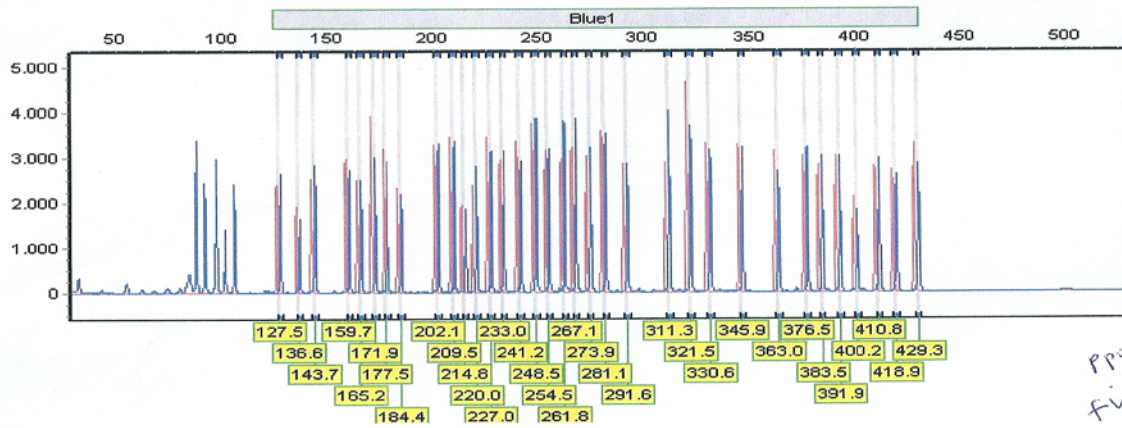
Figura A1-3 : Análisis MLPA con la SALSA P372 que contiene 9 sondas de la región del síndrome de SOTOS, demostrando la duplicación de la región

			II-2	III-1	III-2	II-1	Controles		
	Probe Name	Size	# / Mean / SE	11795_040_A09 fca	16086_039_B09 fca	16902_036_C09 fca	16903_037_D09 fca	A1-372_036_E09 fca	A3-372_036_F09 fca
1	A/DAP2	290.9	6 / 1.01 / 0.02	107%	99%	99%	100%	100%	100%
2	A/TAD6	290.9	6 / 0.96 / 0.03	99%	99%	88%	100%	100%	103%
3	CDC45	463.0	6 / 0.97 / 0.05	108%	99%	76%	101%	100%	104%
4	CLTCL1	161.5	6 / 0.99 / 0.01	97%	100%	95%	104%	100%	97%
5	COMT	245.1	6 / 0.99 / 0.02	98%	100%	109%	98%	100%	91%
6	COMTb	374.3	6 / 0.99 / 0.01	103%	99%	99%	98%	100%	97%
7	CREBBP	274.2	6 / 0.98 / 0.02	98%	105%	99%	99%	100%	91%
8	CREBBPb	318.6	6 / 0.94 / 0.04	81%	98%	109%	89%	100%	87%
9	CREBBPc	346.2	6 / 0.96 / 0.03	97%	93%	85%	98%	100%	104%
10	CREBBPd	363.6	6 / 1.01 / 0.02	92%	106%	107%	97%	100%	102%
11	CREBBPe	407.1	6 / 1.00 / 0.02	94%	108%	107%	97%	100%	103%
12	CREBBPf	425.6	6 / 1.02 / 0.01	100%	101%	102%	101%	100%	108%
13	CREBBPg	471.5	6 / 1.00 / 0.02	100%	102%	97%	96%	100%	107%
14	DGCR5	147.6	6 / 0.97 / 0.03	93%	99%	110%	93%	100%	90%
15	DGCR5b	381.4	6 / 1.08 / 0.02	111%	113%	112%	108%	100%	103%
16	FGFR4	354.3	6 / 1.30 / 0.12	151%	154%	162%	107%	100%	108%
17	GATA3	165.5	6 / 0.99 / 0.04	104%	91%	87%	104%	100%	109%
18	GATA3b	214.5	6 / 1.06 / 0.03	116%	105%	98%	114%	100%	104%
19	GATA3c	284.6	6 / 1.05 / 0.03	108%	116%	96%	108%	100%	104%
20	GATA3d	299.2	6 / 1.09 / 0.03	119%	111%	106%	113%	100%	103%
21	GNE1L	326.7	6 / 1.07 / 0.02	107%	106%	112%	108%	100%	105%
22	KLHL22	281.4	6 / 1.02 / 0.05	101%	107%	116%	108%	100%	83%
23	LZTR1	417.5	6 / 0.98 / 0.01	94%	101%	96%	100%	100%	97%
24	NF1	197.0	6 / 0.97 / 0.05	101%	81%	83%	104%	100%	110%
25	NF1b	308.1	6 / 1.00 / 0.01	100%	98%	100%	100%	100%	103%
26	NF1c	336.6	6 / 0.99 / 0.01	99%	99%	97%	97%	100%	100%
27	NF1d	389.3	6 / 0.97 / 0.01	98%	98%	91%	96%	100%	99%
28	NF1e	444.0	6 / 1.00 / 0.05	108%	84%	81%	108%	100%	112%
29	NF1f	483.1	6 / 1.05 / 0.02	105%	109%	99%	113%	100%	104%
30	NSD1	140.2	6 / 1.19 / 0.09	146%	127%	143%	100%	100%	100%
31	NSD1b	158.9	6 / 1.25 / 0.12	142%	143%	153%	99%	100%	100%
32	NSD1c	226.7	6 / 1.25 / 0.11	144%	145%	156%	100%	100%	101%
33	NSD1d	207.9	6 / 1.23 / 0.09	147%	136%	143%	105%	100%	108%
34	NSD1e	368.4	6 / 1.23 / 0.09	150%	144%	132%	108%	100%	109%
35	PROP1	171.2	6 / 0.98 / 0.01	99%	94%	99%	99%	100%	98%
36	RNF135	220.4	6 / 1.02 / 0.02	99%	100%	110%	98%	100%	104%
37	SLC12	186.3	6 / 1.00 / 0.01	99%	99%	105%	100%	100%	101%
38	TCEB1P3	152.6	6 / 0.96 / 0.01	97%	95%	93%	94%	100%	98%
39	TCEB1P3b	178.3	6 / 1.04 / 0.01	103%	106%	103%	108%	100%	108%
40	TCEB1P3c	406.3	6 / 0.97 / 0.02	100%	102%	90%	93%	100%	94%
41	TXNRD2	238.5	6 / 1.01 / 0.02	101%	103%	111%	96%	100%	93%
42	UTPB	257.7	6 / 1.02 / 0.01	101%	99%	104%	105%	100%	99%
43	ZNF74	202.6	6 / 0.97 / 0.02	100%	90%	91%	99%	100%	100%

Figura A1-4: Segregación familiar de la duplicación de la región del síndrome de SOTOS.

MLPA Analysis Report - SoftGenetics	
Software: GeneMarker V1.75	Analysis Type: MLPA
Project: Untitled	Compare Type: MLPA Regression T-Dist
Technician:	Normalization By: Population Normalization
Report Time: 12/19/2012 - 14:41:40	Quantification By: Peak Height
Panel: P369-A1 Smith-Magenis	Classification: Confidence Limit: 99.00 (Population)
Control: Synthetic Control Sample	Report Value Type: Peak Ratio
Synthetic Used: SM-16313-D1_004_E01.fea /// SM-16313-D2_012_E03.fea	

SM-8178-D2_016_A03.fsa



	Probe Name	Bin Size	SM-8178-D2_016_A1
1	12q13	262.2	128%
2	18p11	383.6	107%
3	429	429.3	86%
4	4q25	346.0	99%
5	5q13	214.9	96%
6	5q31	127.6	110%
7	6q22	291.7	100%
8	9q21	178.0	91%
9	9q34	321.6	79%
10	AKAP10	233.1	107%
11	ALDH3A1	376.6	106%
12	COP3	281.2	98%
13	FLCN	202.2	100%
14	FLCNB	267.2	120%
15	HDAC4	392.0	100%
16	LLGL1	311.5	139%
17	LRRC48	274.0	106%
18	MFA4	363.1	86%
19	MIR33B	209.6	97%
20	NDUFA10	220.1	118%
21	PRPSAP2	330.8	96%
22	RAI1_EX1	241.2	86%
23	RAI1_EX1B	410.8	106%
24	RAI1_EX2	143.9	112%
25	RAI1_EX2B	248.7	103%
26	RAI1_EX3	419.0	96%
27	RAI1_EX4	400.3	87%
28	RAI1_EX5	172.0	76%
29	RAI1_EX6	160.0	91%
30	SPECC1	254.8	101%
31	TNFRSF13B	165.4	100%
32	TOM1L2	184.7	94%
33	USP22	227.0	91%
34	ZNF624	136.9	86%

Sample Name: SM-8178-D2
 Machine: ABI3730-17121-029
 Run Time: 12/19/2012 - 12:46:21 -> 12/19/2012 - 13:17:44
 Statistics # Probes Mean StdDev
 Control/Sample 0/34 0.00/0.05 0.00/0.04

Conclusion		
	Date	Initial
Authorization 1		
Authorization 2		

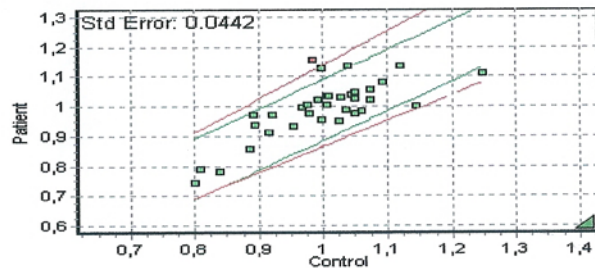


Figura A1-5: Análisis mediante MLPA con la SALSA P369 que analiza específicamente la región del síndrome de Smith Magenis, confirmando la duplicación observada con la SALSA P245.

