

# Caracterización de reordenamientos cromosómicos asociados a fenotipo

Olaya Villa Marcos

---

TESI DOCTORAL UPF 2009

DIRECTORS DE LA TESI

Dr. Luis A. Pérez Jurado

Dr. Francesc Solé Ristol



Dipòsit Legal:

ISBN:

A mis padres  
A Pablo



*“Al principio –como había pasado en el caso de la colonia de pingüinos-, ocurrían tantas cosas a la vez, había tal confusión y tal ruido, que nos quedamos perplejos, moviendo los ojos constantemente de un lado a otro de esta enorme placa viviente, esforzándonos por captar e interpretar cada movimiento, hasta que empezamos a sentirnos mareados. Pero, pasada la primera hora, cuando se nos pasó un poco la sorpresa de ver una masa tan magnífica de animales desde tan cerca, pudimos concentrarnos.”*

Gerald Durrell  
*Tierra de murmullos*



## AGRADECIMIENTOS

Parece mentira haber llegado hasta aquí...este trabajo es gracias a mucha gente que me ha ayudado a lo largo de todo este tiempo. Es muy difícil resumir todo lo que me gustaría decir, así que me disculpo de antemano si me olvido de alguien.

Gracias a Kiko, por brindarme la oportunidad de empezar en el mundo de la citogenética, en el Hospital del Mar.

A Luis, por su confianza, su dedicación, ideas y entusiasmo, por todo lo que estoy aprendiendo.

A mis compañeros del labo de genética de la UPF, porque es un placer trabajar con ellos. A Ivon, por su manera de hacer las cosas más fáciles, por todo lo que me ha enseñado, animado y ayudado, por lo que nos reímos, y sobre todo, por la amistad. A Raquel, por sus ánimos siempre, por su sonrisa permanente, por su *glamour*...A Benja, por tener el humor de leerse una de las primeras versiones de esta tesis, por su ayuda, compañerismo, y por ser miembro de la FIA...A Anna, por su generosidad, por su apoyo y sus buenos consejos. A Clara, María, Verena y Cristina por su buen humor constante. A Mariví por enseñarme southern y clonación. A Fátima, por sus sabios consejos, su cercanía y su calor. A Andreu por su humor y disposición (y también por ser de la FIA...). A Blanca Gener, Miguel del Campo, Vero, Marco, Mireia y Lluís. A Manel y Eva por los buenos ratos con los miles de BACs, nunca olvidaré lo del kitasato...

A los compañeros del Vall d'Hebron, Alberto, Asun, Anna y Teresa, por su acogida y amabilidad.

A Thomas Liehr por su generosidad y hospitalidad durante la estancia en su laboratorio. A Nadja por su paciencia y dedicación en enseñarme a aislar cromosomas. A Madeleine, Hasmik, Sophie y Vivien.

A mis antiguas compañeras del Hospital del Mar, en primer lugar a Marta, por ser mi maestra y amiga. A Cristina Corzo, por la amistad desde que éramos becarias. A Raquel, por ser la persona más detallista que conozco (esos *informes*...). A la Carme, per ensenyar citogenètica en

català a una nouvinguda d'Asturies. A Asun, Rosa Mari, Rosa, Blanca, Bea, Mari, Encarna, Ana, Leo, Carlota, Eulàlia, Rocío, Laia y Mar.

A mis amigos, en especial a las Anas, por seguir siendo mis mejores amigas desde el colegio. A Bernardo, Pep, Noemí, Natalia y Nando, por los reencuentros gastronómicos del norte.

A Ale por su confianza, por conseguir que todo esto sea posible. A Susy y Juan por su cariño. A mis padres, Alicia y Rafa, y a mi hermana Bárbara por su apoyo constante, por animarme siempre, porque consiguen que no note los mil o dos mil kilómetros que nos separan. A mi tía Teresa, Miguel y Emilio; Alejandros y Marías. A mis abuelos, Pepa y Ángel, por su ejemplo de valentía y por estar siempre presentes. .

A Pablo, por su felicidad, por apoyarme, animarme, ilusionarme, quererme, acompañarme, hacerme feliz y por infinidad de cosas más.

¡Muchísimas gracias a todos!



## **RESUMEN**

El establecimiento de correlaciones entre fenotipo y genotipo es uno de los principales objetivos de la genética. La obtención de un diagnóstico ajustado facilita el manejo clínico del paciente, así como poder ofrecer un correcto consejo genético, con asesoramiento reproductivo a las familias de pacientes con enfermedades genéticas. La identificación de genes asociados a patología desde alteraciones citogenéticas asociadas a fenotipo es uno de los métodos de clonación posicional. En este trabajo nos hemos basado en dos tipos de modelos de anomalías citogenéticas: balanceadas y no balanceadas (translocaciones y cromosomas marcadores). Hemos caracterizado las alteraciones citogenéticas de cinco pacientes de cada modelo con fenotipos diversos, empleando una combinación de técnicas citogenéticas y moleculares, con el objetivo de proponer genes candidatos asociados a cada fenotipo.

## **ABSTRACT**

One of the main objectives of Genetics is the establishment of phenotype-genotype correlations. A correct diagnosis facilitates the clinical management of the patient and the possibility to offer a genetic counselling, with reproductive assessment to the families with a patient with a genetic disease. The identification of genes associated to pathology from cytogenetic alterations associated to phenotype is one of the methods of positional cloning. In this work we have based in two different models of cytogenetic alterations: balanced and unbalanced anomalies (translocations and marker chromosomes). We have characterized five patients of each group with different phenotypes, using a combination of cytogenetic and molecular techniques, with the objective of establish candidate genes associated to disease.



# PRESENTACIÓN

Esta tesis recoge los resultados obtenidos en la caracterización citogenética y molecular de reordenamientos cromosómicos presentes en diez pacientes con fenotipos interesantes, que son además modelo para anomalías citogenéticas balanceadas y no balanceadas. El trabajo está presentado en el formato clásico, es decir, incluye introducción, material y métodos, resultados, discusión y conclusiones.

En la **introducción** se da una visión general de los métodos de identificación de genes implicados en patología, principalmente desde reordenamientos cromosómicos. A continuación se resumen las principales técnicas citogenéticas y moleculares, así como las estrategias de caracterización de puntos de rotura de alteraciones citogenéticas. Finalmente, se incluye un pequeño compendio de las enfermedades modelo que se han empleado en este trabajo, así como del consejo genético.

El apartado de **material y métodos** está dividido en dos partes: en la primera se indican los casos clínicos de cada uno de los diez pacientes estudiados, y en la segunda se detallan los protocolos de las técnicas de citogenética y biología molecular empleados.

El capítulo de **resultados** se divide en dos partes: los obtenidos en los pacientes estudiados, subdividido a su vez en anomalías citogenéticas balanceadas y no balanceadas; y los obtenidos a partir de las técnicas de microdissección manual y láser.

Y por último en la **discusión** se analizan los resultados obtenidos de cada uno de los diez pacientes, así como las estrategias metodológicas de caracterización de reordenamientos.

También incluye un **anexo** que contiene un glosario de términos clínicos, y uno de los trabajos publicados durante la elaboración de esta tesis doctoral.



# INDICE TESIS

	Pág.
RESUMEN	ix
PRESENTACIÓN	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xvii
ÍNDICE DE TABLAS	
<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Identificación de genes implicados en patología</b>	<b>3</b>
1.1.1 Análisis ligamiento.	4
1.1.2 Modelos animales.	6
1.1.3 Alteraciones citogenéticas.	7
1.1.3.1 Reordenamientos cromosómicos balanceados.	8
1.1.3.2 Reordenamientos cromosómicos no balanceados.	21
1.1.3.3 Cromosomas marcadores (SMC).	25
<b>1.2 Técnicas para la caracterización molecular de reordenamientos cromosómicos.</b>	<b>29</b>
1.2.1 FISH.	29
1.2.2 Southern Blot.	30
1.2.3 Técnicas de cuantificación basadas en PCR.	30
1.2.3.1 PCR cuantitativa a tiempo real.	30
1.2.3.2 MAPH.	32
1.2.3.3 MLPA.	34
1.2.4 Hibridación genómica comparada.	35
1.2.5 Array CGH.	36
1.2.6 Microdissección.	38
1.2.6.1 Microdissección manual.	38
1.2.6.2 Microdissección láser.	39
1.2.7 <i>Flow sorting</i> .	40
<b>1.3 Estrategias de caracterización de puntos de rotura de reordenamientos.</b>	<b>43</b>
1.3.1 Estrategia clásica.	43
1.3.2 <i>Array painting</i> .	44
1.3.3 Ultrasecuenciación.	45

<b>1.4 Enfermedades modelo.</b>	48
1.4.1 Síndromes dismórficos.	48
1.4.2 Retraso mental.	50
1.4.3 Trastorno específico del lenguaje.	51
1.4.4 Hipogonadismo hipogonadotrópico.	52
1.4.5 Síndromes mielodisplásicos.	53
<b>1.5 Consejo genético.</b>	55
<b>2. HIPÓTESIS</b>	59
<b>3. OBJETIVOS</b>	63
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	67
<b>4.1 Pacientes estudiados</b>	69
4.1.1 Anomalías no balanceadas. Cromosomas marcadores	69
4.1.1.1 Marcador 1 [SMC(6)].	69
4.1.1.2 Marcador 2 [SMC(10)].	70
4.1.1.3 Marcadores 3 [SMC(10)+SMC(14)].	71
4.1.1.4 Marcador 4 [SMC(7)].	72
4.1.1.5 Marcador 5 [i(13)(p10) ó i(21)(p10)].	73
4.1.2 Anomalías balanceadas: Translocaciones recíprocas:	73
4.1.2.1 Translocación 1. 46,XX,t(9;11)(q34;p11.2).	73
4.1.2.2 Translocación 2. 45,XY,t(17;22)(p13;q11.2),-22.	76
4.1.2.3 Translocación 3. 46,XY,t(7;18)(p15.3;q21).	77
4.1.2.4 Translocación 4. 46,XX,t(11;13)(q21;q22).	78
4.1.2.5 Translocación 5. 46,XY,t(4;15)(q24;q26),add(7)(q36)[15]/46,XY[5].	79
<b>4.2 Técnicas de citogenética molecular</b>	81
4.2.1 Cultivo de BACs, minipreps.	81
4.2.2 Marcaje por nick translation.	81
4.2.3 FISH.	82
4.2.4 Hibridación genómica comparada.	84
4.2.5 Cariotipo espectral (SKY FISH).	85

<b>4.3 Técnicas de biología molecular</b>	88
4.3.1 PCR fragmentos grandes.	88
4.3.2 Secuenciación.	88
4.3.3 Southern blot.	89
4.3.4 Microdissección manual de cromosomas.	94
4.3.5 Microdissección láser de cromosomas.	101
4.3.6 MLPA.	104
4.3.7 Array CGH.	108
4.3.7.1 Array BACs qGenomics.	109
4.3.7.2 Array oligonucleótidos Agilent 244K.	111
4.3.7.3 Array SNPs Illumina 370K.	114
4.3.8 PCR cuantitativa SYBR <i>green</i> .	115
4.3.9 Northern blot.	116
4.3.10 Western blot.	118
<b>5. RESULTADOS</b>	123
<b>5.1 Pacientes estudiados</b>	125
5.1.1 Anomalías no balanceadas Cromosomas marcadores:	125
5.1.1.1 Marcador 1: SMC(6).	125
5.1.1.2 Marcador 2: SMC(10).	131
5.1.1.3 Marcadores 3: SMC(10)+SMC(14).	135
5.1.1.4 Marcador 4: SMC(7).	140
5.1.1.5 Marcador 5: 47,XX,+mar (iso 13 ó 21 p).	147
5.1.2 Anomalías balanceadas: Translocaciones recíprocas:	151
5.1.2.1 Translocación 1: 46,XX,t(9;11)(q34;p11.2).	151
5.1.2.2 Translocación 2: 45,XY,t(17;22)(p13;q11.2),-22.	165
5.1.2.3 Translocación 3: 46,XX,t(11;13)(q21;q22).	171
5.1.2.4 Translocación 4: 46,XY,t(7;18)(p15.3;q21).	177
5.1.2.5 Translocación 5: t(4;15)(q24;q26)	185
<b>5.2 Microdissección manual y láser.</b>	193

<b>6. DISCUSIÓN</b>	203
6.1 Trisomía parcial de 6p. Marcador 1.	205
6.2 Trisomía parcial de 10p y 10q. Marcador 2.	208
6.3 Trisomía parcial de 10p y 14q. Marcadores 3.	211
6.4 Trisomía parcial de 7p. Marcador 4.	213
6.5 Isocromosoma 13p ó 21p. Marcador 5.	215
6.6 Disrupción de los genes <i>PHF21A</i> y <i>GOLGA1</i> en una paciente con retraso fundamental del lenguaje. Translocación 1.	216
6.7 Monosomía parcial de 17pter y deleción de 22q. Translocación 3.	220
6.8 Translocación balanceada en un paciente con hipogonadismo hipogonadotrópico. Translocación 2.	223
6.9 Translocación aparentemente balanceada en una paciente con retraso del lenguaje y TDAH. Translocación 4.	227
6.10 Translocación t(4;15)(q24;q26) con otras alteraciones citogenéticas en un paciente con una leucemia mielomonocítica crónica. Translocación 5.	230
6.11 Microdissección con aguja o láser como método de aislamiento de cromosomas.	232
<b>7. CONCLUSIONES</b>	239
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	247
<b>ABREVIATURAS</b>	267
<b>GLOSARIO TÉRMINOS CLÍNICOS</b>	269
<b>ANEXO</b>	271



## INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1. Haplotipos obtenidos en un estudio de ligamiento familiar.	5
Fig. 2. Formación de gametos y cigotos en un individuo portador de una translocación robertsoniana (14;21).	13
Fig. 3. Resultados de no disyunción en meiosis I y meiosis II.	22
Fig. 4. Mosaicismo postzigótico.	23
Fig. 5. Mecanismos de formación de UPD asociada a la presencia de SMC.	27
Fig. 6. RT-PCR.	32
Fig. 7. tecnología de MAPH.	33
Fig. 8. MLPA.	35
Fig. 9. Array CGH.	37
Fig.10. Microdisector manual.	39
Fig. 11. Cariotipo de flujo	40
Fig. 12. Diagrama de flujo con los principales aspectos a realizar del estudio genético.	57
Fig. 13. Imagen del resumen de los resultados obtenidos en el test WISC-R (translocación 1).	75
Fig. 14. Árbol genealógico de la familia de la translocación 2.	77
<b>Fig. 15. Esquema del montaje para la transferencia de gel a membrana en un southern blot.</b>	<b>91</b>
<b>Fig. 16. Imagen de la separación de un cromosoma 7 con la aguja.</b>	<b>97</b>
<b>Fig. 17. Transferencia aguja-pipeta. En ambas fotos se puede apreciar el cromosoma en el extremo de la aguja.</b>	<b>98</b>
<b>Fig. 18. Microdisección de una banda de la región 2q subterminal.</b>	<b>101</b>
Fig. 19. Diagrama con las principales alternativas realizadas en el protocolo de microdisección láser.	102
Fig. 20. Cariotipo del paciente con el marcador 1.	126
Fig. 21. SKY-FISH del marcador 1.	127
Fig. 22. Pintado cromosómico con sonda específica para el cromosoma 6 en el paciente con el marcador 1.	127
Fig. 23. Ideograma de los perfiles cromosómicos obtenidos con	

HGC para el marcador 1.	128
Fig. 24. Gráfico de los marcadores microsátélites D6S257 y D6S1610.	129
Fig. 2.5. Ideograma del cromosoma 6 señalando la región trisómica (marcador 1).	130
Fig. 26. Cariotipo del paciente en el que se señala el cromosoma extra (marcador 2).	132
Fig. 27. Comparativa de los patrones de tinción obtenidos con bandas C y G en el cromosoma marcador 2.	132
Fig. 28. Ideograma del cromosoma 10 en el que se señala la región duplicada incluida en el cromosoma marcador 2.	134
Fig. 29. Imagen de los alelos obtenidos para el marcador D10S1780 del paciente con el marcador 2 y sus padres.	135
Fig.30. Metafase del paciente con 48,XY,+mar1,+mar2 (marcadores 3).	136
Fig. 31. Ideogramas de los cromosomas 10 y 14 en los que se aprecian los clones que aparecen ganados en el array .	137
Fig. 32. Resultado del marcador D14S742 (14q11.2) en la que el paciente con los marcadores 3 presenta 3 alelos,	138
Fig. 33. Ideogramas de los cromosomas 10 y 14, en los que se señalan con líneas rojas las regiones duplicadas incluidas en los cromosomas marcadores.	139
Fig. 34. Cariotipo del paciente con el marcador 4.	140
Fig. 35. Imagen de los alelos obtenidos para el marcador D7S1531 (marcador 4).	142
Fig. 36. Patrón de los picos obtenidos para el MLPA específico del cromosoma 7 (marcador 4).	143
Fig. 37. Plot del cromosoma 7 en el array de Illumina 370K (marcador 4).	144
Fig. 38. Ideograma del cromosoma 7 en el que se señalan con líneas rojas las regiones duplicadas (marcador 4).	145
Fig. 39. Imagen de FISH con la muestra del paciente hibridada con el clon RP11-193C16 (7q36.1).	146
Fig. 40. Cariotipo de la paciente con el marcador 5.	147
Fig. 41. Tinción bandas NOR del marcador 5.	148
Fig. 42. FISH reverso del caso del marcador 5 sobre metafases de un individuo control.	148

Fig. 43. FISH del caso del marcador 5 con diversas sondas centroméricas.	149
Fig. 44. Cariotipo en el que se aprecia una translocación entre los cromosomas 9 y 11.	151
Fig. 45. Metafase con la hibridación WCP9.	152
Fig. 46. Mapa de la región donde se encuentra el punto de rotura del cromosoma 9.	154
Fig. 47. Mapa de la región donde se encuentra el punto de rotura del cromosoma 11.	154
Fig. 48. Ideogramas de los cromosomas 9 y 11, así como de los derivados resultantes de la translocación.	155
Fig. 49. Imagen obtenida con southern blot en la que se señala la banda extra presente en la digestión de muestra de la paciente (translocación 1)	155
Fig. 50. Localización de los cebadores en los genes PHF21A y GOLGA1.	156
Fig. 51 Representación de los puntos de rotura del cromosoma 9.	158
Fig. 52 Esquema de la región del cromosoma 11 en el que se señala el punto de rotura del gen PHF21A.	158
Fig. 53. Gráficos en los que se muestra la expresión relativa del gen PHF21A.	159
Fig. 54. Comparación de la expresión relativa de muestras a partir de líneas celulares.	160
Fig. 55. Comparación de la expresión relativa de muestras de la paciente (translocación 1).	161
Fig. 56. Western con el anticuerpo específico para PHF21A y tubulina.	162
Fig. 57. Western con el anticuerpo específico para Golga1 y tubulina.	162
Fig. 58. Fragmento de secuencia del exón 12 del gen PHF21A en el individuo AUT222 01, en el que se puede apreciar el SNP C/T.	164
Fig. 59. Imagen del cariotipo del paciente (translocación 2).	165
Fig. 60. Ideogramas de los cromosomas después de la translocación 2.	166
Fig. 61. Árbol genealógico de la familia del paciente con la t(17;22),	167
Fig. 62. Región p terminal del cromosoma 17, donde se señala la localización aproximada del punto	

de rotura de la translocación 2.	168
Fig. 63. FISH del paciente con el clon CTD-2348K1 (17p13.3).	168
Fig. 64. Microsatélite D17S289 para la familia (translocación 2).	169
Fig. 65. Plots de los cromosomas 17 y 22 obtenidos con el array de qGenomics.	170
Fig. 66. Cariotipo del paciente con la t(7;18) (translocación 3)	171
Fig. 67. Ideogramas de los cromosomas 7 y 18 después de la translocación.	172
Fig. 68. Haplotipos obtenidos en el paciente, su madre y sus hermanas con marcadores microsatélite flanqueantes a los puntos de rotura para descartar la posible herencia de la translocación 3.	173
Fig. 69. Metafase de un individuo control hibridada con FISH reverso del material der(7)	174
Fig. 70. Imagen ampliada de los cromosomas 7 y 18, en los que se observa señal de hibridación en casi la totalidad de los cromosomas 7, así como la parte distal de 18qter.	174
Fig. 71. Ideogramas de los cromosomas 7 y 18, y resultados del array de Agilent.	175
Fig. 72. FISH con los BACs RP11-784N11 (7p15) y RP11-380K20 (18q21).	176
Fig. 73. Región del cromosoma 7 donde se localiza el punto de rotura de la translocación.	177
Fig. 74. Región del cromosoma 18 donde se localiza el punto de rotura de la translocación.	177
Fig. 75. Imagen del cariotipo de la paciente (translocación 4).	179
Fig. 76. Ideogramas de los cromosomas 11 y 13 después de la translocación.	180
Fig. 77. Imagen del FISH reverso de la hibridación del der(13) sobre metafases de un caso control.	180
Fig. 78. Señal de hibridación obtenida para los cromosomas 11 y 13 con el FISH reverso del material amplificado del der(13).	181
Fig. 79. Representación de los plots de los cromosomas 11 y 13 con el array qGenomics.	182
Fig. 80. Ideogramas de los cromosomas 11 y 13 en los que se señalan los puntos de rotura de la t(11;13), y sondas del array Agilent 244K.	182

Fig. 81. Regiones donde se localizan los puntos de rotura de la translocación 4	184
Fig. 82. Cariotipo del paciente con la translocación 5.	186
Fig. 83. Ideogramas de los cromosomas después de la translocación, y del cromosoma 7 con el material añadido en q terminal.	186
Fig. 84. Metafase hibridada mediante FISH reverso con el material amplificado a partir del der(15).	187
Fig. 85. Señal de hibridación del FISH reverso en los cromosomas 4 y 15.	187
Fig. 86. Ideogramas de los cromosomas 4 y 15 con los puntos de rotura de la translocación y plots obtenidos para la hibridación de las sondas de Agilent 244k.	188
Fig. 87. Localizaciones de los puntos de rotura predichos por el array de oligonucleótidos en el cromosoma 15.	189
Fig.88. FISH con los clones RP11-41F9, y RP11-344K14 (translocación 5).	189
Fig.89. Situación de los BACs hibridados en la translocación 5.	190
Fig. 90. FISH reverso de un caso control en el que se aislaron 9 unidades del brazo cromosómico 7p.	194
Fig. 91. Gráfico en el que se muestran los valores de intensidad de fluorescencia de todos los BACs del array de qGenomics.	196
Fig. 92. Gráficos de los resultados obtenidos para las sondas de los cromosomas 11 y 13 en el array de oligonucleótidos de Agilent.	197
Fig. 93. Extensión sobre un cobreobjetos con membrana PEN, en la que se aprecian un cromosoma 16 y un 12 a 100X.	198
Fig. 94. Metafase en cobreobjetos con membrana PEN, a 63X, en microdisector Leica.	199
Fig. 95. Metafase sobre un soporte de membrana PET únicamente, a 150X en microdisector Leica.	199
Fig. 96. Metafase en cobreobjetos sin membrana, a 63X en microdisector Leica.	201
Fig. 97. Núcleos aislados por microdisección láser desde cobreobjetos con membrana.	202



## INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Resumen de los principales estudios comparativos entre translocaciones presentes en individuos con fenotipo normal y alterado.	20
Tabla 2. Comparación entre las principales técnicas citogenéticas y moleculares.	42
Tabla 3. Comparativa de las diferentes técnicas actuales de secuenciación masiva.	46
Tabla 4. Resumen de los resultados obtenidos en los estudios del paciente (translocación 5).	80
Tabla 5. Panel de sondas diseñadas para el juego de MLPA.	105
Tabla 6. Listado de las sondas de FISH empleadas para delimitar el tamaño del marcador 1.	130
Tabla 7. Listado de marcadores utilizados y haplotipos obtenidos para los progenitores y el paciente con el marcador 2.	133
Tabla 8. Haplotipos obtenidos en el paciente y sus progenitores para diversos marcadores microsatélites de los cromosomas 10 y 14 (marcadores 3).	139
Tabla 9. Listado de marcadores microsatélites empleados en la muestra del paciente (marcador 5)	141
Tabla 10. Resumen de la caracterización de los casos con cromosomas marcadores.	150
Tabla 11. Listado de los BACs empleados para localizar el punto de rotura de la translocación 1.	153
Tabla 12. Resumen de los resultados obtenidos para las translocaciones estudiadas y técnicas empleadas para su caracterización.	192
Tabla 13. Relación del número de unidades aisladas y el método empleado para los controles previos de microdissección.	193
Tabla 14. Listado de los cromosomas aislados en mediante microdissección manual.	195
Tabla 15. Concentraciones y purezas obtenidas en las muestras aisladas por microdissección manual después de la primera ronda de amplificación por DOP-PCR.	195
Tabla 16. Principales síndromes asociados a craneosinostosis y genes asociados.	207
Tabla 17. Genes asociadas a hipogonadismo hipogonadotrópico.	226
Tabla 18. Genes asociados con TDAH.	229









# **1. INTRODUCCIÓN**



## 1.1 Identificación de genes implicados en patología mediante clonación posicional

La identificación o clonación de genes responsables de enfermedades tiene una aplicación práctica muy importante en la medicina. Además de proporcionar un conocimiento biológico relevante sobre los mecanismos patogénicos de dichas enfermedades, esta identificación permite establecer métodos de diagnóstico con aplicaciones en estadios presintomáticos y prenatales, facilitando el consejo genético. Establecer relaciones entre genotipo-fenotipo puede ayudar también a conocer o predecir la evolución de la enfermedad y al diseño de estrategias terapéuticas.

El establecimiento de correlaciones entre fenotipo y genotipo es uno de los principales objetivos de la genética. Determinar secuencias de ADN que pueden causar o estar relacionadas con enfermedades concretas en un individuo sano es especialmente difícil en genética humana, dado que las intervenciones experimentales (mutagénesis, selección, cruzamientos, etc) no son razonables y muchos fenotipos pueden ser sutiles <sup>1</sup>.

Las estrategias para identificar genes responsables de enfermedades hereditarias que se usan habitualmente son las dos siguientes:

- **Clonación funcional:** se basa en el conocimiento de la función del producto génico, independientemente de la posición del gen en el genoma. Es necesaria información acerca de los procesos bioquímicos y metabólicos involucrados en el desarrollo de una patología específica.

Esta estrategia se aplica poco en investigación en la actualidad, ya que se requiere información sobre la patogénesis de la enfermedad, y en la mayoría de ocasiones no es fácil tener un único gen candidato, ya que normalmente las patologías son complejas.

- **Clonación posicional:** se basa en el conocimiento de la localización del gen en el genoma. A diferencia de la clonación funcional, para la clonación posicional no se requiere información sobre la fisiopatología de la enfermedad. Se necesita haber establecido la localización genómica aproximada del gen generalmente mediante alguno de estos métodos:
  - Análisis de ligamiento.
  - Desde modelos animales.
  - A partir de alteraciones citogenéticas asociadas a fenotipo <sup>2,3</sup>.

Mediante las diferentes aproximaciones, se han identificado >2500 enfermedades y trastornos asociados a genes (Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/mimstats.html>).

### 1.1.1 Análisis de ligamiento

A comienzos de la década de los ochenta se comenzó a desarrollar el uso de variantes polimórficas de ADN como marcadores genéticos para realizar análisis de ligamiento <sup>1, 4</sup>. Se realizó un mapa humano de ligamiento genético comparando la transmisión de regiones cromosómicas en familias con patologías concretas, lo que permitió localizar en 1983 el primer *locus* asociado a enfermedad: el de la Corea de Huntington <sup>5</sup>.

Los análisis de ligamiento genético son estudios de asociación realizados en familias mediante los que se determina el fragmento cromosómico que cosegrega o se asocia al fenotipo de la enfermedad <sup>1, 4, 6, 7</sup>. En dicho fragmento debe encontrarse el gen cuya mutación es responsable del fenotipo. Se necesitan familias en las cuales la enfermedad esté segregándose, es decir, que aparezca en varias generaciones. Se comparan diversos marcadores genéticos distribuidos en todos los cromosomas y los patrones de los mismos en individuos sanos con los afectados, hasta definir alguno que se encuentre específicamente en los individuos afectados, como se puede apreciar en la figura siguiente:

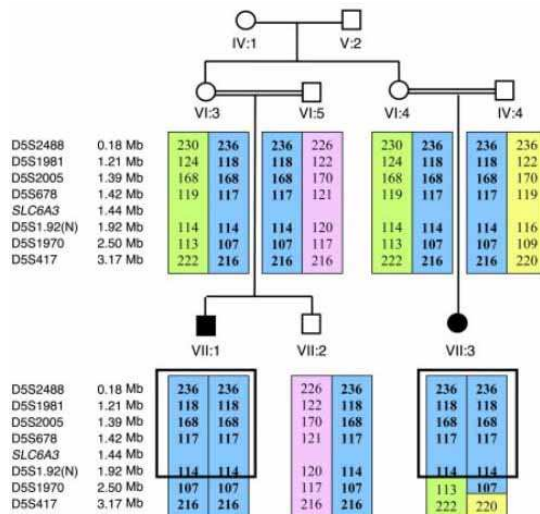


Fig. 1. Haplotipos obtenidos para esta familia, en la que los individuos afectados comparten los alelos rodeados por el recuadro.

Los estudios de ligamiento o asociación se pueden hacer usando marcadores de todo el genoma cuando no se conoce el locus

## INTRODUCCIÓN

responsable o asociado a la enfermedad, o mediante una aproximación basada en genes candidatos. A continuación se acota el intervalo del genoma asociado específicamente en los individuos con la enfermedad estudiando potenciales genes candidatos para la enfermedad. Los métodos adicionales para afinar la localización incluyen el cartografiado por homocigosidad y la determinación de desequilibrio de ligamiento.

Los genes responsables de la mayoría de enfermedades monogénicas y muchas enfermedades multifactoriales se han caracterizado mediante este tipo de estudios, pero esta estrategia requiere disponer de familias amplias con muchos individuos afectados para obtener resultados estadísticamente significativos. Hay algunas limitaciones inherentes a este tipo de estudios, que incluyen la posibilidad de heterogeneidad genética con más de un locus responsable, la necesidad de familias con elevado número de miembros afectos, la dificultad de asignar estado en casos de penetrancia incompleta, dificultades en la definición de los criterios diagnósticos y la necesidad de realizar genotipado a gran escala para detectar *loci* de susceptibilidad<sup>8,9</sup>.

### **1.1.2 Modelos animales**

En este caso se emplea el uso de modelos animales naturales o modificados genéticamente, y la aplicación de cartografiado comparativo entre especies aprovechando las grandes similitudes genéticas, proteicas y metabólicas con el ser humano. Se pueden por tanto diseñar modelos animales con alteraciones genéticas determinadas, con el fin de poder comprender mejor las funciones del gen implicado, y establecer correlaciones con la patología



humana <sup>10</sup>. Los animales más empleados en el laboratorio son el ratón (*Mus musculus*), la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*), el nemátodo *Caenorabditis elegans* y el pez cebra (*Danio rerio*). En la actualidad estos modelos se emplean más para estudiar un gen o una vía concreta una vez se conoce, siendo muy útiles los modelos animales de inactivación de un gen concreto, también llamados *Knockout*, para realizar estudios funcionales de expresión, monitoreo de ensayos clínicos, de comportamiento, etc.

### 1.1.3 Alteraciones citogenéticas

Las alteraciones citogenéticas son modificaciones del número o de la estructura normal de los cromosomas. En las alteraciones numéricas, hay un cambio en la dotación del número haploide ( $n=23$ ), y puede haber tanto pérdidas (monosomías) como ganancias (trisomías). La única monosomía descrita compatible con la vida es el síndrome de Turner, con presencia de un solo cromosoma X: 45,X. Para las trisomías hay tres síndromes autosómicos descritos: Down (trisomía 21), Patau (trisomía 13), Edwards (trisomía 18). En cuanto a los cromosomas sexuales, hay diversos síndromes asociados a aneuploidías: síndrome de Turner, síndrome de Klinefelter (XXY), y otras anomalías numéricas con alteración fenotípica variable: XYY, XXX, XXXX, XYY, etc.

Las alteraciones estructurales implican un cambio en la arquitectura morfológica de los cromosomas. Hay diversos tipos:

- Translocaciones: intercambio recíproco de material entre dos o más cromosomas. Un tipo especial de translocaciones son las robertsonianas, que implican la

fusión del centrómero entre dos cromosomas acrocéntricos, sin pérdida de material genético.

- Inversiones: cambio de orientación de un segmento cromosómico dentro de un cromosoma. Dependiendo de si el fragmento contiene o no el centrómero las inversiones son pericéntricas o paracéntricas, respectivamente.
- Inserciones: Cambio de localización de un segmento cromosómico a otro cromosoma.
- Delección: Ausencia de una secuencia cromosómica.
- Duplicación: Repetición de un segmento cromosómico.

En el estudio citogenético o molecular, dependiendo de si la dotación genética se mantiene intacta o no, los reordenamientos se definen como balanceados o no balanceados.

### **1.1.3.1 Reordenamientos cromosómicos balanceados**

Las técnicas de citogenética convencional y el cariotipo de alta resolución permiten detectar reordenamientos cromosómicos aparentemente balanceados o equilibrados (BCRs, del inglés *Balanced Chromosomic Rearrangements*), que incluyen translocaciones recíprocas, inversiones e inserciones. Debido a la resolución de estas técnicas, sólo es posible detectar pérdidas de material genético mayores de ~5-10 Mb, con lo que el carácter balanceado de la alteración se debe confirmar siempre mediante técnicas de biología molecular de mayor resolución (FISH, microsatélites, MLPA, array CGH, MAPH, secuenciación...).

Los reordenamientos cromosómicos aparentemente balanceados asociados a fenotipo, o DBCRs (del inglés *Disease associated balanced chromosomal rearrangements*), son alteraciones que, a nivel molecular, pueden inactivar genes específicos mediante su interrupción, reorganización o delección. La caracterización molecular de estos DBCRs se ha empleado como instrumento para la clonación posicional o identificación de genes asociados a patología, ya que facilitan el aislamiento rápido de genes a partir de la clonación de los puntos de rotura<sup>9,11</sup>.

Para la identificación de genes se ha ido desarrollando una metodología específica basada en la combinación de técnicas citogenéticas y moleculares. Diversos estudios indican que un porcentaje importante de reordenamientos cromosómicos balanceados tienen probablemente una relación causal con los fenotipos anormales observados en el individuo portador de la anomalía cromosómica<sup>12</sup>. Se ha descrito que un 6.1% de las translocaciones equilibradas y un 9.4% de las inversiones equilibradas están asociadas a fenotipos congénitos anormales, mientras que en el caso de individuos con cariotipos normales, el riesgo de presentar enfermedades congénitas desciende al 2-3%<sup>13</sup>.

En otro estudio, el análisis de unas 70.000 pruebas citogenéticas postnatales realizados en hospitales de Suecia y Dinamarca por diversas patologías (retraso mental (RM), rasgos dismórficos, malformaciones congénitas y/u otros síntomas neurológicos), reveló la presencia de DBCRs en cifras 6 veces superiores a las que se encuentran en población normal, lo que sugiere una relación causal de los reordenamientos con la patología observada

## INTRODUCCIÓN

en la mayoría de los casos <sup>11</sup>. Más de la mitad de los DCBRs están asociados a cuadros clínicos con RM severo o moderado y otras alteraciones neurocognitivas. Este hecho es consistente con que aproximadamente un tercio de los genes humanos se expresan en cerebro <sup>14</sup>, y que probablemente muchos de ellos tienen un papel importante en el desarrollo y en la función del sistema nervioso central.

A partir de individuos con fenotipo alterado que presentan reordenamientos cromosómicos únicos (sobre todo translocaciones aparentemente balanceadas) se han podido identificar genes implicados en la alteración <sup>9</sup>. El primer trastorno mendeliano localizado gracias a un reordenamiento cromosómico fue la distrofia muscular de Duchene (DMD) <sup>15</sup>. La clonación del punto de rotura de uno de los casos fue un paso clave para la identificación del gen responsable <sup>16, 17</sup>. Algunos ejemplos posteriores son la clonación de los genes *PKD1* (enfermedad poliquística del riñón <sup>18</sup>, *SHH* (holoprosencefalia) <sup>19</sup>, o *SIM1* (obesidad) <sup>20</sup>. Actualmente, la caracterización molecular de reordenamientos sigue contribuyendo de manera significativa a la identificación de genes responsables o relacionados con enfermedades <sup>2, 11, 21</sup>, demostrando la utilidad de esta aproximación.

La caracterización de los genes afectados por dichas anomalías permite identificar el o los genes responsables del fenotipo. La clonación posicional sólo necesita disponer de material genético del individuo afectado. Por tanto, es válida en casos de enfermedades monogénicas o para la identificación de genes de acción importante en alteraciones multifactoriales. La posibilidad

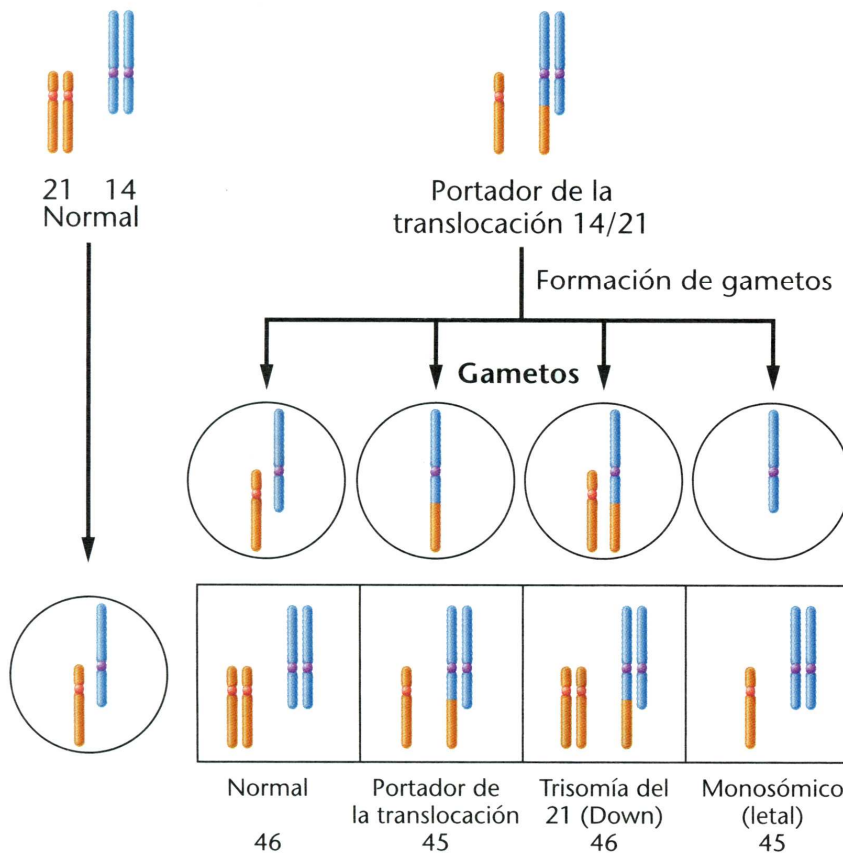
de heterogeneidad genética de la enfermedad no es un factor limitante.

Para facilitar la identificación de puntos de rotura específicos asociados a patología se desarrolló la Red de trabajo de Citogenética Mendeliana (MCN, del inglés *Mendelian Cytogenetics Network*), que coordina y recoge los resultados citogenéticos de numerosos laboratorios de diagnóstico citogenético de todo el mundo. En esta base de datos los laboratorios remiten los datos citogenéticos (cariotipo) y fenotípicos de los pacientes, con carácter retrospectivo y prospectivo. En el año 2000, se publicó un estudio realizado sobre 71739 cariotipos, en los que se encontraron 216 DBCRs (0.3%), sin incluir translocaciones robertsonianas ni inversiones polimórficas del cromosoma 9. Estas alteraciones se clasificaron como 154 translocaciones recíprocas balanceadas, 2 inserciones recíprocas balanceadas, 2 inserciones invertidas y 47 inversiones balanceadas <sup>11</sup>.

Antes del perfeccionamiento de las técnicas de bandeo cromosómico la identificación de las translocaciones se realizaba por el cambio de patrón o tamaño de los cromosomas. El desarrollo de la obtención de cromosomas de mayor tamaño (prometafásicos) y la optimización de las técnicas de tinción permitió un aumento de la resolución detectable, y por tanto una disminución de los tamaños de las translocaciones e inversiones detectadas. Debido a la resolución de la citogenética convencional, las alteraciones de tamaño inferior ~5-10 Mb son conocidas como alteraciones “crípticas”. Por tanto, una translocación aparentemente balanceada al microscopio óptico puede no serlo a nivel molecular.

## INTRODUCCIÓN

La incidencia de reordenamientos balanceados en términos exclusivamente citogenéticos es aproximadamente de 1:1000 nacidos vivos, de los que la mitad son translocaciones recíprocas, presentes por tanto en 1 de cada 500 individuos <sup>22</sup>. El riesgo asociado de presentar anomalías fenotípicas es de un ~6.1%, que aumenta al 6.7% si se tienen en cuenta las inversiones <sup>13</sup>, además de un mayor riesgo de fallo reproductivo (abortos de repetición, fertilidad disminuida) y de tener descendencia con reordenamientos no balanceados, debido a la segregación anormal de los cromosomas reordenados <sup>23</sup>, como se puede observar en la siguiente imagen.



*Fig. 2. Esquema de las posibles combinaciones de formación de gametos y cigotos en el caso de un individuo portador de una translocación robertsoniana (14;21). Los gametos están representados por círculos y los cigotos por cuadrados.*

La mayoría de individuos portadores de reordenamientos cromosómicos aparentemente balanceados no tienen afectación fenotípica. Sin embargo, en pacientes con fenotipos severos la disrupción de genes en uno o varios puntos de rotura puede ser la causa del fenotipo anómalo. Una gran proporción de individuos afectados presentan microdeleciones no visibles al microscopio, de modo que los pacientes con reordenamientos aparentemente

## INTRODUCCIÓN

balanceados que interrumpen genes, o portadores de pequeñas deleciones proporcionan una oportunidad de estudio de las posibles consecuencias de la haploinsuficiencia <sup>24</sup>.

Hay varios mecanismos posibles para explicar la asociación entre los reordenamientos aparentemente balanceados y alteraciones fenotípicas <sup>24</sup>:

- La alteración puede estar relacionada con la interrupción de un gen o genes situados en el punto de rotura de la translocación, con lo que el paciente tendría un trastorno monogénico en el caso en el que una sola copia funcional del gen no fuera suficiente para mantener la función normal (haploinsuficiencia).
- Formación de un nuevo/nuevos gen/es de fusión en los cromosomas derivados, cuyo producto sea responsable o intervenga en el fenotipo.
- El reordenamiento puede ser no balanceado a escala molecular, es decir, existe una pérdida o ganancia de material genético que pueden alterar la secuencia del gen de interés.
- Puede haber un mosaicismo no balanceado en un tejido diferente al estudiado.
- Las anomalías pueden ser debidas a una disomía uniparental (UPD, del inglés *UniParental Disomy*) de uno de los cromosomas implicados en el reordenamiento. La UPD es la herencia de los dos alelos de un *locus*, segmento cromosómico o un cromosoma entero del mismo progenitor. Las repercusiones fenotípicas pueden generarse en el caso de presencia de genes improntados, es decir, silenciados por metilación y con expresión



preferencial desde el *locus* de un progenitor (que puede resultar en la pérdida de función del gen), o por homocigosidad de una mutación recesiva <sup>25, 26</sup>.

- Efecto de posición, en el que la alteración no afectaría directamente a la secuencia del gen, sino que puede haber una desregulación de secuencias promotoras o reguladoras (inhibidores y/o potenciadores); o un cambio en la estructura de la cromatina, que por ejemplo dificultase el acceso a proteínas que interaccionan con el ADN <sup>27, 28</sup>.
- Mecanismo desconocido hasta el momento.

Algunos reordenamientos cromosómicos no son simples sino que se trata de **reordenamientos crípticos complejos** (CCR, *cryptic complex chromosomal rearrangements*). Estos reordenamientos implican al menos 2 cromosomas o al menos 2 puntos de rotura en translocaciones aparentemente balanceadas <sup>8, 24, 29-37</sup>. En estos estudios, se encuentra que entre un 1.5% y un 60% de casos presentan CCRs (que incluyen duplicaciones, deleciones e inserciones) en los puntos de rotura de las translocaciones, además de reordenamientos en otros *loci* del genoma no relacionados con la alteración citogenética. La asociación entre el reordenamiento aparentemente balanceado y el fenotipo anómalo puede ser parcialmente explicada por la presencia de CCRs, ya que la probabilidad de que haya implicados genes sensibles a dosis en uno o varios de los puntos de rotura, o cerca de ellos, aumenta con la complejidad de los reordenamientos <sup>32</sup>. Por este motivo, además de la clonación de los puntos de rotura de las translocaciones, sería recomendable realizar un análisis de todo el genoma mediante array CGH para descartar la presencia de desbalance en otros *loci* <sup>24, 32, 33, 38</sup>. Los puntos de rotura de

## INTRODUCCIÓN

individuos con fenotipo normal con translocaciones aparentemente balanceadas son estructuralmente simples, mientras que las translocaciones en pacientes con fenotipo anómalo son en ocasiones complejas e implican desbalances tanto en los puntos de rotura como en otros *loci* del genoma <sup>31</sup>. La complejidad de los reordenamientos genéticos citados afecta al consejo genético, puesto que un caso con una translocación balanceada es diferente al de un caso con CCR, en el que la probabilidad de anomalía fenotípica es mayor por la elevada cantidad de puntos de rotura. Por tanto, el riesgo de generar gametos aneuploides es mucho mayor que en los portadores de translocaciones balanceadas.

Un aspecto importante es el **origen parental** de los reordenamientos. En los casos en los que el origen de la translocación pudo determinarse (39) éste era paterno, salvo en un caso <sup>24, 30, 32, 33</sup>. Por tanto, la meiosis paterna parece que es más propensa a los intercambios cromosómicos, aunque no está claro si se asocia preferentemente a translocaciones asociadas con deleciones en los puntos de rotura o en otros *loci*, o simplemente refleja una tendencia en la meiosis paterna a formar translocaciones <sup>33</sup>. Está descrito que la mayoría de deleciones intersticiales y las translocaciones no robertsonianas son de origen paterno (70% y 72%, respectivamente), lo que sugiere que los mecanismos que generan pérdidas genómicas son más frecuentes durante la meiosis masculina. Este exceso de errores podría reflejar una vulnerabilidad de las células germinales en las divisiones premeióticas a los reordenamientos cromosómicos, dado que el número de divisiones es mucho mayor en las células germinales masculinas que en las femeninas, pero por otra parte, no hay una correlación entre edad paterna y frecuencia de

reordenamientos cromosómicos estructurales *de novo*<sup>39</sup>. Teniendo en cuenta que todos los individuos analizados con hijos portadores de translocaciones *de novo* y CCRs son fértiles, parece que durante la espermatogénesis algunas células escapan al mecanismo de control de recombinación. La presencia de anomalías cromosómicas constitucionales (translocaciones o cromosomas marcadores) puede causar infertilidad masculina por detención de la espermatogénesis en estadios tempranos de meiosis I, con lo que es posible que las CCR se generen en fases más avanzadas de la proliferación de células germinales, ya que los mecanismos de reconocimiento y bloqueo de las células germinales las detienen al comienzo de la meiosis. Por tanto la presencia de CCRs está frecuentemente asociada a infertilidad masculina, ya que su transmisión a la descendencia es inusual<sup>33</sup>. (ver tabla X).

En cuanto a la **disrupción de genes en los puntos de rotura**, el estudio realizado por Baptista y cols. en 45 individuos portadores de translocaciones (31 con fenotipo normal y 14 alterado) reveló que la mayoría de puntos de rotura estaban localizados en genes o próximos a ellos (<1.2 Mb), pero con frecuencias similares entre individuos con fenotipo normal o alterado (73% vs 67%)<sup>30</sup>. La proporción descrita del genoma humano con presencia de genes es del ~34.8-38.5%, dependiendo de la versión de secuenciación del genoma<sup>40</sup>, lo que sugiere una localización preferencial de los puntos de rotura en las regiones génicas o próximas a ellos<sup>30</sup>. Estos resultados son consistentes con los encontrados en otro estudio realizado en 76 individuos portadores de translocaciones (30 normales y 46 con fenotipo alterado), en los que los puntos de rotura de las translocaciones de los individuos con fenotipo

anómalo localizaban preferentemente en las bandas G negativas cromosómicas (R positivas), asociadas con mayor contenido génico y en bases GC<sup>34</sup>. (ver tabla 1).

Las **funciones** más frecuentes de los genes involucrados en los puntos de rotura de la cohorte del estudio de Baptista y cols. estaban relacionadas con transcripción y transducción de señales, tanto en los grupos de fenotipo normal como alterado. La única diferencia significativa estaba en que había una presencia casi 6 veces mayor de genes relacionados con el sistema nervioso en los pacientes con fenotipo alterado que en los individuos normales. La disrupción de genes por translocaciones en individuos con fenotipo normal sugiere que estos genes no son sensibles a dosis durante el desarrollo. En estos casos, en general, no hay desbalances asociados con los puntos de rotura ni otras alteraciones cromosómicas complejas, en contraste a las observaciones en las cohortes de individuos con fenotipo anómalo<sup>30</sup>.

La única **translocación recurrente** no robertsoniana descrita es la t(11;22)(q23;q11.2), en la que los portadores no presentan un fenotipo asociado, y generalmente son diagnosticados por tener descendencia con el síndrome causado por la presencia del cromosoma extra der(22)(t(11;22)<sup>41, 42</sup>. Este síndrome tiene un fenotipo característico que consiste en RM severo, seno preauricular, anomalías en las orejas y paladar, micrognatia, defectos cardíacos y anomalías genitales en varones<sup>43</sup>. Los puntos de rotura de esta translocación están localizados en el centro de repeticiones palindrómicas ricas en repeticiones AT (PATRR, del inglés *palindromic AT-rich repeats*), por recombinación ilegítima entre estas secuencias<sup>41, 44</sup>. El ADN

palindrómico puede formar estructuras cruciformes de doble cadena u horquillas de cadena simple, favorecidas por las temperaturas de fusión (*melting*) más bajas de las regiones ricas en AT, lo que convierte estas secuencias en sustratos de enzimas de reparación y roturas de doble cadena (DSBs, del inglés *double strands breaks*)<sup>41, 45</sup>, y por tanto, puntos calientes de recombinación en meiosis. Además de la t(11;22), se han caracterizado otras translocaciones mediadas por secuencias palindrómicas: t(15;22)(q26.1;q11.2); t(8;22)(q24.1;q11.2) y t(17;22)(q11;q11.2)<sup>45-47</sup>.

Otra translocación descrita con frecuencia implica a los cromosomas 4 y 8 [t(4;8)(p16;p23)], en la que los puntos de rotura coinciden con duplicaciones segmentarias, de modo que el mecanismo que genera el reordenamiento es la recombinación homóloga no alélica (NAHR, del inglés *non-allelic homologous recombination*)<sup>48</sup>.

En la tabla siguiente (tabla 1) se muestra un resumen de los principales estudios comparativos entre translocaciones presentes en individuos con fenotipo normal y alterado.

REFERENCIA	Nº TRANSLOCACIONES	FENOTIPO	MÉTODO	Nº CCR	DELECCIONES EN PUNTOS ROTURA	TAMAÑO DEL
Patsalis et al <sup>36</sup>	20	RM, abortos repetición	FISH subtel WCP	3/20	-	-
Astbury et al <sup>29</sup>	15	RM, dismorfias, anomalías cardíacas	FISH con BACs	-	9/15	0.8-15.3 Mb (15 a 70 genes)
Gibble et al <sup>24</sup>	10	RM, dismorfias, anomalías congénitas	Array BACs (1 Mb resolución)	6/10	3/10	1.1-6.2 Mb
Cicccone et al <sup>32</sup>	4	RM, anomalías congénitas	FISH, array BACs (1 Mb resolución)	4/4	3/4 (1 matema)	2-17.6 Mb
Bapista et al <sup>31</sup>	13	Normal, fertilidad reducida	Array BACs (1 Mb resolución)	0	0	-
Gajicka et al <sup>23</sup>	3 [(1:9)(p36;q34)]	Normal (hijos con monosomía 1p36 ó 9q34)	Tiling path región 1p36, secuenciación	0	1/3	5 pb
De Gregori et al <sup>33</sup>	41	27/41 alterado (RM, dismorfias, alteraciones cardíacas)	Array oligos Agilent (44K y 244K)	5/27	11/27	0.6-8.4 Mb
Bapista et al <sup>30</sup>	45	31 normal, 14 alterado (RM, dismorfias, alteraciones cardíacas)	Array BACs 1 Mb Array painting Tiling path Sanger 30K	0/31 normales 6/14 alterados	0/31 normales 4/14 alterados	0.17-2.5 Mb
Sismari et al <sup>37</sup>	12	RM, anomalías congénitas	Array BACs 1 Mb	3/12	2/12	~10 Mb
Fantes et al <sup>34</sup>	76	30 normal, 46 alterado (RM, dismorfias, alteraciones cardíacas)	Array BACs 1 Mb	0/30 normales 6/46 alterados	3/46	1.8-30 Mb
Gajicka et al <sup>49</sup>	4 [(1:22)(p36;q13)]	Normal (hijos con monosomía 1p36 ó 22q13)	Secuenciación	4/4	3/4	Del 9-38 pb Dup 23-337 pb Ins 2 pb

### 1.1.3.2 Reordenamientos cromosómicos no balanceados

En las alteraciones genéticas no balanceadas hay un cambio en la dotación genética, por pérdida o ganancia de material genético. Las alteraciones no balanceadas se presentan en casos con cromosomas marcadores, aneuploidías totales (alteraciones numéricas de uno o varios cromosomas), o parciales (duplicaciones, y deleciones).

Estas anomalías numéricas se generan por una mala segregación de los cromosomas durante la meiosis, un fenómeno conocido como **no disyunción**. Este fenómeno se debe a la migración de dos cromosomas o dos cromátidas al mismo polo celular, debido a que los dos miembros no se separan correctamente. En meiosis, la no disyunción genera gametos con un número anormal de cromosomas respecto al número haploide. Como se puede observar en la fig. 3, si la no disyunción se produce en meiosis I todos los cigotos resultantes (después de la fecundación con un gameto haploide normal) tienen alteraciones en el número de copias de los cromosomas: son monosómicos o trisómicos; mientras que cuando se genera en meiosis II la mitad de los cigotos posibles tienen dosis cromosómica normal, un 25% son triploides y el otro 25% son monosómicos.

## INTRODUCCIÓN

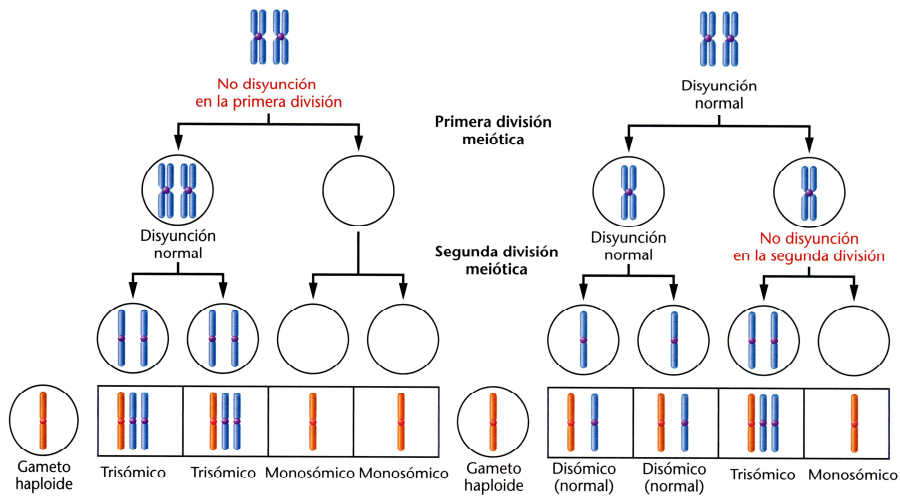
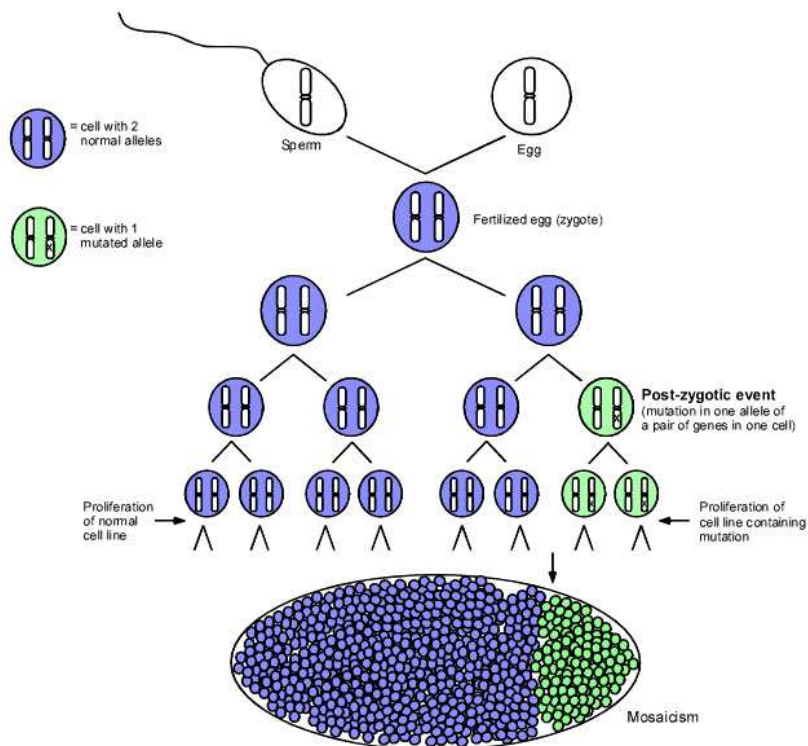


Fig. 3. Esquema de los resultados de no disyunción en meiosis I (izquierda) y meiosis II (derecha). Los gametos están representados por círculos y los cigotos por cuadrados.

La no disyunción en meiosis I implica que los cromosomas homólogos no se separan en la división celular, por tanto ambos migran a la misma célula, con lo que en el análisis de genotipos se observarán 2 alelos, uno de cada cromosoma homólogo. En cambio, cuando la no disyunción ocurre en meiosis II las dos cromátidas de un mismo cromosoma migran a la misma célula, de modo que sólo se observará un alelo (duplicado) en el análisis genotípico. Por tanto, la presencia de tres alelos diferentes en un *locus* (dos de un progenitor y uno de otro) es indicativa de que la duplicación se ha producido por una no disyunción en meiosis I en uno de los progenitores. En cambio, la presencia de dos alelos (con progenitores heterocigotos) en un *locus* con duplicación, en la que uno de los alelos está en doble dosis, sugiere que la no disyunción se ha producido en meiosis II <sup>25</sup>.



En el caso de que la no disyunción se produzca en mitosis, es decir, sea un evento postzigótico, la alteración se presentará en mosaico (presencia de al menos dos poblaciones celulares genéticamente distintas), ya que todas las células que se originen a partir de la alterada serán portadoras de la anomalía cromosómica, como se puede apreciar en la figura 4.



*Fig. 4. Representación de mosaicismo postzigótico, en el que se generan dos poblaciones celulares diferentes a partir del mismo cigoto.*

Los casos con mosaicismo de una trisomía generalmente se deben a un error por no disyunción en meiosis I o II, y posterior pérdida postzigótica del cromosoma extra (rescate trisómico)<sup>50-52</sup>. Este rescate puede generar UPD si los dos cromosomas que

## INTRODUCCIÓN

permanecen proceden del mismo progenitor. Otro mecanismo es el rescate monosómico, en el que se genera la endoreduplicación de un cromosoma cuando se produce fecundación de un gameto normal con uno nulisómico. Tal y como se ha mencionado previamente, la presencia de UPD puede implicar fenotipo alterado si afecta a un *locus* improntado o a un *locus* con una mutación recesiva. Los cromosomas descritos con impronta son 6, 7, 11, 14, 15 y 20<sup>53</sup>.

Las alteraciones fenotípicas en los casos de duplicaciones o microduplicaciones pueden ser debidas a la sobreexpresión de uno o varios genes contenidos en la región implicada (exceso de dosis); mientras que en los casos de delección puede haber una haploinsuficiencia o defecto de dosis. En ambos casos la dosificación diploide (dos copias) de estos genes es necesaria para un normal desarrollo, ya que sólo los genes sensibles a dosis serán los que serán afectados por una alteración de exceso o defecto.

En general los síndromes de microdelección/microduplicación recurrentes presentan un fenotipo bastante característico asociado a RM en casi todos los casos. Los síndromes de microdelección más frecuentes son, entre otros, Prader-Willi (OMIM #176270), Angelman (OMIM #105830), Delección 22q11 (CATCH 22) (OMIM #188400), y Williams-Beuren (7q11.23) (OMIM #194050). En la actualidad hay ~25 síndromes recurrentes de microdelección y microduplicación descritos<sup>54</sup>.

### 1.1.3.3 Cromosomas marcadores (SMC)

Los cromosomas marcadores de pequeño tamaño supernumerarios o sSMC (*supernumerary small marker chromosomes*) se definen como cromosomas estructuralmente anómalos que no pueden ser identificados por citogenética convencional únicamente, y que son, en general, más pequeños que un cromosoma 20 de la misma metafase<sup>55,56</sup>. La estructura de estos cromosomas incluye inversiones y duplicaciones (invdup), anillos y dobles diminutos. La prevalencia de los SMCs es aproximadamente 4,5/10000 recién nacidos, mientras que en estudios prenatales el porcentaje de detección es casi el doble (7,9/10000), más probablemente por la población sesgada de estudio (edad materna avanzada, abortos espontáneos previos, malformaciones fetales o fertilidad reducida). En pacientes con retraso en el desarrollo el porcentaje de sSMC se eleva a ~30/10000, similar al de casos prenatales con anomalías ecográficas (~20/10000). En cuanto al origen, se han descrito sSMC procedentes de todos los cromosomas, pero la mayoría (~30%) derivan del cromosoma 15, ~20% del cromosoma 22, y ~9% del cromosoma 12. El SMC más frecuente descrito es el invdup(15), que aparece en casi el 20% de casos descritos<sup>56</sup>. Hay cuatro síndromes específicos descritos asociados a la presencia de SMC<sup>55</sup>:

- Pallister-Killian: iso(12p)
- Isocromosoma 18p
- Cat-eye: iso(22q)
- Emanuel: der(22)t(11;22)(q23;q11.2)

## INTRODUCCIÓN

El 70% de los casos con SMC son *de novo*, y en la mayoría de los casos de origen materno, posiblemente debido al mayor impacto de la presencia de sSMCs en infertilidad masculina que sobre la femenina <sup>57</sup>. Los riesgos fenotípicos asociados a la presencia de un sSMC pueden originarse a causa de:

- Trisomía y/o tetrasomía parcial de la región génica contenida en el sSMC, dependiendo del contenido de eucromatina que presente el sSMC.
- Grado y localización del mosaicismo.
- Posible UPD de los cromosomas homólogos de los que deriva el sSMC.

En cuanto al contenido génico, el 97% de los sSMCs derivan de las regiones pericentroméricas, mientras que el resto está formado por regiones teloméricas con presencia de neocentrómeros <sup>58</sup>. El porcentaje de casos en los que los SMC tienen presencia en mosaico es del 70%. El mosaicismo puede variar dependiendo del tejido analizado, así, en un estudio realizado en 13 tejidos fetales diferentes de un feto portador de un sSMC, había variación en los porcentajes de mosaicismo: desde un 13% en células amnióticas hasta un 62% en células de músculo cardíaco. Por lo tanto, el resultado obtenido para un sSMC en mosaico no tiene por qué ser representativo de otros tejidos del paciente, con lo que la correlación clínica entre sSMC y fenotipo no es clara para los portadores de sSMC <sup>59</sup>. Asimismo, la presencia de mosaicismo críptico varía a lo largo de la vida del portador <sup>56</sup>.

Se ha descrito UPD para los cromosomas homólogos al SMC en 5-10% de los casos <sup>56</sup>. Hay varios mecanismos que pueden originar UPD en presencia de SMCs, como se representa en la figura siguiente:

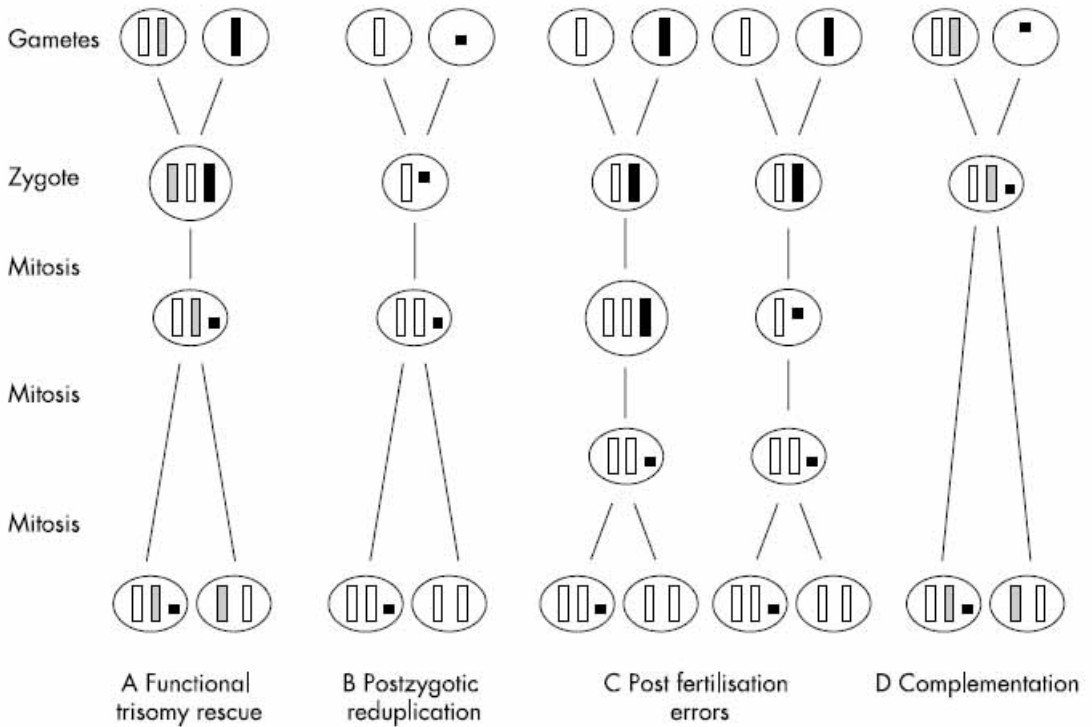


Fig. 5. Representación esquemática de los mecanismos de formación de UPD asociada a la presencia de SMC <sup>60</sup>.

- A: En el primer caso, se ha producido un rescate postzigótico a partir de una trisomía funcional, en la que se elimina uno de los cromosomas homólogos de un progenitor en un cigoto trisómico.
- B: Reduplicación postzigótica de uno de los cromosomas homólogos normales, en una fecundación de un gameto

## INTRODUCCIÓN

monosómico normal por un gameto que contiene el SMC, mecanismo equivalente al “rescate monosómico”.

- C: Errores post fecundación por no disyunción mitótica y posterior reducción del cromosoma homólogo, generando un SMC o viceversa, es decir, por reducción y generación de un SMC y posterior duplicación del otro cromosoma homólogo.
- D: Complementación, por fecundación de un gameto disómico a uno que sólo contenga el SMC <sup>60, 61</sup>

El riesgo de presentar anomalías fenotípicas cuando hay detección prenatal de un SMC varía dependiendo del origen del cromosoma marcador. Así, para los cromosomas 13, 14, 21 y 22 es de un ~7%, y de un 28% para el resto de los autosomas no acrocéntricos <sup>62</sup>. Posteriormente se ha redefinido el riesgo medio en un 26%; que se reduce hasta el 18% si los estudios ecográficos son normales <sup>63</sup>. Sin embargo, ~70% de los casos postnatales portadores de SMC presentan fenotipo normal <sup>56</sup>. En cuanto a SMC derivados del cromosoma 15, hay un riesgo de ~60% de anomalías fenotípicas, principalmente autismo, convulsiones, síndrome de Prader-Willi, y síndrome de Angelman. El cromosoma marcador más frecuente es el invdup(15), con una incidencia de 1:30000 recién nacidos. El fenotipo está causado por la tetrasomía de la región 15q11q13, que contiene la región crítica de síndrome Prader-Willi/Angelman (PWS/ASCR) <sup>64</sup>.

La base de datos más completa sobre SMCs, que contiene ~3.300 casos reportados (<http://www.med.uni-jena.de/fish/sSMC/00START.htm>), incluye información sobre el origen, contenido génico, grado de mosaicismo, anomalías fenotípicas, etc. <sup>56</sup>

## 1.2 Técnicas para la caracterización molecular de reordenamientos cromosómicos

Existen diferentes técnicas de citogenética y genética molecular basadas en la hibridación de secuencias homólogas de ADN con distinta resolución, como el FISH, la HGC, o el Southern Blot, además de técnicas de cuantificación, tanto absoluta como relativa, basadas en PCR, como son la PCR cuantitativa a tiempo real, MAPH o MLPA. A medida que se han ido desarrollando técnicas con un poder de resolución mayor se han podido detectar reordenamientos crípticos desequilibrados no detectables con las técnicas convencionales <sup>65</sup>.

### 1.2.1 FISH

El FISH (*Fluorescence in situ hybridization*) se basa en la hibridación homóloga de una secuencia marcada con fluorescencia (sonda) sobre una secuencia diana en una muestra celular o de tejido <sup>66</sup>. Dado que la sensibilidad de esta técnica (30-1000 Kb) es muy superior a la citogenética convencional, muchos síndromes originados por microdelección son diagnosticados directamente mediante FISH. El marcaje del ADN obtenido de diversos clones (BACs, PACs, cósmidos, fósmodos) permite estudiar cualquier región cromosómica, con lo que es muy útil en los casos en que una alteración está presente en bajo mosaicismo, así como para la validación de resultados obtenidos por otras técnicas, principalmente array CGH. También es una valiosa herramienta para localizar y clonar puntos de rotura de translocaciones cromosómicas, así como la presencia o no de una determinada región en un cromosoma marcador. La principal limitación del FISH

es que el estudio sólo permite obtener información sobre la sonda/s que se estén valorando.

### **1.2.2 Southern blot**

La técnica de Southern blot permite la detección específica de una secuencia (sonda) en el ADN de una muestra mediante hibridación complementaria y posterior detección de la presencia de la sonda. El ADN se fragmenta mediante digestión con un enzima de restricción, y se somete a electroforesis para separar por diferencia de tamaño. Este ADN se transfiere a una membrana por capilaridad, sobre la que se hibridará la sonda marcada. A continuación se puede detectar el patrón de hibridación de la sonda en la muestra del paciente y se compara con el patrón de una muestra control <sup>67</sup>. La aparición de patrones diferentes indica en qué fragmento está localizado el punto de rotura de una translocación, en este caso. La mayor limitación de la técnica está en el tamaño de los fragmentos de ADN que se pueden detectar, debido a la resolución de los geles de agarosa, así como el análisis restringido únicamente en los *loci* para los que se han diseñado las sondas.

### **1.2.3 Técnicas de cuantificación basadas en PCR**

#### **1.2.3.1 PCR cuantitativa a tiempo real**

La técnica de PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR, del inglés *real time-PCR*) permite monitorizar a tiempo real la cantidad de producto generado en cada ciclo de reacción de PCR gracias al uso moléculas fluorescentes, de modo que la cantidad de fluorescencia emitida es proporcional al número de amplicones



formados <sup>68, 69</sup>. Esta metodología se puede emplear para cuantificaciones relativas y/o absolutas de moléculas de ADN y ARN. Uno de los sistemas más usados es el fluorocromo *SYBR green I*, que se intercala entre el ADN de doble cadena <sup>70</sup>. A medida que se van generando productos de PCR la fluorescencia emitida aumenta, que se va registrando en forma de curva exponencial de amplificación. Esta técnica tiene una gran sensibilidad y especificidad, permitiendo detectar la presencia de moléculas de ADN a muy bajas concentraciones, siendo de gran utilidad por ejemplo en la detección y estudio de ADN fetal libre presente en plasma materno <sup>71</sup>. La PCR a tiempo real se ha empleado como técnica diagnóstica de variación en número de copias de regiones asociadas a síndromes de microdelección y microduplicación <sup>72-74</sup>. La principal limitación de la RT-PCR es la necesidad de tecnología específica para la detección de la emisión de fluorescencia, así como la valoración únicamente de las regiones para las que se han diseñado las sondas.

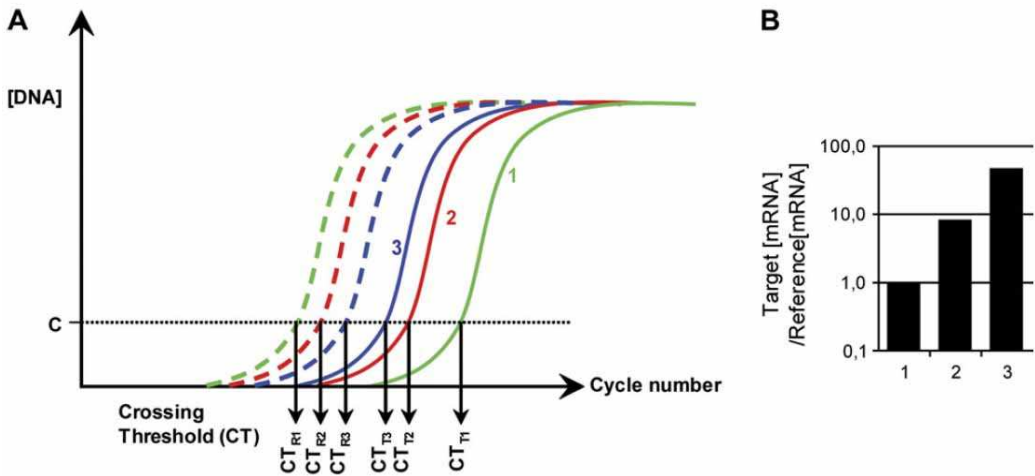


Fig. 6. A, representación de la intensidad de fluorescencia obtenida a tiempo real, en el que el valor umbral  $C_T$  se establece para cada muestra de ADN. B, Normalización de los datos obtenidos a partir de la RT-PCR, en la que se observa que las muestras con un valor de  $C_T$  menor tienen una concentración mayor<sup>75</sup>.

### 1.2.3.2 MAPH

La metodología MAPH (*Multiplex Amplifiable Probe Hybridization*) permite la determinación del número de copias en múltiples *loci* del genoma simultáneamente. Esta técnica está basada en la hibridación de secuencias específicamente diseñadas para un determinado *locus* del genoma (sondas), con un tamaño entre 100-500 pb. El procedimiento consiste en fijar ADN genómico previamente desnaturalizado a una membrana de nylon, donde se hibrida con la mezcla de sondas de interés (entre 30-50 generalmente). Todas las sondas poseen extremos iguales que se emplean como molde de unión a los cebadores para su amplificación mediante PCR. La cantidad de producto amplificado

refleja exactamente el número de copias de su locus correspondiente y resulta cuantificable <sup>76-78</sup>. Los productos amplificados se pueden visualizar en geles de poliacrilamida, o mediante electroforesis capilar, con lo que se puede cuantificar la cantidad de cada sonda.

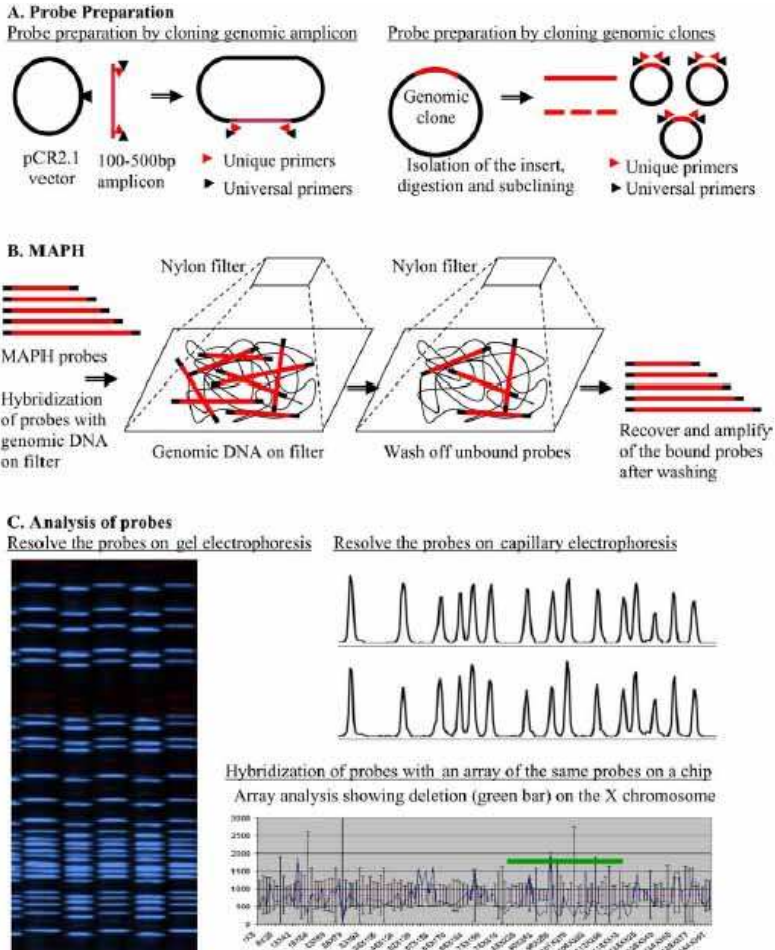


Fig. 7. Esquema de la tecnología de MAPH <sup>78</sup>.

### 1.2.3.3 MLPA

La técnica de MLPA (*Multiplex Ligation Probe-Dependent Amplification*) permite detectar variación en número de copias de varios *loci* simultáneamente. Se basa en la hibridación de una mezcla de sondas sobre *loci* de interés en una muestra de ADN genómico, de manera análoga a la técnica de MAPH <sup>79</sup>. Las sondas son oligonucleótidos compuestos por una secuencia homóloga al *locus* de interés unida a otra secuencia que sirve como molde para la unión de los cebadores. La peculiaridad de las sondas consiste en que están formadas por dos hemisondas, cada una homóloga a la parte proximal y distal del *locus* de interés, separadas por un solo nucleótido. Una vez se ha producido la hibridación, una ligasa unirá los extremos 3' y 5' de las hemisondas, y posteriormente las secuencias que tienen adheridas se usarán como sustrato para la unión de los cebadores en la reacción de PCR. A continuación las distintas secuencias se diferencian por separación mediante electroforesis capilar <sup>79</sup>.

La principal ventaja del MLPA es la reducción de costes y su aplicación a un gran número de muestras en el mismo experimento. Se puede usar para realizar un rastreo rápido de posibles aneuploidías en un gran número de muestras simultáneamente, así como para la validación de resultados obtenidos por otras metodologías, principalmente array CGH. Su limitación principal, al igual que el resto de técnicas basadas en la hibridación genómica comparada, es que no permite detectar alteraciones cromosómicas equilibradas, además de que el análisis se limita exclusivamente a las regiones para las que se han diseñado las sondas.

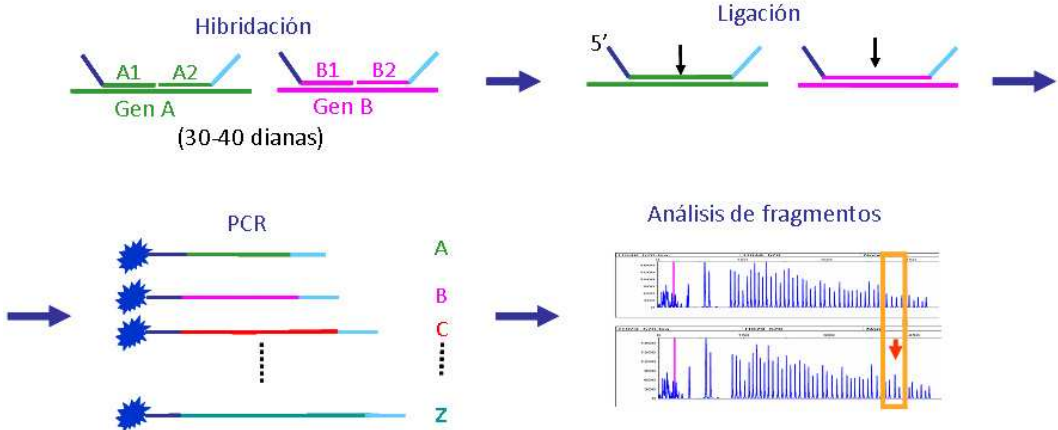


Fig. 8. Esquema de los principales pasos de la técnica de MLPA.

### 1.2.4 Hibridación genómica comparada

La hibridación genómica comparada (HGC, o CGH, del inglés *Comparative Genomic Hybridization*) es una técnica que permite la detección de desequilibrios cromosómicos abordando todos los cromosomas en un solo experimento <sup>80</sup>. Se basa en una hibridación competitiva entre dos ADN (muestra y control) que se marcan con dos fluorocromos diferentes y se hibridan sobre un soporte de metafases de un individuo control. El análisis posterior se realiza mediante un programa informático que cuantifica las intensidades de fluorescencia a lo largo de los cromosomas. El perfil de ratio de fluorescencia con valores entre 0.75 y 1.25 indica una cantidad relativa de ADN equivalente entre los ADN control y problema; mientras que ratios superiores a 1.25 o inferiores a 0.75 revelan una ganancia o pérdida en el ADN problema, respectivamente. La ventaja de esta técnica es que el material requerido es ADN y no necesita de células en división, pero su principal limitación es la resolución, ~5-10 Mb, dependiendo de la

calidad de los cromosomas de la preparación. La limitación principal es que no detecta alteraciones cromosómicas equilibradas, y para su interpretación se requiere conocimientos citogenéticos, ya que deben ordenarse los cromosomas mediante bandas DAPI.

### **1.2.5 Array CGH**

La técnica de array CGH se basa en el principio de hibridación competitiva de la HGC convencional, pero la hibridación se realiza sobre una matriz de sondas en lugar de sobre metafases <sup>81</sup>. La matriz puede estar formada por fragmentos de ADN de distinto tamaño (BACs, oligonucleótidos) o SNPs, y en general se depositan sobre soportes de vidrio (portaobjetos). La resolución entonces está determinada por la densidad (número) y tamaño de las secuencias fijadas en el portaobjetos. Actualmente el array CGH es el método más usado para la detección de variación de número de copias a gran escala. El rastreo de grandes cohortes de pacientes con retraso mental ha permitido la caracterización de nuevos síndromes de microdelección y microduplicación <sup>82</sup>. El diseño de los arrays puede ser específico y dirigido para cada experimento y patología, es decir, puede contener clones relacionados con un tipo de patología determinada, o localizados en regiones que presentan reordenamientos frecuentes (por ejemplo regiones subteloméricas o flanqueadas por duplicaciones segmentarias) <sup>83, 84</sup>. Los arrays de SNPs no utilizan el sistema de hibridación genómica comparada contra un control, sino que se realiza una cuantificación de intensidad de hibridación para cada oligosonda. Aunque no suponen realmente un array CGH, se les sigue llamando por ese nombre de manera genérica cuando el

estudio que se pretende es de número de copias. Presentan además la ventaja de poder analizar la heterocigosidad de los *loci*, y poder definir posibles regiones de pérdida de heterocigosidad (LOH) y UPD. El principal inconveniente del array CGH es el mismo que el de la CGH convencional, la no detección de reordenamientos equilibrados, así como tampoco proporciona información sobre la arquitectura de las alteraciones, es decir, su localización en el genoma. El nivel de mosaicismo que en general se puede detectar mediante arrays está alrededor del 20-30%.

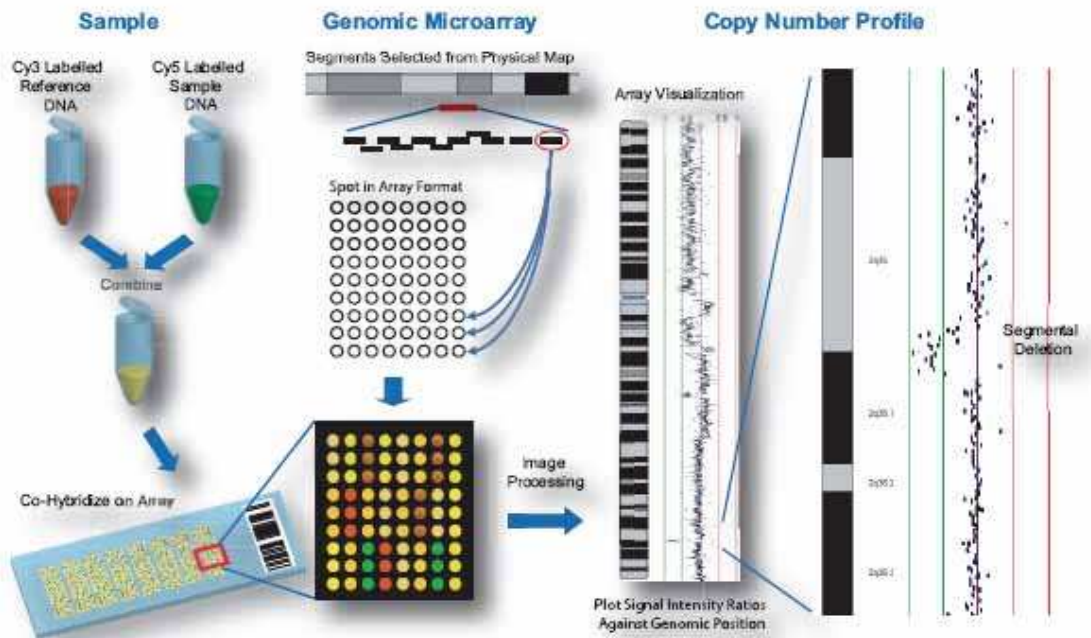


Fig. 9. Esquema de las principales etapas de las que consta la técnica de array CGH.

## **1.2.6 Microdissección**

La microdissección es un método que permite aislar pequeñas áreas de tejidos, células, cromosomas o incluso regiones cromosómicas mediante la separación física de estas pequeñas áreas de la superficie que las contiene. Hay dos técnicas principales:

- Microdissección manual mediante agujas.
- Microdissección láser (sistema PALM, PALM microbeam, Leica LMD6000).

### **1.2.6.1 Microdissección manual**

La microdissección manual con aguja permite aislar cromosomas enteros, brazos cromosómicos e incluso bandas <sup>38</sup>. Se realiza con un microscopio invertido conectado a un microposicionador, que permite desplazar y manipular una aguja sobre la muestra, de modo que se pueden separar físicamente los cromosomas de interés de la superficie de la extensión cromosómica <sup>85</sup>. Se puede aislar un solo cromosoma, lo que es muy útil sobre todo en los casos en los que el nivel de mosaicismo es especialmente bajo. Una de las principales limitaciones, además de la precisión y dificultad del manejo del microposicionador, es en ocasiones la identificación del cromosoma aberrante, y el limitado número de cromosomas obtenidos (normalmente inferior a 20 unidades).





*Fig.10. Izquierda: Microdisector manual, se observa en primer plano el mando (joystick) que permite desplazar el microposicionador que maneja la aguja. Derecha: Imagen previa a la transferencia de material desde la aguja (en la imagen en la parte superior) a la pipeta (en la zona izquierda).*

### **1.2.6.2 Microdissección láser**

En este caso el sistema consta de un microscopio invertido conectado a un láser controlado por ordenador. Para la microdissección láser se emplean unos cubreobjetos recubiertos de una fina membrana, la cual facilita la recuperación de la zona cortada e impide la contaminación de la muestra <sup>86</sup>. El cromosoma seleccionado se separa de la superficie de la extensión mediante impulso con el láser (*catapultado*), y se recoge en el tapón de un tubo de 1,5 ml. La principal ventaja sobre la microdissección manual es la rapidez con la que se aíslan los cromosomas, y por tanto el mayor número que se puede obtener (~200 unidades). Uno de las principales limitaciones de este método, además del coste del equipamiento láser, es la dificultad de identificar los cromosomas, ya que el patrón de bandas cambia mucho debido a la morfología de la membrana <sup>87</sup>. Las metafases deben estar muy extendidas, con los cromosomas muy separados para evitar contaminaciones

con el láser <sup>88</sup>. Hay trabajos que describen el aislamiento de cromosomas desde cubreobjetos sin membrana, de modo que el láser incide directamente sobre el cromosoma <sup>46</sup>.

### 1.2.7 Flow sorting

Esta técnica permite la distinción y separación de cromosomas mediante citometría de flujo. Se basa en el marcaje del ADN con dos fluorocromos:

- Cromomicina A3, que se intercala entre las regiones GC.
- Hoechst 33258, que se intercala entre las regiones AT.

Cada cromosoma produce una intensidad de fluorescencia, dependiendo del contenido de ADN (es decir, del tamaño del cromosoma), y de la composición de bases (contenido AT-GC). Por tanto, el programa del citómetro distribuye cada cromosoma en un área específica dependiendo de su composición. La distribución de todos los cromosomas de una muestra se denomina “cariotipo de flujo” (*flow karyotype*), como se puede apreciar en la siguiente figura: <sup>89</sup>

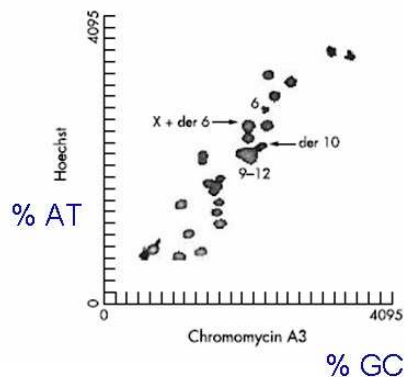


Fig. 11. Cariotipo de flujo en el que se puede apreciar la distribución de los cromosomas dependiendo de su tamaño y composición de bases <sup>90</sup>.

El citómetro de flujo o *sorter* tiene dos láseres que pueden diferenciar y separar una determinada población de cromosomas. Con esta técnica se puede aislar un gran número de cromosomas (10.000-300.000), dependiendo de las intensidades de fluorescencia que emita y de la concentración en la muestra de partida. Inicialmente las sondas de pintado cromosómico se generaron mediante aislamiento por *flow sorting* y posterior amplificación mediante DOP-PCR<sup>91</sup>. Esto permitió la generación de librerías de pintado cromosómico de varias especies (humano, ratón, cerdo, perro, etc).

Una de las limitaciones de esta técnica, además del elevado coste de infraestructura y puesta a punto, es que solamente se pueden aislar cromosomas enteros. En ocasiones es difícil diferenciar ciertos cromosomas derivados, debido a que su tamaño y composición de nucleótidos es muy similar a la de otros cromosomas, lo que complica su aislamiento.

En la siguiente tabla se ofrece una comparativa de las principales técnicas citogenéticas y moleculares empleadas para la caracterización de alteraciones cromosómicas.

TÉCNICAS	MUESTRA / CULTIVO (CELS. EN DIVISIÓN)	RESOLUCIÓN	DETECCIÓN TRANSLOCACIONES / INVERSIONES	DETECCIÓN SMC
CITOGENÉTICA CONVENCIONAL	Extensiones cromosómicas / Si	5-10 Mb	Si	Si
FISH	Extensiones cromosómicas / Si	~40-500 Kb	Si	Si
CGH	ADN / No	5-10 Mb	No	Si
ARRAY CGH BACs OLIGOS SNPs	ADN / No	>50 Kb ~10 Kb hasta 100 pb > 1 Kb	No	Si
PCR- Secuenciación	ADN / No	70 pb-25 Kb	Si	-
MLPA MAPH	ADN / No	1-200 pb	No	Si
SOUTHERN BLOT	ADN / No	0.5-25 Kb	Si	-
PCR cuantitativa	ADN / No ADNc / No	1-200 pb -	No Si	Si -
MICRODISSECCIÓN	Extensiones cromosómicas / Si	>3-5 Mb	Si	Si

Tabla 2. Comparación entre las principales técnicas citogenéticas y moleculares.

## **1.3 Estrategias de caracterización de puntos de rotura de reordenamientos**

### **1.3.1 Estrategia clásica**

La estrategia clásica de clonación de puntos de rotura implica una identificación aproximada de las bandas cromosómicas implicadas mediante cariotipo, posterior selección de diversos clones de BACs para FISH, e hibridación de diversas rondas de clones hasta encontrar una combinación que presente señal en ambos derivados (con lo que el clon estaría interrumpido por el punto de rotura). A continuación se rastrea la secuencia del clon que abarca el punto de rotura mediante Southern blot, comprobando sucesivamente pequeñas regiones (hasta ~20 Kb). La secuencia en la que el individuo portador del reordenamiento muestre un patrón distinto al de una muestra control será la que contenga el punto de rotura. Por último, se realiza un diseño de cebadores de PCR en ambos cromosomas, los cuales sólo amplificarán en el individuo portador de la translocación. Una vez obtenido un producto de PCR específico, mediante secuenciación y comparación con las bases de datos del genoma se confirmará la localización exacta del fragmento y la posible pérdida o no de material genético en los puntos de rotura<sup>28, 92-96</sup>. En el caso en que uno o ambos puntos de rotura interrumpan un gen, se pueden realizar estudios funcionales de sus niveles de expresión mediante Northern blot, PCR cuantitativa o Western blot para comprobar si existe un descenso de dosis o haploinsuficiencia.

### **1.3.2 Array painting**

En 2003 se describió una nueva estrategia de alto rendimiento denominada *array painting* <sup>89</sup>. Esta técnica se basa en el aislamiento de los cromosomas derivados por citometría de flujo y posterior análisis de su contenido génico por array CGH. Este método permite determinar la composición de los cromosomas aberrantes y los puntos de rotura de manera rápida con alta resolución. Mediante la comparación del patrón obtenido en el citómetro de muestras de individuos control y de casos portadores de translocaciones, los cromosomas derivados nuevos originados por la translocación tendrán un contenido de nucleótidos distinto al del resto de cromosomas, aunque su tamaño sea similar. Se puede entonces seleccionar y aislar una determinada población cromosómica, para analizarla en exclusiva mediante arrays. De este modo, en la hibridación sobre el array, sólo los clones correspondientes a secuencias presentes en los cromosomas derivados mostrarán fluorescencia por encima del ruido de fondo (*background*), y en el caso de que un clon abarque el punto de rotura los ratios del array serán intermedios. En este trabajo se emplearon dos sistemas de amplificación: *Degenerate Oligonucleotide Primers* para PCR (DOP-PCR) <sup>97</sup> partiendo de ~500 cromosomas, y Genomiphi <sup>98</sup> a partir de ~250.000 cromosomas. Posteriormente, el mismo grupo desarrolló una nueva tecnología en la que se incrementaba la resolución de los arrays de BACs mediante el diseño a medida de arrays de oligonucleótidos (45-77 pb) de alta densidad que incluyan la región con el punto de rotura predicho por el array de BACs <sup>90</sup>. Con esta tecnología se puede clonar el punto de rotura con tan sólo 2 hibridaciones: en la primera se definen los BACs que abarquen los

puntos de rotura en ambos cromosomas derivativos, y la segunda hibridación se realiza sobre un array de oligonucleótidos diseñado a medida exclusivamente para las regiones determinadas por la primera hibridación.

Una variante de esta técnica es el *array painting* aislando los cromosomas mediante microdissección manual con aguja en lugar de microdissección láser<sup>38, 88</sup>. En este caso el número de cromosomas aislados es muy inferior, debido a las características de la técnica, pero permite obtener fragmentos más pequeños, facilitando incluso el análisis de bandas cromosómicas.

### **1.3.3 Ultrasecuenciación: Paired end mapping**

Para la secuenciación masiva de ADN existen tres plataformas en la actualidad: Roche 454 FLX, Illumina/Solexa Genome Analyzer y Applied Biosystems SOLID™ System. En todas ellas la muestra de ADN se fragmenta y se secuencian los extremos de los segmentos, comparándolos con un genoma de referencia para establecer su localización<sup>99-101</sup>.

En la siguiente tabla se muestra un resumen comparativo de los métodos de ultrasecuenciación<sup>101</sup>:

## INTRODUCCIÓN

	Roche 454	Illumina / Solexa	SOLID (Applied Biosystems)
Método secuenciación	Pirosecuenciación	Síntesis por polimerasa	Secuenciación basada en ligación
Amplificación	PCR emulsión	Amplificación por "puentes"	PCR emulsión
<i>Paired ends</i> / separación	Si / 3 Kb	Si / 200-400 pb	Si / 3 Kb
Mb / run	100 Mb	1300 Mb	3000 Mb
Tiempo /run (paired ends)	7 h	4 días	5 días
Tamaño lecturas	250 pb	32-40 pb	35 pb
Coste por run	~8000 \$	~9000 \$	~17000 \$
Coste por Mb	~80 \$	~5.5 \$	~5.5 \$

*Tabla 3. Comparativa de las diferentes técnicas actuales de secuenciación masiva.*

El sistema de Illumina/Solexa se basa en la secuenciación masiva de millones de fragmentos (*reads*) unidos a adaptadores diferentes en cada extremo (*paired-end sequencing*). El tamaño de los fragmentos está determinado por el método de fragmentación (nebulización o digestión con enzimas de restricción). En ambos casos, el ADN fragmentado se migra en un gel de agarosa y se selecciona por tamaño, separando el rango de interés. En un solo experimento se pueden llegar a obtener ~30 millones de secuencias cortas <sup>102</sup>. Se generan millones de fragmentos de ADN de hasta 500 pb, que se unen a adaptadores, de modo que se puede determinar la orientación de un determinado fragmento. Las lecturas de secuenciación se realizan para ~36 pb de cada extremo, suficientes para localizar en el genoma su posición <sup>103</sup>.

Se han descrito diversas aplicaciones de estas tecnologías de ultrasecuenciación para identificar reordenamientos cromosómicos



(translocaciones e inversiones) tanto en muestras tumorales <sup>103</sup> como en muestras constitucionales <sup>102</sup>. En ambos trabajos la tecnología empleada fue el sistema Illumina/Solexa. En el caso de las translocaciones presentes en muestras constitucionales, la ultrasecuenciación se realizó a partir de los cromosomas aberrantes aislados por citometría de flujo, amplificados posteriormente mediante la técnica de Genomiphi. A partir de los datos de la secuenciación se identificaron los puntos de rotura en un intervalo de ~1000 pb, lo que permitió diseñar cebadores para amplificar directamente el fragmento mediante PCR y determinar la secuencia por secuenciación directa <sup>102</sup>.

## **1.4 Enfermedades modelo**

En esta tesis hemos estudiado distintos modelos de patología para la identificación de genes asociados a enfermedad. Las enfermedades con las que hemos trabajado responden a distintos modelos: multifactoriales y aisladas. A continuación se muestra un pequeño resumen de los principales rasgos fenotípicos de cada uno de estos modelos de enfermedad.

### **1.4.1 Síndromes dismórficos**

La dismorfología es el estudio de la estructura física en pacientes con anomalías de desarrollo, que se pueden manifestar como alteraciones aisladas o como síndromes polimalformativos. Las alteraciones aisladas o defectos únicos primarios son alteraciones del desarrollo que se pueden clasificar en cuatro categorías:

- **Malformación:** defecto morfogénico aislado. Es un defecto estructural originado por un error primario en morfogénesis.
- **Deformación:** resultado de un efecto mecánico sin defecto morfogénico de base.
- **Disrupción:** resultado de una destrucción de una estructura que se había desarrollado correctamente.
- **Displasia:** organización tisular anormal por fallo en las señales de formación.

En la consulta de genética es fundamental realizar una historia clínica y un detallado examen físico. En este examen se realizan mediciones de talla, peso, corporales, faciales y craneales, las cuales se comparan con las curvas estándar ajustadas a sexo, edad y grupo étnico. Recientemente se han publicado unas

recomendaciones de cómo describir los elementos de la dismorfología para que exista un consenso internacional en las definiciones y nomenclatura de las variaciones fenotípicas, de modo que se establezca una estandarización de los términos empleados <sup>104</sup>. Uno de los objetivos es facilitar la comparación entre distintos pacientes <sup>105-110</sup>.

Las variaciones encontradas en este examen físico se pueden clasificar como:

- Defectos mayores, que requieren tratamiento debido a defectos funcionales o estéticos.
- Defectos menores, para los que no se requiere tratamiento pero sirven como marcador de anomalía en el desarrollo embrionario.
- Variante familiar, serían defectos menores comparados con la población general, pero son característicos de un grupo familiar.

Aunque todas las personas tenemos anomalías menores aisladas sin relevancia clínica en general, la existencia de anomalías mayores y/o varios defectos menores en un individuo define la existencia de problemas de desarrollo. Así se han definido numerosos síndromes dismórficos que asocian diversas anomalías y existen muchos pacientes que coloquialmente se denominan *sindrómicos* por presentar estas alteraciones múltiples del desarrollo. La causa de los cuadros sindrómicos y de las múltiples anomalías del desarrollo en cualquier paciente es probablemente genética, pero todavía es desconocida en muchos casos. Además, en la práctica clínica siempre se presentarán casos únicos con

patrones de anomalías que no han sido reconocidos previamente y que precisan estudio para descubrir la causa.

### **1.4.2 Retraso mental**

El retraso mental (RM) se define como una discapacidad intelectual que se manifiesta antes de los dieciocho años, y está caracterizada por un funcionamiento intelectual inferior a la media y limitaciones significativas en dos o más de las siguientes habilidades adaptativas: comunicación, cuidado personal, vida doméstica, habilidades sociales/interpersonales, uso de recursos comunitarios, autocontrol, habilidades académicas funcionales, salud, seguridad, ocio y trabajo <sup>111</sup>. Según la Clasificación Internacional de Enfermedades, existe un retraso mental cuando el coeficiente intelectual (CI) de un individuo es inferior o igual a 70. El CI es un test cognitivo estandarizado que permite establecer una clasificación de los distintos grados de retraso mental, es decir, RM leve con valores de CI en el rango 50-70, RM moderado con CI entre 35-49, RM grave con CI entre 20-34, y RM profundo con CI inferior a 20 <sup>112, 113</sup>.

El RM afecta aproximadamente a 1-3% de la población general, con un ratio varones: hembras de ~1.5:1, principalmente debido a RM ligado al cromosoma X. Dada la hemicigosidad del cromosoma X en varones, la presencia de una mutación recesiva condicionaría la aparición de una posible enfermedad. Etiológicamente, ~50% de los retrasos se deben a causas desconocidas, ~16% son de origen genético y el 34% restante se adquieren en etapas pre, peri o postnatales <sup>114-116</sup>.

En la base de datos Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) hay registrados actualmente >1500 síndromes y/o trastornos neurológicos asociados a RM que están causados por alteraciones en un único gen. Este número se incrementa a medida que se desarrollan nuevas técnicas de caracterización molecular y se aplican a nuevos pacientes, pero todavía hay muchos pacientes sin una correlación causal clara.

### **1.4.3 Trastorno específico del lenguaje**

El trastorno específico del lenguaje (TEL) es un trastorno del desarrollo que se manifiesta como un retraso importante en la aparición del lenguaje expresivo junto con escasas habilidades de lenguaje receptivo, en ausencia de causas conocidas como problemas auditivos, déficit neurológico o falta de oportunidad de aprendizaje (OMIM #602081). Para establecer un diagnóstico de TEL el patrón de desarrollo lento de lenguaje hablado debe persistir durante los años preescolares sin problemas auditivos asociados ni trastornos globales del desarrollo, incluidos los trastornos del espectro autista y el RM. La prevalencia aproximada de los TEL es de un 6-8% en edad preescolar <sup>117</sup>. Estudios de concordancia en gemelos y de agregación familiar indican que existe una alta heredabilidad, y una mayor concordancia entre gemelos monocigóticos que entre gemelos dicigóticos <sup>118</sup>. Salvo el ejemplo de la familia KE, en la que hay una cosegregación de TEL con patrón de herencia autosómica dominante a lo largo de tres generaciones, asociado a la disrupción del gen *FOXP2* <sup>21</sup>, en general se acepta que la herencia de TEL es compleja y multifactorial, con varios genes implicados que interactúan

aumentando la susceptibilidad <sup>119</sup>. Hay un gran número de pacientes con fenotipo de TEL sin correlación molecular clara con un gen/genes responsable, de modo que aún quedan muchos genes por estudiar en relación a este trastorno.

### **1.4.4 Hipogonadismo hipogonadotrópico**

El hipogonadismo hipogonadotrópico está causado por una deficiencia hormonal en el eje hipotálamo-hipófisis, en el que hay una disminución en la secreción pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) en el hipotálamo, lo que implica un descenso en la liberación de las hormonas luteinizante (LH) y foliculoestimulante (FSH) por parte de la hipófisis. Estas hormonas son las responsables de la estimulación de las gónadas masculinas y femeninas (testículos y ovarios) para la secreción de hormonas sexuales responsables del desarrollo sexual normal durante la pubertad. Los síntomas, por tanto, se detectan en ausencia de desarrollo de caracteres sexuales secundarios: vello púbico, axilar y facial; testículos subdesarrollados, etc. En los varones, la hormona LH estimula las células de Leydig para aumentar la producción de testosterona, que a su vez estimula la espermatogénesis. La hormona FSH es determinante en la maduración de las células germinales, e induce a las células de Sertoli la secreción de inhibina, inhibiendo la espermatogénesis.

Hay varios síndromes asociados al hipogonadismo hipogonadotrópico, entre ellos el síndrome de Kallman, así como nueve genes descritos cuyas mutaciones están asociadas a hipogonadismo hipogonadotrópico aislado (OMIM #146110), pero aún así hay pacientes con este fenotipo sin una correlación

molecular definida, candidatos por tanto a estudio citogenético y molecular.

### 1.4.5 Síndromes mielodisplásicos

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) son trastornos hematopoyéticos clonales que implican la displasia de las líneas mieloide, megacariocítica y/o eritroide. En aproximadamente un 30% de los casos hay una evolución a leucemia aguda mieloide (LAM), con mal pronóstico, en la que la mayoría de pacientes fallece debido a fallos en la médula ósea <sup>120</sup>. El estudio del cariotipo y FISH en médula ósea permite la identificación de alteraciones cromosómicas en aproximadamente un 50% de los pacientes, siendo las más frecuentes: 5q-, 7q- y monosomía 7, trisomía 8 y 20q-. El resultado citogenético aporta información de valor pronóstico muy relevante. En el año 1.997 el grupo Internacional de Estudio de los SMD propuso una puntuación denominado *Score IPSS* <sup>121</sup>, en el que se tiene en cuenta el porcentaje de blastos en medula ósea, el grado de citopenias y el cariotipo. Tienen buen pronóstico los pacientes con las alteraciones 5q-, 20q- o pérdida del cromosoma Y como única anomalía, y pacientes con cariotipo normal. En cambio, el pronóstico es desfavorable para pacientes con anomalías del cromosoma 7 y tres o más alteraciones citogenéticas (cariotipo complejo); y pronóstico intermedio para el resto de alteraciones citogenéticas. Se han descrito varios genes cuyas mutaciones y/o haploinsuficiencia han sido asociadas a SMD: *TP53*, *FLT3*, *RUNX1* (*AML1*) y *RPS14* (en pacientes con delección 5q). Recientemente se han descrito mutaciones, deleciones y pérdida de heterocigosidad (LOH) por disomía uniparental del cromosoma 4

## INTRODUCCIÓN

(UPD4) que afectan al gen *TET2* (localizado en 4q24) en 10-20% de pacientes con SMD, por lo que se considera un nuevo gen supresor de tumores <sup>122-127</sup>. Para LAM secundaria están descritas entre un 24-42% de mutaciones del gen *TET2* <sup>124, 126</sup>. Este gen tiene expresión ubicua, con un aumento entre 10 y 100 veces en células hematológicas, en concreto en granulocitos <sup>123</sup>. Los estudios descritos en la literatura sugieren que este gen está implicado en la regulación de la hematopoyesis mieloide, en especial en la supervivencia, crecimiento y diferenciación <sup>123, 124</sup>.



## 1.5 Consejo genético

La genética tiene una relevancia creciente en la atención sanitaria. El consejo genético se define (según el comité de la Sociedad Americana de Consejeros Genéticos, *National Society of Genetic Counsellors*) como: “Proceso a través del cual se ayuda a las personas a entender y adaptar las implicaciones médicas, psicológicas y familiares de las contribuciones genéticas a la enfermedad”<sup>128</sup>. Desde el punto de vista legal, el consejo genético es un procedimiento destinado a informar a una persona sobre las posibles consecuencias para él o su descendencia de los resultados de un análisis o cribado genético, sus ventajas y riesgos y, el asesoramiento de las posibles alternativas derivadas del análisis. Este consejo debería tener lugar antes y después de una prueba o cribados genéticos e incluso en ausencia de los mismos.

El proceso de consejo genético debe integrar:

- Interpretación de la historia médica y familiar de la enfermedad para conocer la probabilidad de aparición y recurrencia.
- Educación sobre herencia, pruebas, manejo, prevención, recursos e investigación.
- Consejo promoviendo elecciones con información y adaptación al riesgo de la enfermedad.

El consejo genético consta de una entrevista mediante la cual un profesional especializado informa a los individuos y las familias con una enfermedad genética, o riesgo de padecerla, de todo lo relativo a la patología, el riesgo de recurrencia y el tratamiento para que puedan tomar decisiones reproductivas con la máxima

## INTRODUCCIÓN

información y conocimiento. Uno de los objetivos del establecimiento de un correcto diagnóstico médico es el manejo clínico del paciente, así como poder ofrecer un correcto consejo genético, con asesoramiento reproductivo a las familias de pacientes afectados por enfermedades genéticas.

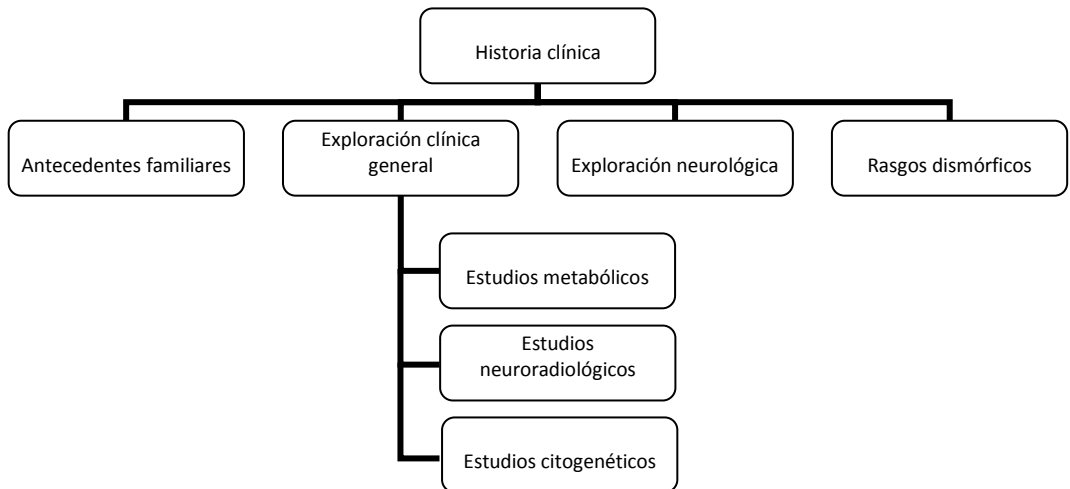
La gran evolución en los últimos años de la tecnología molecular aplicable al diagnóstico y tratamiento de las enfermedades genéticas ha condicionado una evolución desproporcionada de la Genética con respecto a otras especialidades médicas. En la actualidad se pueden diagnosticar más de 2000 enfermedades genéticas por diversas metodologías citogenéticas y moleculares, lo que implica un cambio importante en las posibilidades de atención y seguimiento de estos pacientes, así como una creciente responsabilidad por parte de los profesionales de la sanidad en la transmisión de esta información, la cual se sustenta en parte sobre la indicación e interpretación de las pruebas genéticas. En España, únicamente la comunidad autónoma de Andalucía tiene una ley reguladora del consejo genético, de protección de los derechos de las personas que se sometan a análisis genéticos y de los bancos de ADN (Ley 11/2007, del 26 de noviembre).

Los avances en la genética han aumentado los dilemas y problemas éticos en este ámbito, donde rigen los tres principios básicos de la ética médica:

- Beneficencia, es decir, hacer bien al paciente;
- Respeto por la autonomía personal, lo que implica salvaguardar los derechos del individuo para que pueda controlar el manejo de la enfermedad sin ser presionado;

- Justicia, es decir, asegurar que los individuos son tratados de forma justa y equitativa <sup>129</sup>.

En el siguiente diagrama se muestran los principales aspectos a valorar en el estudio genético <sup>16, 17</sup>:



*Fig. 12. Diagrama de flujo con los principales aspectos a realizar del estudio genético.*

En general, las indicaciones para hacer un análisis citogenético son:

- Retraso mental (RM) y/o presencia de anomalías mayores (cardiopatías, malformaciones del tracto genito-urinario o cerebrales) o varias anomalías menores o rasgos dismórficos.
- Retraso psicomotor, problemas de aprendizaje, trastornos de crecimiento.
- Historia familiar de posible alteración cromosómica.

## INTRODUCCIÓN

- Antecedentes de cromosomopatía balanceada en un progenitor.
- Sospecha de síndromes cromosómicos clínicamente reconocibles.
- Dificultad reproductiva (infertilidad, abortos de repetición).

Como se ha visto a lo largo de la introducción, las anomalías citogenéticas son una valiosa fuente para estudio e identificación de nuevos genes asociados a fenotipo.

## **2. HIPÓTESIS**



- Existe probablemente una relación causal entre muchas alteraciones citogenéticas y las anomalías fenotípicas observadas en los pacientes con anomalías del desarrollo, específicamente en los casos estudiados en este trabajo.
- La aplicación de nuevas tecnologías moleculares permite definir con más precisión los reordenamientos genómicos que presenten estos pacientes, facilitando la identificación de genes candidatos o causales del fenotipo.
- La caracterización citogenética y molecular de las alteraciones permite ofrecer un diagnóstico ajustado a los pacientes, establecer correlaciones clínico-moleculares y proporcionar consejo genético y asesoramiento reproductivo más adecuado a las familias.





### **3. OBJETIVOS**



- Caracterización detallada de diversos reordenamientos cromosómicos en individuos con enfermedades y cuadros sindrómicos y establecimiento de asociaciones genotipo-fenotipo.
- Identificación de genes cuya expresión / función se puede ver afectada por los reordenamientos.
- Optimización, aplicación y comparación de eficiencia de diversas tecnologías encaminadas a la identificación / caracterización de puntos de rotura en reordenamientos cromosómicos.
- Utilización de la información generada para aplicaciones clínicas que incluyen el diagnóstico de probandos y familiares, el pronóstico y seguimiento de los pacientes y el asesoramiento genético y reproductivo de las familias.



## **4. MATERIAL Y METODOS**



## **4.1 Pacientes estudiados**

### **4.1.1. Anomalías no balanceadas Cromosomas marcadores**

#### **4.1.1.1 R60. Marcador 1 [SMC(6)]**

El paciente es el primer hijo de una pareja no consanguínea sin antecedentes de interés. La madre, de 36 años, tuvo un embarazo de curso normal y parto eutócico. El peso y talla al nacer estaban en el p50. Al nacer se observó un perímetro cefálico de 32,5 cm, (p10), braquicefalia, plagiocefalia occipital asimétrica, fontanela mayor no palpable, y suturas con signos de fusión prematura. La presencia de craneosinostosis incipiente global fue confirmada en la RX de cráneo. Presentaba asimismo una mínima hipoplasia ungueal. El desarrollo psicomotor del paciente fue normal hasta los 10 meses de vida.

En su última evaluación, a los 2 años y 8 meses, tenía una altura de 93 cm (p50), peso 15.1 Kg (p75-90) y perímetro cefálico 46 cm (<p3, -3.5 SD). Presentaba microcefalia significativa, hipoplasia mediofacial, retraso en la dentición y alteraciones pigmentarias siguiendo las líneas de Blasko en varias áreas corporales (signo indicativo de mosaicismo). El desarrollo psicomotor estuvo levemente retrasado con un desarrollo global de 2 años y 3 meses a la edad cronológica de 2 años y 10 meses. Tenía un comportamiento hiperactivo y retraso del lenguaje, que sugirieron un diagnóstico de trastorno de atención e hiperactividad (TDAH). Se le realizó un análisis de tomografía computerizada craneal a los 2 años, que detectó una reducción en el volumen cerebral pero sin anomalías cerebrales específicas. El cariotipo prenatal y neonatal

fue 47,XY,+mar[13]/46,XY[7]. Los cariotipos de sus padres fueron normales.

#### **4.1.1.2 ADN1000. Marcador 2 [SMC(10)].**

El paciente es el primer hijo de una pareja sana y no consanguínea. No hay antecedentes familiares de retraso mental u otras anomalías congénitas. En la ecografía de 2º trimestre se observó labio leporino y comunicación interventricular (CIV), y sospecha de comunicación interauricular y asimetría de grandes vasos, por lo que se realizó una amniocentesis. El cariotipo prenatal fue 47,XY,+mar[76]/46,XY[24], con presencia de un cromosoma marcador *de novo* en mosaico. Pese al hallazgo ecográfico y la presencia de un cromosoma extra en mosaico la pareja decidió continuar con la gestación. En la última ecografía se apreció oligoamnios severo, de modo que se indujo el parto a las 38 semanas de gestación. El peso al nacimiento fue de 2850 g (p3), talla 48 cm (p25) y circunferencia cefálica 32.5 cm (p3). A las 48 horas sufrió estrés respiratorio. En la ecocardiografía se observó CIV subaórtica, hipoplasia de arco aórtico con coartación de aorta y mala contractibilidad biventricular. Se realizó cirugía cardiaca a los 7 días. La ecografía transfontanelar, EEG post cirugía, ecografía abdominal y exploración oftalmológica fueron todas normales. En la exploración física destacó la presencia de: hendiduras palpebrales alargadas (+2dS) con oblicuidad ascendente, hipertelorismo (+2dS), escleras azuladas, hendidura de paladar posterior completa y hendidura labial izquierda, narinas amplias y mínima fosita preauricular izquierda. En la última evaluación el paciente tenía 9 meses y presentaba un desarrollo psicomotor, de crecimiento y desarrollo normal, así como conducta



alimentaria y de sueño, sin presentar otras patologías asociadas hasta el momento.

#### **4.1.1.3 R564. Marcadores 3 [SMC(10)+SMC(14)].**

El paciente es el primer hijo de una pareja sana y no consanguínea, sin antecedentes familiares destacables. Las ecografías prenatales fueron normales. El resultado del triple cribado fue de alto riesgo, por lo que se realizó amniocentesis. El cariotipo prenatal fue 49,XY,+mar1,+mar2,+mar3[9]/48,XY,+mar1,+mar2[20]/47,XY,+mar1[36], con cariotipos parentales normales. La pareja decidió seguir con la gestación en ausencia de hallazgos ecográficos. En la semana 31.5 comenzó dinámica uterina, que no consiguió frenarse con tratamiento tocolítico. El parto fue eutócico, con peso de 1430 g (p3-p25), talla 43 cm (p75) y perímetro cefálico 28 cm (p25-p50). El paciente necesitó soporte respiratorio con CPAP debido al distrés respiratorio, así como fototerapia por ictericia no isoimmune. Durante su estancia en la Unidad Neonatal se valoraron: ecografía transfontanelar, que reveló aumento de la ecogenicidad periventricular bilateral en la región frontal, que posteriormente desapareció en las ecografías de control; asimetría de ambos ventrículos laterales, a favor del ventrículo lateral izquierdo, más marcado en el asta occipital (una variante de la normalidad); radiografía de tórax que resultó normal; tránsito gastro-esófago-duodenal, con leve incoordinación deglutoria y reflujo gastro-esofágico moderado; ecocardiografía, con presencia de estenosis de rama pulmonar izquierda. El resto de observaciones fueron normales, así como el estudio de fondo de ojo, con polo posterior normal.

Como rasgos dismórficos al nacimiento el paciente tenía puente nasal deprimido, narinas antevertidas, y orejas simples y algo desplegadas, sin otras características a destacar. El paciente tenía 15 meses en la última evaluación y presentaba un correcto desarrollo pondoestatural y psicomotor, así como conducta alimentaria y de sueño, sin presentar otras patologías asociadas hasta el momento.

### **4.1.1.4 R535. Marcador 4 [SMC(7)].**

Este paciente es el primer hijo de una pareja no consanguínea. La gestación fue fruto de una fecundación in vitro (FIV) con óvulos de donante por fallo ovárico. En la semana 26 de gestación se detectó doppler alterado. A las 30 semanas se apreció retraso de crecimiento intrauterino por lo que se decidió maduración fetal y cesárea. El peso al nacimiento fue 1010 g, talla 41 cm, perímetro cefálico (PC) 28 cm, con buen estado general. La ecografía craneal fue normal. El EEG reveló paroxismos focales en la región temporal derecha. En la ecografía cerebral se observó aumento de la región periventricular que no se observó en un control posterior. En la exploración del fondo de ojo se apreció una vascularización incompleta sin signos de retinopatía.

A los 4 meses tenía un crecimiento correcto con desproporción cefálica (PC 41.8 cm, >p50). En la exploración fenotípica se apreciaron angioma frontal y palpebral, raíz nasal ancha y anteversión nasal, ligera blefarofimosis palpebral, orejas pequeñas y de implantación baja. Se observó un retraso motor, pendiente de control neurológico. El cariotipo prenatal del líquido amniótico era 47,XY,+mar, mientras que el postnatal en SP fue 47,XY,+mar[65]/46,XY[20]. El cariotipo paterno fue normal, sin

embargo no hay disponible muestra materna por haber sido una concepción a partir de donación de óvulos.

#### **4.1.1.5 Marcador 5. [i(13)(p10) ó i(21)(p10)]**

Este caso es la primera hija de una pareja sana, no consanguínea, sin antecedentes de interés. Se realizó amniocentesis por indicación de edad materna, detectándose la presencia de un cromosoma marcador en un cultivo de líquido amniótico de una gestación sin antecedentes conocidos (47,XX,+mar). Posteriormente se comprobó la presencia de un marcador con la misma morfología en el cariotipo materno (47,XX,+mar). En un segundo embarazo se detectó también la presencia del cromosoma extra en el estudio de líquido amniótico (47,XY,+mar).

### **4.1.2 Anomalías balanceadas Translocaciones recíprocas**

#### **4.1.2.1 Translocación 1. 46,XX,t(9;11)(q34;p11.2).**

Esta paciente es una niña de 9 años, fruto de una tercera gestación de una pareja sana y no consanguínea y sin historia de antecedentes familiares relevantes. Durante los primeros años de vida se observó un cierto retraso psicomotor caracterizado por una deambulación tardía (a los 18 meses) y un evidente retraso en la adquisición del lenguaje. El trastorno del habla no asociado a ninguna otra anomalía estructural del sistema nervioso central ha requerido de manera continuada un apoyo logopédico exhaustivo. La valoración clínica detallada mostró una curva de crecimiento (peso, talla y perímetro cefálico) adecuado para la edad y la

## MATERIAL Y MÉTODOS

presencia de varias anomalías menores asociadas: estrechamiento bitemporal, disminución de la distancia intercantal o hipotelorismo (rasgo probablemente familiar), pestañas pobladas y largas, párpados superiores gruesos con ptosis del izquierdo, paladar ojival sin anomalías estructurales del mismo, cierta laxitud articular, clinodactilia bilateral, persistencia de almohadillas fetales en todos los pulpejos, discreto aumento de la distancia intermamilar e inversión de los pezones.

El test psicológico de la Escala de Inteligencia de Weschsler para Niños -Revisada (WISC-R) tiene varios apartados, referidos a las escalas verbales y manipulativas. La paciente obtuvo resultados muy dispares en dichas áreas, lo que indica la presencia de una asimetría mental con déficit en las áreas verbales, mientras que mantiene *pícos* (puntuaciones o valores normales) en las áreas manipulativas. Esta asimetría es indicativa de la presencia de una anomalía o trastorno genético.

Asimetría mental con déficits en las áreas verbales, mientras que mantiene "picos" (puntuaciones o valores normales) en áreas manipulativas.

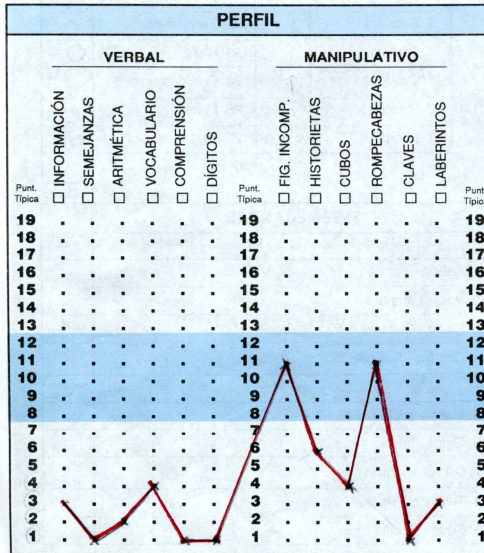
Nº 215



**Escala de Inteligencia de Wechsler para Niños - Revisada**

CUADERNILLO DE ANOTACION Y PERFIL

Nombre y apellidos ..... Sexo M  
 Actividad ..... Curso 1º Centro .....  
 Residencia habitual ..... Lugar de nacimiento 20/12/1995  
 Examinado por Dr. Fernández (10 años)



<b>CÁLCULO EDAD:</b>	Año	Mes	Día
Fecha del examen	2006	03	22
Fecha de nacimiento	1995	12	20
Edad	10 años, 3 meses		

RESUMEN DE PUNTUACIONES		
PRUEBAS VERBALES	Puntuación Directa	Puntuación Típica
X Información	6	3
X Semejanzas	1	1
X Aritmética	7	2
X Vocabulario	15	4
X Comprensión	7	1
X (Digitos)	1	1
<b>Puntuación Verbal</b>		<b>11</b>
PRUEBAS MANIPULATIVAS	Puntuación Directa	Puntuación Típica
X Figuras incompletas	18	11
X Historietas	18	6
X Cubos	10	4
X Rompecabezas	23	11
X Claves	11	1
X (Laberintos)	9	3
<b>Puntuación Manipulativa</b>		<b>33</b>

OBSERVACIONES: **ASIMETRÍA MENTAL.**  
 Dificultades de lenguaje.  
 Ejecución de Tarea lenta.  
 Ha trabajado con interés. Al final estaba cansada y ha rechazado continuar.

	Puntuación Típica	CI
Puntuación Verbal	11	47
Puntuación Manipulativa	33	74
<b>Puntuación Total</b>	<b>44</b>	<b>54</b>

Diferencia (27)  
 $CI V < 15 < CI M$   
 Importante  
 Anomalía  
 trastorno genético

Copyright © 1949, 1971, 1974 by The Psychological Corporation, New York, N. Y. 10017.  
 Copyright © de la adaptación española 1993 by TEA Ediciones, S. A. - Todos los derechos reservados.  
 Edita TEA Ediciones, S. A.; Fray Bernardino de Sahagún, 24; 28036 Madrid - Printed in Spain. Impreso  
 15 cpdo.; 28002 Madrid; Depósito legal: M. - 12591 - 1993.

Fig. 13. Imagen del resumen de los resultados obtenidos en el test WISC-R.

El análisis citogenético en SP reveló la presencia de una translocación aparentemente balanceada de novo: 46,XX,t(9;11)(q34.1;p11.2).

En la última evaluación, a los 12 años, los problemas importantes del lenguaje se acompañaban además de ciertos trastornos de conducta (ansiedad anticipatoria y timidez) que requieren un seguimiento psicológico específico.

### **4.1.2.2 Translocación 2. 45,XY,t(17;22)(p13;q11.2),-22.**

El paciente es un varón de 33 años, segundo hijo de un matrimonio no consanguíneo. Su madre presenta retraso mental, fisura palatina y sordera progresiva; su padre tiene displasia ectodérmica. El paciente tiene un hermano varón sano y una hermana con retraso mental, anomalías en uno de los pies (pie en pinza), hipoplasia unilateral de la glándula mamaria, displasia ectodérmica, baja estatura y voz hipernasal. El paciente presenta un síndrome polimalformativo con retraso mental profundo, retraso de crecimiento leve y diversas anomalías estructurales (faciales, de extremidades y genitales). Las anomalías de extremidades (manos y pies) son ectrodactilias: monodactilia en ambas manos y anomalía en pinza de langosta en los pies. Como rasgos faciales, destacan hendiduras palpebrales estrechas y de inclinación ascendente (FP 2.6 cm, <p3), hipertelorismo (DIC 3.7 cm, >p95, +2DS), un puente nasal ancho y deprimido con una punta nasal ancha. El labio superior es fino y la mandíbula gruesa. Las orejas tienen implantación baja, con longitud asimétrica (derecho 5.3 cm, izquierdo 5.9 cm), con antihélix algo deficiente. El análisis citogenético en SP mostró la presencia de una translocación no balanceada: 45,XY,t(17;22)(p13;q11.2),-22; presente en su hermana y su madre. En la evaluación de desarrollo mediante el test de ICAP se obtuvo una puntuación correspondiente a una

edad mental de 3 años y 4 meses. En su comportamiento predomina la tendencia al aislamiento, las esterotipias de balanceo y movimientos de cabeza con los ojos cerrados, así como la tendencia a autolesionarse.

En el siguiente árbol genealógico se detallan los principales rasgos fenotípicos familiares (displasia ectodérmica, ectrodactilia y retraso mental), así como las anomalías citogenéticas y/o moleculares:

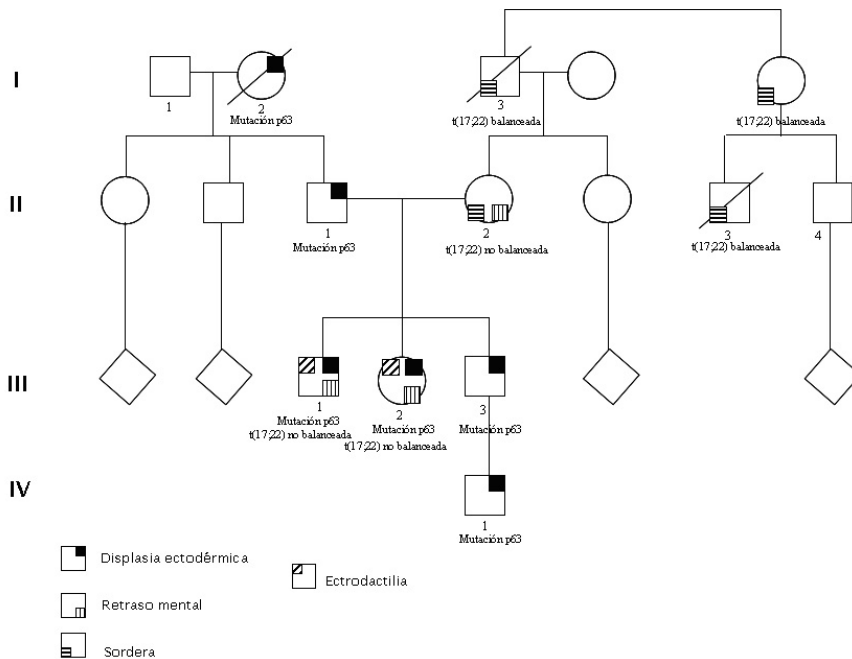


Fig. 14. Árbol genealógico de la familia. El individuo descrito es el III-1.

### 4.1.2.3 Translocación 3. 46,XY,t(7;18)(p15.3;q21).

El paciente es un varón de 29 años, cuarto hijo de una pareja sana y no consanguínea, con historia de dos abortos previos. El embarazo se desarrolló con normalidad, sin antecedentes de

interés. Al nacimiento no había anomalías congénitas, y el desarrollo psicomotor fue normal. En la adolescencia no hubo desarrollo correcto de características sexuales secundarias, por lo que requirió atención médica a los 22 años. En ese momento medía 180 cm (talla media parental 174 cm), el peso era 85.5 Kg, tenía una brazada de 193 cm, con un ratio entre los segmentos superior/inferior de 0.85. En la exploración física mostró un hábito eunucoide, ginecomastia, obesidad central, vello corporal escaso y distribución ginecoide del vello púbico. El tamaño del pene era pequeño, con testículos prepuberales en bolsa escrotal. Se descartó anosmia o hiposmia.

La evaluación endocrinológica reveló niveles bajos de FSH, LH y testosterona compatibles con hipogonadismo hipogonadotrópico. La evaluación oftalmológica fue normal. El escáner de la región esfenoidal fue normal, sin evidencia de microadenoma u otras alteraciones de la silla turca.

El cariotipo en SP fue 46,XY,t(7;18)(p15.3;q21). Los cariotipos de su madre y sus hermanos fueron normales.

#### **4.1.2.4 Translocación 4. 46,XX,t(11;13)(q21;q22)**

La paciente es una niña de 13 años con un fenotipo fundamental de retraso del lenguaje. En la historia clínica destaca una convulsión atípica a los 20 meses, por lo que se trató durante un año con valproato sódico (VPA, depakine). El estudio citogenético en SP reveló la presencia de una translocación aparentemente balanceada *de novo*: 46,XX,t(11;13)(q21;q22). Como rasgos adicionales destacan hiperlaxitud, desviación de columna y pies valgus. Con apoyo específico su coordinación motora ha mejorado.



En la actualidad tiene un diagnóstico de TDAH, además de la afectación del lenguaje, por lo que recibe apoyo de un logopeda.

#### **4.1.2.5 Translocación 5.**

##### **46,XY,t(4;15)(q24;q26),add(7)(qter)[15]/46,XY[15]**

El paciente es un hombre de 50 años que tenía una historia previa de anemia macrocítica de un año de evolución. En la analítica inicial mostraba un nivel de hemoglobina de 120 g/L (rango normal 120-133 g/L), recuento total de leucocitos (*white blood cells*, WBC) de  $6 \times 10^9$  /L (rango normal  $4.3-10.8 \times 10^9$  /L), y  $157 \times 10^9$  /L de plaquetas (rango normal  $150-400 \times 10^9$  /L). El estudio de la medula ósea (MO) reveló un diagnóstico de leucemia mielomonocítica crónica tipo 2 (LMMC-2) con cariotipo normal. Se remitió a nuestro centro en mayo de 2006, y mostró un recuento total de WBC de  $20 \times 10^8$  /L (monocitosis) con 3% blastos, hemoglobina 86 g/L y recuento plaquetario de  $178 \times 10^9$  /L. Los estudios de coagulación fueron normales. El estudio de MO reveló 10% de blastos y 13% de promonocitos, siendo el diagnóstico final de SMD tipo LMMC según la clasificación FAB (Franco-Americana-Británica) y LAM no clasificable según la OMS (Organización Mundial de la Salud). La tabla 4 muestra la evolución citogenética y clínica del paciente. En un control posterior (junio de 2006) se identificó una translocación entre el cromosoma 4 y 15 acompañada de un cromosoma derivativo 7 y de una inversión del cromosoma 12 en un clon independiente. En los dos controles previos los cromosomas eran de mala calidad, lo que hace pensar que la translocación no pudiera ser identificada correctamente y se etiquetara de marcador. La remisión completa de la LAM se consiguió después de quimioterapia de inducción con la pauta ICE (idarubicina, ARA-C y etopósido). La remisión parcial de la LAM se

## MATERIAL Y MÉTODOS

confirmó con un nuevo examen de MO en el que el cultivo mostró un resultado sin metafases. Sin embargo, la LMMC persistía. No se tiene constancia de nuevos seguimientos.

En la siguiente tabla se resumen los resultados citogenéticos, de estudios citomorfológicos de la MO y de los diagnósticos establecidos.

Fecha	Tipo de muestra	Cariotipo	Recuento blastos	Diagnóstico FAB/OMS
10/05/2006	MO	47,XY,+mar[9]	15% blastos + 13% promonocitos	LMMC/LAM
01/06/2006	SP	47,XY,+mar[2]/ 46,XY[4]	No disponible	
27/06/2006	MO	46,XY,t(4;15)(q24;q26),add(7)(qter)[12]/ 46,XY,inv(12)(p12q13)[7]	8% blastos + 17% promonocitos	
05/07/2006	MO	46,XY,t(4;15)(q24;q26),add(7)(qter)[15]/ 46,XY[5]	6% blastos + 13% promonocitos	LMMC (en remisión de la LAM)
28/08/2006	MO	46,XY,t(4;15)(q24;q26),add(7)(qter)[3]/ 46,XY,inv(12)(p12q13)[16]	7% blastos + 2% promonocitos	
15/01/2007	MO	Sin metafases	3% blastos + 3% promonocitos	

*Tabla 4. Resumen de los resultados obtenidos en los estudios del paciente*

## 4.2 Técnicas de citogenética molecular

### 4.2.1 Cultivo de BACs, minipreps

La hibridación in situ fluorescente se realizó con sondas no comerciales a partir de BACs (*bacterial artificial chromosomes*, del inglés, cromosomas artificiales de bacterias). Los clones empleados en este trabajo se obtuvieron a partir de la librería genómica de BACs del Children's Hospital Oakland Research Institute (CHORI, <http://bacpac.chori.org/genomicRearrays.php>)<sup>130</sup>. El Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona (PRBB) dispone de la librería de 32K, con el genoma humano completo distribuido en 32450 clones bacterianos.

El ADN de las bacterias se extrajo con una lisis alcalina estandar con el kit comercial de Qiagen mediante minipreps (Qiagen plasmid mini kit), siguiendo el protocolo del proveedor con mínimas modificaciones.

### 4.2.2 Marcaje de las sondas (nick translation)

El ADN clonado fue marcado mediante la reacción de *nick translation* con SpectrumRed-dUTP o SpectrumGreen-dUTP (Abbott Molecular, USA), mediante el kit de marcaje directo de Abbott Molecular a partir de 1 µg de ADN del BAC.

- Se añaden 10 µl de mezcla de dATP, dCTP y dGTP, 5 µl dTTTPs, 5 µl tampón de nick, 2.5 µl de Spectrum green dUTP o Spectrum Red dUTP, 5 µl de enzima y *Nucleasa free water* hasta un volumen de 45 µl en un tubo eppendorf.

## MATERIAL Y MÉTODOS

- Se incuba 2-3 horas en un baño frío (15-17°C). Se inactiva la enzima incubando los eppendorf 10 minutos a 70°C en un baño seco (termoblock).
- Se valora la digestión migrando 5 µl del producto de la *nick translation* en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio. Si la digestión es adecuada, se observará un *smear* entre 300-600 pb. Si se aprecia una banda de ADN sin cortar se añade de nuevo enzima y se vuelve a incubar durante 1 hora más. En el caso de que los tamaños de digestión sean inferiores a 300 pb, es preferible realizar un nuevo marcaje.
- Se añaden 10 µl de ADN COT-1 para bloquear las secuencias repetitivas.
- Se precipita el ADN con 10 µl de Acetato sódico (NaAc) 3M y 250 µl de etanol 100% frío.
- Se deja toda la noche en el congelador (-20°C).
- Se centrifuga 30 minutos a 12000 rpm.
- Se decanta el sobrenadante.
- Se limpia el botón añadiendo 200 µl de etanol al 70%.
- Se centrifuga 10 minutos a 10000 rpm.
- Se retira el etanol y se deja secar en una estufa a 37°C (10-15 minutos).
- Se resuspende el botón con 10 µl de agua destilada precalentada a 70°C. Esta solución es la que se emplea como sonda.

### 4.2.3 FISH

- Se hacen extensiones del material citogenético en fijador del paciente sobre un portaobjetos y se dejan envejecer 24 h a temperatura ambiente.

- Se desnaturalizan los portaobjetos en una solución de formamida al 70% a 74°C durante 5 minutos.
- Se deshidratan las muestras en una serie creciente de etanoles al 70%, 85% y 100% y se dejan secar.
- Se mezclan en un eppendorf 2 µl de cada sonda, 7 µl de tampón de hibridación y 1 µl de agua destilada.
- Se desnaturaliza la mezcla de la sonda 5 minutos a 74°C al baño maría.
- Se ponen los 10 µl de la mezcla de sonda sobre un cubreobjetos y se deja caer encima el portaobjetos con cuidado de no deslizarlo sobre la muestra.
- Se sella todo el perímetro del cubreobjetos con cola Paniker para evitar que se evapore la sonda.
- Se incuba unas 17 horas en una cámara húmeda protegida de la luz en una estufa a 37°C.
- Se retira el cubreobjetos con cuidado.
- Para realizar los lavados posthibridación, se incuba el portaobjetos en tres series de 10 minutos en coplins con formamida al 50% a 45°C.
- Se pasa a una solución de 2xSSC a 45°C durante 10 minutos.
- Lavado final en 2xSSC 0.1% NP40 a 45°C durante 10 minutos.
- La contratinción del ADN se hace con 7 µl de DAPI II (4',6-diamidino-2-phenylindole).
- Las preparaciones se guardan a -20°C en congelador hasta su valoración al microscopio.

**SOLUCIONES:**

Formamida 70%

70 ml de formamida  
20 ml de agua destilada  
10 ml de 20xSSC, pH 7.

Tampón hibridación

50% de formamida desionizada  
50% de solución master mix

Master mix

2 gr de dextran sulfato

1 ml 20xSSC

9 ml de agua destilada

Formamida 50%

125 ml formamida, 100 ml H<sub>2</sub>O  
25 ml 20xSSC, pH 7

20xSSC

175.3 g NaCl

88.2 g citrato sódico (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Na<sub>3</sub>·2H<sub>2</sub>O)

1 l H<sub>2</sub>O, pH 7

#### 4.2.4 Hibridación genómica comparada (HGC)

Se marcaron 1000 ng de cada ADN genómico (muestra y control) con fluorescencia mediante *nick translation* (ver procedimiento en apartado anterior) en reacciones independientes. El ADN test se marcó con SpectrumGreen dUTP y el ADN control con SpectrumRed dUTP. El ADN marcado se resuspendió en 7  $\mu$ l de tampón de hibridación. A continuación se cohibridaron sobre un portaobjetos con metafases de un individuo control.

- La desnaturalización de los ADNs se hizo durante 12 minutos para el ADN test y 5 minutos para el ADN control a 74°C.
- Un portaobjetos comercial con metafases obtenidas de un individuo control (Abbott Molecular) se desnaturalizó durante 10 minutos en un coplin con formamida al 70% a 74°C.
- A continuación se deshidrató incubando en una serie creciente de etanoles (70%, 85%, 100%) durante 1 minuto.
- Los ADNs desnaturalizados se mezclaron sobre el cubreobjetos, y el portaobjetos se colocó encima.
- Se selló con cola Paniker el perímetro del cubreobjetos y se incubó durante 72 horas a 37°C en cámara húmeda.
- Los lavados de posthibridación de la CGH se realizaron igual que para la técnica de FISH (tres tandas de 10 minutos en formamida al 50%, 10 minutos en solución 2xSSC, y 10 minutos en 2xSSC 0.1% NP40 a 45°C).
- La contratinción se hizo con 21  $\mu$ l de DAPI II.
- Los resultados se analizaron en el microscopio de fluorescencia Olympus BX51 con el software de Cytovision (Applied Imaging, Santa Clara, CA). Se capturaron al menos 15 metafases, y se analizaron un mínimo de 20 cromosomas de

cada par. Los umbrales para la detección de alteraciones cromosómicas se situaron en 0.75 para pérdidas y 1.25 para ganancias.

#### **4.2.5 Cariotipo espectral (SKY FISH)**

En este caso las muestras se hibridaron con una mezcla de sondas comercial (SkyPaint™, Spectral Imaging), que permite visualizar cada par cromosómico con una combinación determinada de fluorocromos, después de captar simultáneamente las imágenes emitidas por las metafases, obteniendo un cariotipo espectral. Las imágenes se analizaron mediante el software SkyView 5.0.

- Se hacen extensiones del paciente y se dejan envejecer 24 h a temperatura ambiente. Se valoran en el microscopio invertido para comprobar que hay suficiente cantidad de metafases y están bien extendidas.

##### **Pretratamiento:**

- Se hace un tratamiento con pepsina incubando un tiempo variable entre 5 segundos y 1 minuto en un coplin a 37°C con HCl (99 ml H<sub>2</sub>O destilada, 1 ml HCl 1M), y 10 µl pepsina al 10%.
- Se lava la extensión en coplin con PBS 1X durante 5 minutos.
- Se comprueba el estado de la digestión en el microscopio invertido: no se deben apreciar restos de citoplasma ni ningún halo alrededor de los cromosomas. En el caso de que no esté bien digerida se vuelve a incubar con pepsina y se repite el lavado con PBS1X.

## MATERIAL Y MÉTODOS

- Se lava los portaobjetos en PBS1x/MgCl<sub>2</sub> a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Se incuba 10 minutos en coplin con solución de formaldehído al 1%.
- Se lava 5 minutos con PBS1X.
- Se deshidrata el portaobjetos en serie creciente de etanoles: 70%, 85% y 100%, dos minutos en cada uno.
- Se deja secar la preparación.

### **Hibridación:**

- Se desnaturaliza la extensión incubando 1 minuto en solución de formamida al 70% a 75°C.
- Se deshidrata en una serie creciente de etanoles fríos (70%, 85% y 100%).
- Se deja secar el portaobjetos.
- Se desnaturaliza 10 µl de la sonda SkyPaint en baño a 80°C durante 7 minutos.
- Se incuba en baño a 37°C durante 1 hora.
- Se depositan los 10 µl de sonda en un cubreobjetos de 24x24 mm y se deja caer el portaobjetos encima. Se sella todo el perímetro con cola Paniker.
- Se deja hibridando durante dos días en cámara húmeda a 37°C.

### **Lavados posthibridación:**

- Se realizan 3 lavados de 5 minutos cada uno en coplins con formamida al 50%/2xSSC a 45°C.
- Dos lavados de 5 minutos en 1xSSC a 45°C.
- Se incuba 2 minutos en 4xSSC/0.1% tween 20 a 45°C.



**Detección:**

- Se añaden 80 µl de tampón I [Cy5 staining reagent] sobre el portaobjetos, se coloca encima un cubreobjetos de plástico y se incuba a 37°C durante 45 minutos.
- Se realizan 3 lavados de 3 minutos cada uno en 4xSSC/0.1% tween 20 a 45°C.
- Se añaden 80 µl de tampón II [Cy5.5 staining reagent], se coloca encima un cubreobjetos de plástico y se incuba a 37°C durante 45 minutos.
- Se realizan 3 lavados de 3 minutos cada uno en 4xSSC/0.1% tween 20 a 45°C.
- Se lava el portaobjetos brevemente en agua y se deja secar al aire, protegido de la luz directa.
- Se hace la contratinción con 20 µl de DAPI II durante ~20 minutos a -20°C.

**SOLUCIONES:**

**Solución de pepsina**

Pepsina 10% 100 mg/ml

**PBS1X / MgCl<sub>2</sub>**

50 ml PBS1x

2.5 ml MgCl<sub>2</sub> 1M

**Formaldehído 1%**

1 ml formaldehído 37%

99 ml H<sub>2</sub>O

## 4.3 Técnicas de biología molecular

### 4.3.1 PCR de fragmentos grandes

Se han usado dos sistemas diferentes: Expand High Fidelity PCR System (Roche, ref. 03 310 256) para fragmentos de ~4-7 Kb; y Expand long template PCR system (Roche, ref. 11 681 834 001) para amplificar fragmentos mayores de ~7 Kb.

La reacción de PCR se realizó a partir de 100 ng de ADN en un volumen final de 25  $\mu$ l, en el que se añadieron: 2.5  $\mu$ l tampón 1 (10x con 17.5 mM MgCl<sub>2</sub>), 4  $\mu$ l dNTPs (40 pmoles), 0.75  $\mu$ l de cada primer (7.5 pmoles), 15.65  $\mu$ l H<sub>2</sub>O y 0.35  $\mu$ l enzima (1.75 U).

Las muestras fueron amplificadas tras 4 minutos de desnaturalización a 94°C, 10 ciclos de preamplificación (94°C durante 30'', 55-57°C durante 30'', 68°C durante 7-10'), 20 ciclos de amplificación (94°C durante 30'', 55-57°C durante 30'', 68°C durante 7-10' aumentando 20'' cada ciclo), y una extensión final a 68°C de 15'. Los resultados se comprobaron migrando los productos de PCR en un gel de agarosa al 0.8-1% teñido con bromuro de etidio.

### 4.3.2 Secuenciación

La mezcla de secuenciación que se ha empleado es la *BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit* (Applied Biosystems), a partir de una dilución 1:10 del producto de PCR a secuenciar. En la reacción de secuenciación se añaden:

- 5  $\mu$ l dilución de ADN.
- 3  $\mu$ l mix de secuenciación.
- 1  $\mu$ l cebador (directo o reverso).

La amplificación de PCR empleada fue de 30 ciclos (96°C durante 10", 50°C durante 5", 60°C durante 4') tras una desnaturalización previa de 4' a 94°C.

- A continuación se precipita el ADN con 62.5 µl Etanol 100%, 24.5 µl H<sub>2</sub>O y 3 µl NaAc 3M.
- Se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Se centrifuga durante 20 min a 13000 rpm.
- Se decanta el sobrenadante.
- Se añaden 250 µl Etanol 70%.
- Se centrifuga 5 minutos a 13000 rpm.
- Se elimina el sobrenadante y se deja secar en una estufa a 37°C.
- Se procesa en el secuenciador automático ABI3100 (Applied Biosystems).

### **4.3.3 Southern blot**

Se ha realizado esta técnica a partir de ~10 µg de ADN genómico de la paciente de la translocación 1 y un ADN control.

Las sondas que se usaron para detectar la presencia de un determinado fragmento son secuencias de ADN de ~400 pb, que se generaron a partir de una PCR específica. El método de detección usado ha sido mediante marcaje radiactivo con  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP. Para revelar la radiactividad que haya quedado impresa en la pantalla usamos el lector (Phosphoimager) Typhoon 8600, mediante el programa Typhoon Scanner.

### **Digestión del ADN del paciente y de un control**

- Se digieren 10 µg de ADN en una reacción con 5 µl de tampón de digestión (A, B o H dependiendo del enzima de restricción),

## MATERIAL Y MÉTODOS

H<sub>2</sub>O y 10 U enzima en un volumen total de 50 µl. En este caso hemos empleado los enzimas EcoRI, HindIII, BamHI y XbaI.

- Se digiere durante toda la noche en una estufa a 37°C.

### **Gel de agarosa**

Las muestras de ADN digeridas se migran en un gel de agarosa al 0.8% durante toda la noche en una cubeta de electroforesis a bajo voltaje (50-60 mV).

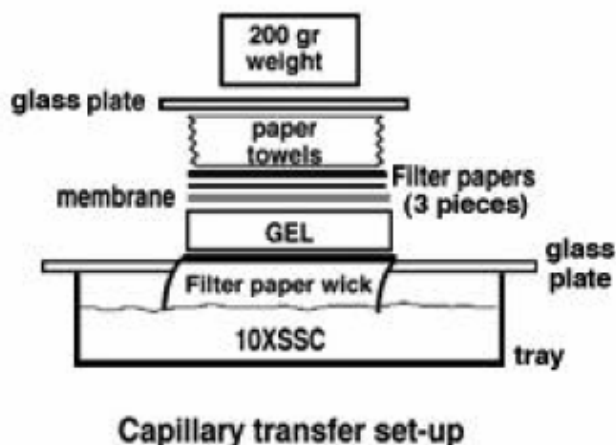
### **Pretratamiento del gel**

- Se incuba el gel en agitación con HCl 250 mM para fragmentar el ADN, durante 10 minutos.
- Se aclara con H<sub>2</sub>O destilada.
- Para desnaturalizar el gel, se realizan 2 incubaciones de 15 minutos cada una en solución desnaturizante.
- Se aclara con H<sub>2</sub>O destilada.
- Se realizan 2 incubaciones con tampón de neutralización para neutralizar el pH alcalino de la solución desnaturizante.
- Se aclara con H<sub>2</sub>O destilada.

### **Transferencia por capilaridad**

Para transferir el ADN desnaturalizado a una membrana de nylon Hybond N+ (Roche) se realiza un montaje en el que se usa como tampón de transferencia 10XSSC. Antes de transferir, se pretrata la membrana sumergiéndola unos 10 minutos en el tampón de transferencia. Se llena una cubeta con el tampón, y se coloca un cristal y un papel Watman en contacto con el tampón. Sobre este papel se colocan otros dos papeles Watman de un tamaño similar al de la superficie de gel que se quiere transferir, con el gel de agarosa encima. La membrana de nylon se coloca sobre el gel, y

dos papeles Watman y múltiples capas de papeles de filtro con un peso de 1 Kg aproximadamente en la parte superior, como se puede observar en el siguiente esquema:



**Fig. 15. Esquema del montaje para la transferencia de gel a membrana en un southern blot.**

Esto permitirá que el ADN ascienda por capilaridad y se imprima en la membrana de nylon. Se deja el montaje de transferencia durante toda la noche. Al día siguiente, para comprobar la correcta transferencia de ADN, se desmonta el blot y se observan en el transiluminador tanto la membrana como el gel.

### **Fijación del ADN a la membrana de nylon**

- Para fijar (hacer un *crosslink*) el ADN a la membrana se emplean rayos UV (Bio Link Crosslinker 254 nm, Biolan); con el programa C3: 150 mJ.
- La membrana se aclara después con H<sub>2</sub>O destilada. Si necesita almacenarse se guarda entre papeles Watman a 4°C.

### **Prehibridación de la membrana**

Se incubaba la membrana en la solución de prehibridación a 65°C durante 90 minutos. La membrana se coloca en un cilindro de metacrilato con el ADN hacia la parte interior. La incubación se realiza en un horno con sistema rotatorio.

### **Obtención de la sonda: purificación de ADN a partir de gel de agarosa**

Las sondas que usamos para detectar la presencia de un determinado fragmento en un Southern blot son secuencias de ADN de ~500 pb. Estas secuencias se generan a partir de una PCR específica para esta región. Para comprobar la especificidad de esta secuencia, primero se compara con el ADN de referencia mediante el programa BLAT (<http://projects.tcag.ca/humandup/>) para descartar la presencia de regiones repetitivas. Una vez diseñados los cebadores y realizada la PCR, se comprueba el resultado migrando el producto en un gel de agarosa, para recortar y purificar la banda obtenida. La purificación se realizó mediante el kit comercial GFX™ PCR and Gel Band Purification kit (Ref. 27-9602-01) de Amersham Biosciences, siguiendo las instrucciones del proveedor.

### **Marcaje de la sonda con radioactividad**

- Se diluyen 50 ng de ADN de la sonda en un volumen final de 45 µl con TE 1x.
- Se desnaturaliza la sonda hirviendo en un baño maría a 100°C durante 5 minutos.
- Se coloca en hielo para evitar la renaturalización.

- Se traspasan los 45  $\mu\text{l}$  a un nuevo tubo que contiene *random primer* de Amersham (dATP, dGTP, dTTP, hexámeros random y enzima Klenow; liofilizado).
- Se añaden 4  $\mu\text{l}$  de alpha  $^{32}\text{P}$  dCTP (10  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ ; Perkin Elmer).
- Se resuspende bien y se incuba durante 10 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  en un termoblock.
- Se preparan las columnas de purificación de resina (Sephadex), que retienen el  $^{32}\text{P}$  libre no marcado.
- Se depositan los 50  $\mu\text{l}$  de sonda marcada en la parte superior de la columna y se centrifuga durante 3 minutos a 2000 rpm.
- En el tubo colector quedará la sonda marcada; para desnaturalizarla se añaden 5  $\mu\text{l}$  de NaOH 4M.

### **Hibridación**

- Se decanta la solución de prehibridación y se cambia por solución de hibridación precalentada a  $65^{\circ}\text{C}$ .
- Se añaden los 55  $\mu\text{l}$  de sonda desnaturalizada directamente en la solución de hibridación, sin tocar la membrana.
- Se deja hibridando durante toda la noche en un horno rotatorio a  $65^{\circ}\text{C}$ .

### **Lavados posthibridación**

- Se realizan 2 lavados de 20 minutos cada uno con 2xSSC 0.5%SDS, primero a  $42^{\circ}\text{C}$  y después a  $60^{\circ}\text{C}$ .
- Se realizan dos lavados de 20 minutos con 0.5xSSC 0.5% SDS a  $60^{\circ}\text{C}$ ; todos en el horno con rotación.

### Exposición de la membrana

- Se envuelve la membrana en plástico y se coloca en contacto con una pantalla dentro de un cassette revelador (Molecular Dynamics).
- Se deja exponiendo toda la noche a temperatura ambiente.

Para revelar la radiactividad que haya quedado impresa en la pantalla se usa el lector (phospho imager) Typhoon 8600, mediante el programa Typhoon Scanner.

#### SOLUCIONES:

Solución desnaturalizante

0.5N NaOH

1.5M NaCl

Tampón de neutralización

Tris HCl 0.5M

NaCl 3M, pH 7.5

Solución de prehibridación- hibridación

5XSSC

5X tampón Denharts

0.5% SDS

100 µg/ml ADN de esperma de salmón

Denharts 100x

2% ficoll 400

2% polivinilpirrolidona

2% BSA (albúmina de suero fetal bovino, fracción V)

H<sub>2</sub>O destilada

### 4.3.4 Microdissección manual de cromosomas mediante aguja

Hemos usado el protocolo del laboratorio de Citogenética Molecular del *Institut für Humangenetik und Anthropologie* (Jena, Alemania), dirigido por el Dr. Thomas Liehr. El equipamiento consiste en un microscopio invertido conectado a un microposicionador manejado con un *joystick*, y otro microposicionador manual. En el primero se sitúa la aguja, que se fabrica a partir de una varilla de vidrio estirada con una pequeña resistencia. En el posicionador manual se coloca la pipeta, que contiene una solución de proteinasa K, y es el lugar donde se van transfiriendo los cromosomas a medida que se van aislando. La pipeta se fabrica a partir de una pipeta *pasteur* de vidrio extendida también con una resistencia.



### **Preparación de pipetas y agujas**

Para ello se utiliza un aparato llamado "Pipette puller", que permite extender el vidrio de las pipetas Pasteur o de las varillas de vidrio mediante una resistencia con un filamento de platino. Se ajusta la intensidad de la resistencia y el peso de la parte inferior en función de lo que queramos elaborar. En nuestro caso empleamos los siguientes parámetros:

Pipetas           Peso: 2 x 100 g

Agujas            Peso: 33 g

### **Pretratamiento**

**Agujas:** Se tratan con UV durante 2 horas

**Pipetas:** Tienen que siliconizarse para aumentar la adherencia del material biológico a la pipeta. Se conecta la pipeta a una bomba de vacío para aspirar. Se sumerge el extremo de la pipeta 2 segundos en cada una de las siguientes soluciones:

- 1% diclorodimetilsilano en carbono tetraclorhidro
- NaEDTA 1 mM (estéril, libre de ADN)
- NaEDTA 1 mM (estéril, libre de ADN)

A continuación se esterilizan las pipetas (en estufa):

- 1 hora 60°C
- 30 minutos 100°C
- 1 hora 60°C

### **Cubreobjetos**

- Utilizamos cubreobjetos de 24x60 mm.
- Se almacenan en un tubo falcon de 50 ml con una solución de SDS al 10%.

## MATERIAL Y MÉTODOS

- Para hacer las extensiones del material en fijador, se saca cada cubre con unas pinzas y pasamos los dedos suavemente por encima hasta obtener espuma.
- Se aclara con agua corriente y después con agua destilada.
- Se coloca en un coplin con 50 ml de H<sub>2</sub>O mQ.
- Guardamos en nevera a 4°C un mínimo de 30 minutos.
- Se realizan las extensiones del material que se quiera procesar.

### **Tinción:**

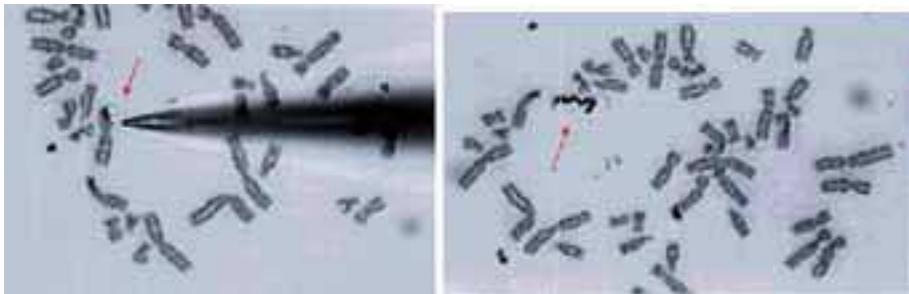
- 1 minuto en PBS 1X estéril.
- 25-40 segundos en solución de tripsina (40 ml PBS 1X + 100 µl tripsina 5%).
- 1 minuto en PBS 1X estéril.
- 3 minutos en solución de Giemsa (35 ml PBS 1X estéril + 3.5 ml Giemsa filtrada [filtros millipore]).
- Se aclaran unos segundos en dos coplins con H<sub>2</sub>O mQ.
- Se prepara la solución de colección (*Collection drop*):
  - 5.7 µl solución salina
  - 1 µl proteinasa K (5-15 mg/ml)
  - 3.3 µl glicerol

Comprobamos que el extremo de la pipeta que vamos a usar tiene los bordes lo más regulares posible (al microscopio). A continuación se sumerge con sumo cuidado (sin tocar las paredes del eppendorf) en la solución de colección y se vuelven a mirar los extremos al microscopio. Una vez lista se guarda en una caja metálica con el fondo cubierto de H<sub>2</sub>O mQ, para asegurar humedad suficiente.

### Aislamiento de cromosomas

Para aislar el cromosoma de interés (derivativo o marcador), éste debe estar situado en la periferia de la metafase, o al menos, alejado lo más posible de otros cromosomas, para evitar riesgo de contaminación al procesarlo con la aguja.

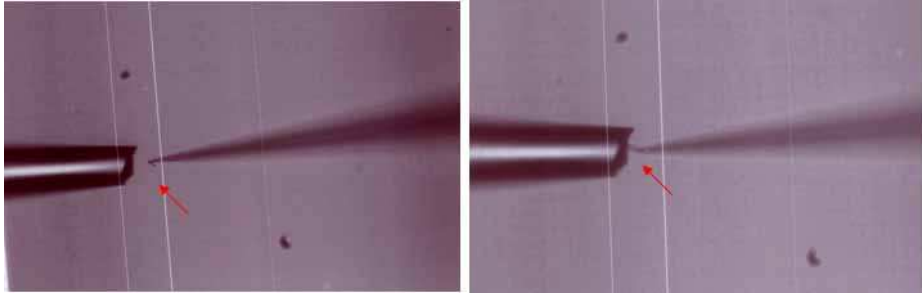
Para incrementar la baja humedad ambiental presente en Jena, en la habitación donde se localizaba el microdisector se mantenía un baño a 60°C con la tapa parcialmente levantada. En ocasiones, especialmente a la hora de aislar cromosomas enteros (del grupo C o mayores) se añade una gota de la solución de Giemsa sobre la región donde se va a manipular con el microdisector, para aumentar la *elasticidad* de los cromosomas y evitar que se fragmenten durante la manipulación.



*Fig. 16. Imagen de la separación de un cromosoma 7 con la aguja. En la imagen de la izquierda comenzamos a separarlo poco a poco de la superficie hasta conseguir enrollarlo (derecha, señalado con flecha). En este punto, podemos introducir la aguja por la parte inferior y levantarla separando el cromosoma del cubreobjetos.*

El cromosoma debe ir separándose con extrema suavidad de la superficie del cubreobjetos con el extremo de la aguja hasta tenerlo en forma filamentososa, hasta poder retirarlo de la superficie de la extensión y capturarlo con la aguja. Después se transfiere a

la pipeta, donde se realiza la digestión con proteinasa K a 60°C. Repetiremos esta operación todas las veces que sea posible, recogiendo como mínimo 6 cromosomas.



*Fig. 17. Transferencia aguja-pipeta. En ambas fotos se puede apreciar el cromosoma en el extremo de la aguja.*

### **Transferencia de pipeta- tubo PCR**

Para transferir los cromosomas digeridos desde la pipeta, se coloca un tubo de plástico previamente esterilizado en la pipeta, se sumerge la punta de la pipeta en contacto con la solución de PCR (que contiene cebadores DOP) y se sopla para transferir el material. Después se rompe la punta de la pipeta con cuidado para asegurar que todo el material está introducido.

El tubo de PCR contiene:

- 3.37  $\mu$ l H<sub>2</sub>O.
- 0.63  $\mu$ l DOP *cebadores* (5'- CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G-3').
- 0.4  $\mu$ l dNTPs.
- 0.6  $\mu$ l tampón de *sequenase*.
- Se centrifuga unos segundos para recoger todo el material en el fondo del tubo.

**DOP- PCR**

Hacemos una DOP-PCR de dos fases:

- Preamplificación (baja astringencia, 34°C *annealing*).
- Amplificación (astringencia normal- alta, 56°C TA).

**Preamplificación:**

Consta de 8 ciclos: 2 minutos 25°C, 2 minutos 34°C, 1 minuto 90°C.

Al inicio de cada ciclo añadimos 0.24 µl de solución de preamplificación (2.8 µl *sequenase dilution tampón* + 0.4 µl *sequenase version 2.0* (Amersham)).

Este enzima no tiene actividad exonucleasa 3'→5', y su temperatura óptima de incorporación de nucleótidos está en el rango de 30-37°C.

**Amplificación:**

Consta de 32 ciclos: 1 minuto 92°C, 1 minuto 56°C, 2 minutos 70°C.

Al comienzo de esta fase se añaden los siguientes 45 µl:

- 34.23 µl H<sub>2</sub>O.
- 5 µl stoffel tampón 10X.
- 4.4 µl dNTPs 2.5 mM.
- 1.37 µl primer DOP 40 µM.
- 5 µl MgCl<sub>2</sub> 25 mM.
- 0.6 µl Stoffel Taq polymerase 10 U/µl.

El enzima ADN *Polymerase Stoffel Fragment* es una modificación de la Amplitaq® ADN polymerase, con 289 aminoácidos del extremo N-terminal eliminados para aumentar la astringencia con una menor concentración iónica. Esta enzima es recomendada en PCR con cebadores aleatorios.

### **Reamplificación**

Se realiza la PCR a partir de 1  $\mu$ l del producto de la primera DOP-PCR. La reacción contiene: 5  $\mu$ l de Stoffel fragment tampón 10X, 4  $\mu$ l de dNTPs 2.5 mM, 1.25  $\mu$ l de DOP cebadores 40  $\mu$ M, 5  $\mu$ l de  $MgCl_2$  25 mM, 0.5  $\mu$ l de Amplitaq Stoffel fragment 1U/ $\mu$ l y 34.25  $\mu$ l de  $H_2O$ .

Se amplifican mediante el siguiente programa de PCR: 92°C 3 min, 31 ciclos de 91°C 1 min, 56°C 1 min, 70°C 2 min, 0.1°C/s hasta 74°C y una extensión final de 72 °C durante 5 min.

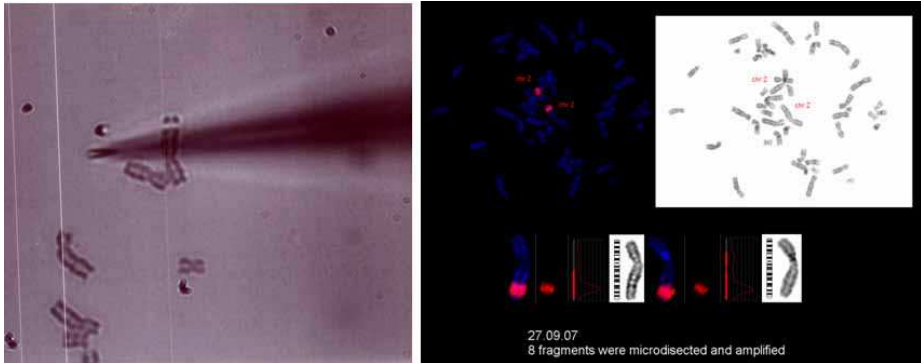
### **Marcaje**

Se realiza la reacción de marcaje a partir del producto de reamplificación:

- 12.08  $\mu$ l  $H_2O$ .
- 2  $\mu$ l Tampón 10X.
- 1  $\mu$ l DOP cebadores 40  $\mu$ M.
- 2  $\mu$ l dNTPs label mix 10X.
- 2  $\mu$ l  $MgCl_2$  25mM.
- 2  $\mu$ l Nucleótidos marcados (Spectrum Green u Orange dUTP).
- 0.12  $\mu$ l Amplitaq polymerase 5U/ $\mu$ l.
- 2  $\mu$ l Producto reamplificación.

El programa de PCR que se utiliza es el mismo que para la reamplificación.

El producto reamplificado y marcado lo usamos como sonda para hibridarlo sobre metafases normales y comprobar que la localización se da en los *loci* esperados (*Painting* reverso).



*Fig. 18. Izquierda, microdissección de una banda de la región 2q subterminal. Derecha, resultado del FISH reverso sobre metafases de una muestra control, en la que se aprecian señales de hibridación en las regiones 2qsubter.*

**SOLUCIONES:**

Solución salina

20  $\mu$ l NaCl 100mM  
 20  $\mu$ l tris HCl 100 mM  
 20  $\mu$ l NaEDTA 10 mM  
 20  $\mu$ l Triton x 100 1%  
 20  $\mu$ l SDS 1%  
 14  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

### 4.3.5 Microdissección laser de cromosomas

En este trabajo hemos aislado cromosomas con dos tipos principales de microdisectores láser:

- PALM (microscopio Olympus IX51).
- Leica (LMD6000).

La principal diferencia radica en la posición de la muestra: en el microdisector PALM la muestra está situada en la parte superior, de modo que una vez seleccionada y cortada la región de interés, la separación se realiza aumentando la potencia del láser y *catapultando* hacia un tapón de eppendorf que se sitúa justo encima del porta. En cambio, en el microdisector Leica la muestra

## MATERIAL Y MÉTODOS

está situada hacia la parte inferior, con lo que una vez separada la región cae por gravedad a un tapón que está debajo.

Las pruebas realizadas para aislar cromosomas se hicieron combinando varios tipos de soportes: cubreobjetos con membranas PEN (*polyethylene naphtalate*) y POL (*polyester-based*), soporte con membrana PET (*polyethylene tetraphthalate*) sola, haciendo digestión con proteinasa K o no, y probando diversos métodos de amplificación: DOP-PCR, *ligation-adaptor PCR* y Genomiphi. En el siguiente esquema hay un resumen de las principales alternativas empleadas:

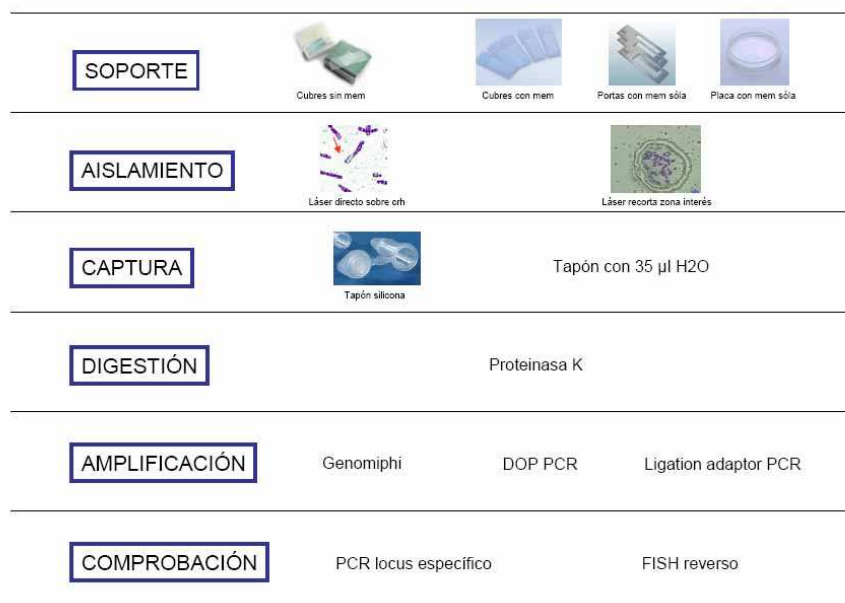


Fig. 19. Diagrama con las principales alternativas realizadas en el protocolo de microdissección láser.

- Se realiza un pretratamiento de los cubreobjetos en un *crosslinker* de UV, durante 60 minutos a 120 J.
- Se hacen las extensiones del material de interés.



- Se realiza la tinción con el colorante Wright durante 3 minutos. En los casos en los que se haga tratamiento previo, se incuba la preparación durante 15 segundos en 2xSSC a 65°C.
- Se aislan los cromosomas de interés y se recogen en un tapón de tubo de 200 µl que contenga 20 µl de H<sub>2</sub>O, TE o tampón de enzima de restricción, dependiendo de si se realiza digestión posterior o no. Debe evitarse la ausencia de líquido en el tapón colector, por lo que se irá añadiendo cada ~2 horas (o con más frecuencia si se evapora antes). También se pueden emplear tapones de silicona de tubos de 200 µl, específicos para recoger muestras de microdissección.
- Se realiza un vórtex durante ~1 minuto y se centrifuga la muestra a 13.000 rpm durante 15 minutos.
- En el caso de realizar digestión con enzima de digestión, se incuba con 5-10 U del enzima (Hind III, EcoRI) durante 2 horas a 37°C.
- Si se realiza digestión con proteinasa K, se añaden 1.5 µl del enzima y 20 µl de tampón, y se incuba a 55°C durante ~3 horas.
- Se realiza una amplificación inespecífica, mediante GenomiPhi (GE Healthcare) , DOP-PCR o *ligation-adaptor PCR*<sup>86, 87, 131</sup>.
- Se validan los resultados obtenidos mediante PCR de locus específico o hibridación del material obtenido sobre metafases control (FISH reverso).

**SOLUCIONES:**

Colorante Wright

0.25% de colorante de Wright disuelto en metanol.

Tinción Wright

3 ml tampón Sorensen

+ 1 ml colorante Wright por cada portaobjetos.

Tampón Sorensen

5,938 mg/ml fosfato sódico dihidratado 0.06 M pH 6.8

4,539 mg/ml fosfato monopotásico 0.06M

### 4.3.6 Multiplex ligation probe amplification (MLPA)

Hemos diseñado un juego de sondas en nuestro laboratorio para hacer un rastreo rápido de reordenamientos en los genes del complejo BRAF35 histona deacetilasa (formado por los genes *PHF21A*, *BRAF35*, *HDAC1*, *HDAC2*, *RCOR1* y *BHC110*) y los genes *FOXP2* y *WBSCR1*. Como sondas control hemos usado los genes *TTL5*, *MCEE* y *GNB1L*.

El diseño de sondas se realizó sobre la secuencia de los exones de los genes. Diseñamos dos hemisondas (izquierda y derecha) separadas por un nucleótido, que será el sitio de ligación. Las secuencias elegidas deben cumplir una serie de requisitos:

- La secuencia debe ser específica, no repetitiva, y no contener un SNP en el lugar de ligación de ambas hemisondas (comparamos la secuencia con el programa BLAT: <http://projects.tcag.ca/humandup/>).
- El % bases GC debe estar entre el 35-60%, que se comprueba mediante el programa Raw\_Probe (<http://www.mrc-holland.com>).
- No debe haber más de tres G ó C en el sitio de ligación.
- Las hemisondas no pueden acabar en A ó T (lugar de unión con las secuencias de los *primers* comunes).
- La temperatura de *melting* de cada hemisonda debe ser >70°C.
- El tamaño de las dos hemisondas juntas tiene que estar entre 48 y 94 pb, ya que el producto originado (sumando los tamaños de los cebadores marcados con FAM y HEX) debe estar entre 90 y 130 nucleótidos.

- El extremo 5' de la hemisonda derecha debe estar fosforilado para que la ligasa una los extremos de ambas hemisondas.

Gen	tamaño teórico	tamaño real	Locus	Fluorescencia	
WBSCR1	89	87,28	7q11,23	FAM	
BRAF35 exon7	94	90,7	19p13,3	FAM	
BRAF35 exon5	98	94,3	19p13,3	FAM	
RCOR1 exon3	102	98,55	14q32,31	FAM	
HDAC2 exon6 bis	105	102,2	6q21	FAM	
HDAC2 exon3 bis	108	104,3	6q21	FAM	
FOXP2	110	105,9	7q31	FAM	
BHC110 exon2	114	109,4	1p36,12	FAM	
PHF21A exon6	118	113,2	11p11,2	FAM	
<i>TLL5</i>	120	117,2	14q24,2	FAM	<i>Sonda control</i>
PHF21A exon9	122	118,7	11p11,2	FAM	
RCOR1 exon 5	126	122,85	14q32,31	FAM	
BHC110 exon4	130	126,92	1p36,12	FAM	
PHF21A exon15	96	92,8	11p11,2	HEX	
<i>MCEE</i>	99	96,27	2p13,3	HEX	<i>Sonda control</i>
PHF21A exon 5	102	98,7	11p11,2	HEX	
PHF21A exon14	107	104,04	11p11,2	HEX	
PHF21A exon18	112	109,5	11p11,2	HEX	
HDAC1 exon6	118	115,5	1p34	HEX	
<i>GNB1L</i>	123	120,77	22q11,21	HEX	<i>Sonda control</i>

Tabla 5. Panel de sondas diseñadas para el juego de MLPA.

La técnica de MLPA consiste básicamente en 4 pasos:

- Desnaturalización e hibridación de las sondas.
- Ligación.
- Amplificación por PCR.
- Separación de los fragmentos mediante electroforesis capilar.

Los reactivos empleados son de la casa comercial MRC-Holland.

### **Desnaturalización del ADN e hibridación de las sondas**

- Se diluye la muestra de ADN (100 ng) con H<sub>2</sub>O hasta obtener un volumen final de 5 µl.
- Se incuba 5 minutos a 98°C; se deja enfriar a 25 °C antes de abrir el termociclador.
- Se prepara la mezcla PROBEMIX (mezcla de oligonucleótidos a 1 µM): 1,5 µL de PROBEMIX + 1,5 µL de MLPA tampón. Se añaden 3 µl de esta mix a cada muestra en el termociclador, mezclando con cuidado.
- Se incuba 1 minuto a 95°C, a continuación se incuba 16 horas a 60°C, para que se realice la hibridación de las sondas.

### **Ligación**

Se reduce la temperatura del termociclador a 54°C. Se añaden 32 µL de MIX LIGASE 1x a cada muestra y se mezclan.

MIX LIGASA 1x:

- 3 µl LIGASE-65 TAMPÓN A.
- 3 µl LIGASE-65 TAMPÓN B.
- 25 µl H<sub>2</sub>O.
- 1 µl Ligase-65.
- Se incuba 15 minutos a 54°C, y se inactiva la ligasa durante 5 minutos a 98°C.

### **Reacción de PCR**

Se preparan las muestras:

- Sample mix: 13 µl H<sub>2</sub>O+ 2 µl 10x Salsa PCR.
- Se mezclan 15 µl sample mix con 5 µl producto ligación MLPA.
- Con los tubos en el termociclador a 60°C se añaden 5 µl de Mix Polymerase a cada tubo, a continuación comienza la reacción de PCR.

**MIX POLYMERASE 1x:**

- 2,6 µl H<sub>2</sub>O.
- 1 µl tampón *Enzyme Dilution*.
- 0,25 µl dNTP mix (1 mM).
- 0,9 µl PCR-cebadores MLPA-Forward-FAM+Reverse (200 nM).
- 0,45 µl PCR-primer MLPA-Reverse (200 nM).
- 0,25 µl Taq Polymerase (2.5 U).
- Programa de PCR: 30 ciclos de 30 segundos 95°C; 30 segundos 60°C; 60 segundos 72°C. Extensión final de 20 minutos a 72°C.

**Análisis de los resultados obtenidos en el Genescan**

Los productos de PCR del MLPA se migran mediante electroforesis capilar en el secuenciador ABI PRISM 3100. Los patrones obtenidos fueron analizados mediante Genetic Analyzer y la longitud y altura de los picos de las sondas fueron calculadas con el programa GeneScan 3.7 (PE Applied Biosystems).

Cada juego de sondas tendrá un patrón de picos específicos, dependiendo del tamaño de las sondas diseñadas. Cada sonda tiene una altura y un área que son proporcionales al número de moléculas que se hayan amplificado en la reacción de PCR. Para analizar los resultados se exportan los valores numéricos de las alturas de todas las sondas en un archivo Excel, y se realiza el siguiente análisis:

- Para cada individuo, se suma la altura de todos los picos de las sondas.
- Para normalizar, se divide la altura de cada sonda entre la suma de todas ellas.
- Se realiza la media de cada sonda para todos los individuos.
- Se divide el resultado de una sonda normalizada entre la media de las sondas de todos los individuos. Este resultado se considera normal (2 alelos) si el valor está entre  $\sim 0.75$  y  $\sim 1.25$ ; delección (1 copia) si es inferior a 0.6, y duplicación si es mayor que 1.35. Los valores de corte para cada sonda se definen con muestras con alteraciones conocidas, ya que dependen del funcionamiento de las sondas durante la técnica de MLPA (efectividad en la ligación, amplificación en la reacción de PCR).

El análisis se puede hacer a partir de la altura de los picos o de su área. En nuestro caso empleamos la altura porque en algunas ocasiones los picos de una muestra pueden solaparse en la base del pico (si la diferencia entre ambas sondas es pequeña, de unos 2 pb); con lo que la asignación del área concreta de cada sonda no es específica. En cambio, la altura de cada pico no se ve influenciada por la proximidad de las sondas.

### **4.3.7 Array CGH**

En este trabajo se han empleado tres tipos de arrays:

- qGenomics (BACs)
- Agilent 244K (oligonucleótidos)
- Illumina 370K (SNPs)

### 4.3.7.1 Array qGenomics

Contiene 2200 BACs de regiones subteloméricas, pericentroméricas y las implicadas en los síndromes de microdelección y microduplicación más frecuentes. En este caso se hibridaron ~300-400 ng de ADN genómico contra un *pool* de muestras de sexo contrario. El protocolo usado fue el del kit BioPrime Array CGH Genomic Labelling System (Invitrogen), según las recomendaciones del proveedor con mínimas modificaciones.

#### Marcaje

Las muestras se marcaron con dCTP-Cy3 o dCTP-Cy5 según la muestra mediante el enzima klenow. En cada tubo de PCR se mezclan:

- 300-400 ng de ADN genómico.
- 20 µl de 2,5x Primer Mix del kit.
- Se ajusta el volumen hasta 42 µl con H<sub>2</sub>O mQ autoclavada.
- Se desnaturalizan 10 min a 99°C en el termociclador.

Se añade:

- 5 µl de 10x dNTP mix (dATP, dTTP y dGTP a 2 mM, dCTP a 1,2 mM).
- 2 µl de dCTP-Cy3 ó dCTP-Cy5 1 mM (dependiendo de la muestra).
- 1 µl Klenow (40 U/µl) del kit.
- Se incuba toda la noche a 37°C.
- Se eliminan los nucleótidos no incorporados de cada muestra por separado mediante el kit Qiaquick PCR purification, Qiagen.

## MATERIAL Y MÉTODOS

- Para determinar la cantidad de fluorocromo incorporado se mide la absorbancia de las muestras a 532 y 650 nm mediante un Nanodrop.

### **Precipitación de las sondas**

En el mismo tubo eppendorf se mezclan:

- 50 µl muestra marcada con Cy3.
- 50 µl muestra marcada con Cy5.
- 100 µl Cot-1 (100 µg).
- 20 µl NaAC 3M, pH 5.2.
- 500 µl etanol 100 % frío.
- Se mezclan los tubos por inversión y se incuban como mínimo 1 hora a -20°C.
- Se centrifugan 30 min, 13200 rpm, 4°C.
- Se descarta el sobrenadante y se deja secar el botón al aire (tapado con papel de aluminio para proteger de la luz).

### **Hibridación:**

- Se resuspenden los botones celulares en 23 µl de solución de hibridación (cubreobjetos 22x22) o en 70 µl si son cubreobjetos de 24x60 mm.
- Se depositan los 23 ó 70 µl sobre un cubreobjetos y se coloca el chip (portaobjetos) encima.
- Se coloca el chip en una cámara de Corning y se dejan hibridando 40 horas a 45°C en un horno de hibridación en rotación.

### **Lavados post hibridación:**

- 1 x 50% formamida, 2xSSC, 0.1% SDS durante 20 min, a 45°C con agitación.



- 2 x 0.2x SSC, 10 min, a temperatura ambiente y en rotación.
- 1 x H<sub>2</sub>O mQ, 10 min, a temperatura ambiente y en rotación.
- Se centrifugan a 1500 rpm, 5 min, a temperatura ambiente.

**Lectura de los arrays:**

La lectura de los arrays se realizó mediante escaneo de los portaobjetos en el escáner Agilent G2565BA Microarray Scanner (Agilent Inc.), y las imágenes adquiridas se analizaron mediante el software GenePix Pro 6.0 (Axon, Molecular Devices). Los datos extraídos son filtrados y normalizados (normalización lowess) mediante el software Bacanal, en el que se obtiene un  $\log_2$ ratio y una desviación estándar para cada clon de la hibridación. Los desequilibrios genómicos se determinan en base al  $\log_2$ ratio Cy5/Cy3 de las cuatro réplicas de cada clon, considerando que existe una ganancia o una pérdida cuando los valores son mayores de 0.2 o inferiores a -0.2, respectivamente.

**4.3.7.2 Array oligos Agilent 244K.**

Contiene ~240000 sondas de oligonucleótidos distribuidos por todo el genoma, con una resolución media de ~12.29 Kb. Este protocolo consta de 4 fases principales:

- Digestión.
- Marcaje.
- Hibridación.
- Lavados.

**Digestión con enzimas de restricción**

- Se digieren 1000 ng de ADN genómico. Se ajusta el volumen a 22.4  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O miliQ nucleasa free.

## MATERIAL Y MÉTODOS

- Se añaden 5 unidades (0.5  $\mu\text{l}$  de cada uno) de los enzimas AluI y AfaI (GE Healthcare) y 2.6  $\mu\text{l}$  de tampón T.
- Se incuban 2 horas a 37°C, y posteriormente 20 minutos a 65°C para inactivar los enzimas.
- Se comprueba la digestión mediante la migración en un gel de agarosa, en el que debe aparecer un *smear* de 200-500 pb.

### Marcaje

- Se emplea el kit de marcaje de Agilent cat.5188-5309.
- Se añade a cada tubo de reacción 5  $\mu\text{l}$  de 2.5x *random primer solution*.
- Se incuba 3 minutos a 95°C y después 5 minutos en hielo.
- Se prepara la mix de reacción para cada muestra:
  - 2  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O *nucleasa free*.
  - 10  $\mu\text{l}$  tampón 5x.
  - 5  $\mu\text{l}$  10x dNTP mix.
  - 3  $\mu\text{l}$  Cy5 ó Cy3 dUTP.
  - 1  $\mu\text{l}$  enzima Klenow.
- Se dispensan 21  $\mu\text{l}$  de mix de reacción en cada tubo.
- Se incuban las reacciones 2 horas a 37°C, a continuación 20 minutos a 65°C para inactivar los enzimas.

### Limpieza de las reacciones con columnas Microcon Y-30:

- Se añaden 430  $\mu\text{l}$  TE 1x a cada reacción y se traspasan a una columna Microcon.
- Se centrifuga 10 minutos a 8000 rpm.
- Se añaden 480  $\mu\text{l}$  de TE 1x, se centrifuga 10 minutos a 8000 rpm.
- Se invierte el filtro de la columna en un tubo de recolección nuevo y se eluye el ADN centrifugando 1 minuto a 8000 rpm.

- Se ajusta el volumen a 80.5  $\mu\text{l}$  con TE 1x. En el caso de que el volumen eluído sea mayor se vuelve a centrifugar la columna.
- Se realiza el control de calidad del marcaje mediante las mediciones de absorbancia con Nanodrop. Los valores que debemos obtener para considerar el marcaje como óptimo son:
  - Pmol Cy5 > 150 pmol.
  - Pmol Cy3 > 200 pmol.
  - ~5  $\mu\text{g}$  ADN.
  - Pmol dye/ $\mu\text{g}$  ADN > 7.

### **Hibridación**

- Se añade a cada tubo de reacción:
  - 158  $\mu\text{l}$  muestra.
  - 50  $\mu\text{l}$  Human COT-1 ADN (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ).
  - 52  $\mu\text{l}$  10x *Agilent Blocking agent*.
  - 260  $\mu\text{l}$  tampón hibridación Agilent 2x.
- Se incuba 3 minutos a 95°C, 30 minutos a 37°C.
- Se centrifuga 1 minuto a 13200 rpm.
- Se pipetea la muestra sobre un cubreobjetos de 24x60 mm.
- Se coloca el porta con el array de Agilent sobre el cubre, y se monta dentro de la cámara de hibridación.
- Se introduce la cámara en el horno de hibridación a 65°C durante 40 horas a 20 rpm.

### **Lavados hibridación**

Todos los tampones de lavado son filtrados con filtros millipore (poro 0.22  $\mu\text{m}$ ) antes de usarse. El cuarto donde se realizan los lavados tiene que ser libre de ozono.

- Se desmonta el array dentro de una cubeta a temperatura ambiente con la solución de lavado WB1.

## MATERIAL Y MÉTODOS

- Se cambia el portaobjetos a una cubeta con la solución de lavado WB2, incubando 5 minutos en agitación.
- 1 minuto en agitación 37°C con solución WB2 precalentada.
- 1 minuto en agitación, en una cubeta de acetonitrilo, a temperatura ambiente.
- 30 segundos en cubeta con DSS, en agitación. Se saca la cestilla con los portas lentamente.
- Se colocan los arrays en el scanner para leer las intensidades de fluorescencia de cada canal.

### **Análisis de los resultados**

Los arrays de oligonucleótidos se emplearon en las muestras obtenidas a partir de la microdissección de cromosomas. Por tanto, en lugar de comparar la intensidad de ratio de los dos canales (muestra vs control), se analizaron los datos solo en el canal de la muestra teniendo en cuenta la presencia o ausencia de señal sobre los oligonucleótidos localizados en los cromosomas de interés.

#### **4.3.7.3 Array SNPs Illumina 370k.**

Este array de alta densidad contiene ~370000 sondas de oligonucleótidos, con una resolución media aproximada de ~8 Kb. El protocolo de hibridación se realizó en el Centro Nacional de Genotipado de Barcelona (CEGEN) siguiendo las indicaciones del proveedor.

#### **4.3.8 PCR cuantitativa con SYBR green**

Hemos comparado la expresión de los genes *PHF21A* o *GOLGA1* con respecto al gen control *PBGD* mediante el fluorocromo *Sybr*

*green*. En cada pocillo de la placa de PCR cuantitativa se realiza una reacción de PCR independiente, con la siguiente mezcla de reacción:

H <sub>2</sub> O	8.64 µl
Mix Sybr	10 µl
Primer F 100 µM	0.18 µl
Primer R 100 µM	0.18 µl
cADN	1 µl

Cada una de las muestras se realiza por triplicado, y como referencia de curva estándar se realizó un banco de diluciones de un ADNc (100, 50, 25, 12.5, 6.25).

El programa PCR que se utilizó fue: 50°C 2', 94°C 15', 40 ciclos de 94°C 30'', 58°C 30'', 72°C 30''; extensión final de 72°C 7'; y finalmente curva disociación: 95°C 15'', 60°C 15'', 95°C 15''.

El *SYBR green* es un fluorocromo no específico que se intercala entre las hebras de doble cadena de ADN. Por tanto, la cantidad de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de ADN de la muestra (producto). Una vez terminada la PCR, realizamos una curva de disociación o de desnaturalización. Al desnaturalizarse el producto se van liberando las moléculas de SYBR green y el nivel de emisión de fluorescencia disminuye. Esto facilita el análisis de los diferentes productos de PCR que haya en una muestra o incluso de inespecificidades (dímeros de primer), puesto que cada una de ellas tendrá una temperatura de *melting* (T<sub>m</sub>) diferente. Una PCR sin productos inespecíficos tendrá por tanto una curva de disociación con un solo pico.

Cada una de las muestras se realizó por triplicado, y se analizó el resultado de cada uno de ellos. La desviación estándar entre triplicados debe ser <0.3 para que pueda ser analizada.

El análisis se realizó teniendo en cuenta la media de los triplicados para cada una de las muestras, comparando las medias obtenidas para el gen problema y el gen control. Las medias del gen problema se normalizaron con respecto al gen control, y posteriormente se comparó el resultado entre la muestra de la paciente y los controles.

### **4.3.9 Northern blot**

La técnica de Northern Blot es análoga al Southern blot, usando ARN en lugar de ADN. Debido a que el ARN es de una sola hebra (monocatenario), a diferencia del ADN, algunos ARNs pueden formar estructuras secundarias, por lo que deben ser migrados por electroforesis en condiciones desnaturizantes (añadiendo formaldehído al gel de agarosa). Además, para evitar la contaminación y degradación de las muestras con ARNsas, los reactivos deben ser preparados con H<sub>2</sub>O destilada estéril pretratada con dietilpirocarbonato (DEPC).

Se emplearon 25 µg de ARN total (a partir de células de línea linfoblastoide) del caso de la paciente con la translocación 1, y de 4 líneas celulares control. Como sondas se usaron las secuencias correspondientes a los exones 7-9 y 16-17 del gen *PHF21A*, los exones 19-23 del gen *GOLGA1*, y como gen control se usó β-actina.

#### **Gel de agarosa**

- Gel agarosa 1%: 1 g agarosa, 72 ml H<sub>2</sub>O DEPC. Se hierve en un microondas.

- Una vez disuelta la agarosa, se deja enfriar hasta 60-70°C. Se añaden 10 ml de MOPS 10X y 18 ml de formaldehído al 37%.
- Se deja polimerizar el gel unos 30 minutos.

### Preparación de la muestra

- Se cuantifican 25 µg de ARN total, se añade a cada muestra 5 µl MOPS 10x, 9 µl formaldehído 37% y 25 µl de formamida. Se mezcla bien mediante vórtex, y se incuba 15 minutos a 55°C en un termoblock.
- Antes de cargar las muestras en el gel se añaden 10 µl de tampón de carga y 0.3 µl de bromuro de etidio.
- Se migra el gel 10 minutos a 45V para que entren bien las muestras en el gel, y después se deja unas 3 horas a 65V.
- Se aclara el gel 3 x 10 min en H<sub>2</sub>O destilada para retirar el formaldehído.
- Se equilibra el gel 10 minutos con el tampón de transferencia (10xSSC).
- Se realiza una fotografía al gel en el transiluminador UV con la cubeta reglada localizando los ARNr.

A partir de este punto el protocolo que se sigue es el mismo que para el Southern Blot (transferencia, fijación de las muestras a la membrana, prehibridación, marcaje de las sondas, hibridación, lavados posthibridación y detección de la radioactividad).

#### SOLUCIONES:

Tampón FA 10x (MOPS tampón electroforesis)  
 MOPS 200 mM  
 acetato sódico 50 mM  
 EDTA pH 7 10mM  
 pH a 7.5

Para 250 ml: 11.55 g MOPS  
 4.15 ml NaAC 3M  
 5 ml EDTA 0.5M  
 200 ml H<sub>2</sub>O DEPC

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Solución de prehibridación (500 ml):

12.5 ml KPO<sub>4</sub> pH 7.4  
125 ml 20xSSC  
50 ml Denharts 50x  
5 ml ADN esperma salmón  
desnaturalizado  
(hervimos previamente 10 minutos en  
baño a 100°C)

250 ml formamida  
57.5 ml H<sub>2</sub>O destilada

### Solución hibridación (500 ml):

12.5 ml KPO<sub>4</sub> pH 7.4  
125 ml 20xSSC  
50 ml Denharts 50x  
5 ml ADN esperma salmón  
desnaturalizado

(hervimos previamente 10 minutos en  
baño a 100°C)

250 ml formamida  
57.5 ml H<sub>2</sub>O destilada  
50 g dextran sulfate

A toda la noche para homogeneizar la  
solución.

### Tampón de electroforesis 1x

100 ml tampón FA 10x  
20 ml formaldehído 37%  
880 ml H<sub>2</sub>O destilada  
Tampón de carga  
Azul de bromofenol 0.25%  
cianol xileno 0.25%

### 4.3.10 Western blot

Se realizó esta técnica a partir de extracto proteico de cultivos de líneas celulares, en el caso de la paciente con la translocación 1, y de líneas celulares control.

#### Extracción de proteínas

- A partir de un cultivo de línea celular se obtiene un botón de células.
- Se resuspende el botón con 100-200 µl de tampón de lisis.
- Se agita durante 30-60 minutos a 4°C para que se produzca la lisis celular.
- Se centrifuga 10 minutos a 13200 rpm a 4°C.
- Se recupera el sobrenadante y se guarda a -80°C.

#### Cuantificación de la concentración de proteínas mediante el método Bradford:

Primero se realiza una curva estándar de concentración con BSA (albúmina de suero bovino).

	BSA 0.1 mg/ml	H2O	Total
BSA 0.5 µgr/ml	5 µl	795 µl	800 µl
BSA 1 µgr/ml	10 µl	790 µl	800 µl
BSA 2 µgr/ml	20 µl	780 µl	800 µl
BSA 4 µgr/ml	40 µl	760 µl	800 µl
BSA 8 µgr/ml	80 µl	720 µl	800 µl



- Se preparan las muestras que se van a cuantificar: 2  $\mu$ l de extracto proteico y 798  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O.
- Se prepara el blanco: 800  $\mu$ l H<sub>2</sub>O.
- Se añaden a todos los tubos 200  $\mu$ l de reactivo Bradford (dilución 1:5).
- Se mezcla mediante vórtex.
- Se lee la concentración en un espectrofotómetro con la absorbancia 595 nm.

### **Gel de acrilamida**

El gel se monta entre unos vidrios separadores, sujetos por unos tensadores. La parte superior del gel es el concentrador (*stacking*), y la parte inferior la separadora (*separating*).

- Se preparan 15 ml del gel separador. Se introduce con cuidado con una pipeta entre los vidrios separadores montados, y cuando esté polimerizado (aproximadamente 1 hora), se prepara el gel concentrador.

### **Preparación de las muestras:**

- Se mezclan 40  $\mu$ g de extracto de proteínas con 10  $\mu$ l de tampón de carga.
- Se desnaturalizan las proteínas incubando las muestras 5 minutos en un termoblock a 100°C.
- Se centrifugan para recoger la muestra en el fondo del tubo.
- Se cargan las muestras en el gel con una micropipeta.
- Como marcador de peso molecular se usa *precision plus protein standards dual color*, Bio-Rad (ref. 161-0374).
- Se migran las muestras 1 hora a 80 V y toda la noche a 57 V.

### **Transferencia gel- membrana**

- Se pretrata la membrana de nitrocelulosa (Inmobilon-P transfer membrana. Cat No. IPVH00010, pore size: 0.45  $\mu\text{m}$ ) sumergiéndola en una cubeta con metanol durante 15 minutos.
- Se aclara con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.
- Se trata con el tampón *semy dry transfer* y se coloca el gel encima de la membrana.
- Se coloca el montaje sobre dos papeles watman húmedos en el aparato de transferencia (*Trans blot SD semi-dry transfer cell*, Bio Rad), asegurándonos de que no queden burbujas entre el gel y la membrana.
- Se transfiere 3 horas a 150 mAmp.

### **Hibridación y lavados del anticuerpo**

- Se bloquea con TBS-T 1X con 5% BSA 1 hora en balanceo a temperatura ambiente.
- Se realizan dos lavados de 5 minutos con TBS-T.
- Se diluye el anticuerpo primario con TBS-T (1:200 a 1:1000, dependiendo del anticuerpo).
- Se deja hibridando toda la noche en oscilación a 4°C.
- Se realizan 3 lavados de 5 minutos en TBS-T, a temperatura ambiente y balanceo suave.
- Se diluye el anticuerpo secundario con TBS-T (1:5000 a 1:20000)

### **Los anticuerpos primarios utilizados fueron:**

- PHF21A (BHC80) monoclonal de ratón (región C terminal del gen PHF21A, correspondiente a los aminoácidos 331-431). Las diluciones usadas fueron 1:800; 1:1000.

- Anticuerpo policlonal de conejo de GOLGA1 (región C Terminal, derivado de los residuos 750), con una dilución 1:200.
- Anticuerpos controles: Tubulina (1:5000), Beta-actina (1:5000), y GADPH (1:3000).

**SOLUCIONES:**

Lysis tampón

25 mM Tris-HCl pH8  
 100 mM KCl  
 5 mM NaF  
 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>  
 1 mM Na<sub>7</sub>P<sub>2</sub>O<sub>4</sub>  
 1 tableta de cocktail antiprotease (Complete Mini, protease inhibitor cocktail tablets, ref. 11 836 153 001, Roche)  
 10% Glicerol  
 H<sub>2</sub>O mQ  
 0.5% NP40  
 0.1% Triton X-100

Gel separador

5.3 ml H<sub>2</sub>O  
 5.6 ml Tris HCl 1M pH 8.8  
 3.9 ml acrilamida 29:1  
 150 µl SDS 10%  
 60 µl APS 10%  
 14 µl temed  
 (N,N,N,N'-tetrametilnediamina)

Gel concentrador

3.647 ml H<sub>2</sub>O  
 646 µl acrilamida 29:1

625 µl Tris HCl 1M pH 6.8

50 µl SDS 10%

12 µl temed

Tampón de carga

2 ml Tris-HCl pH 6.9 1M

0.4 ml β-mercaptoetanol

4 ml SDS 20%

0.04 g azul bromofenol

4 ml glicerol 100%

Running tampón 10X

144 g glicina

30.2 g Tris base

10 g SDS

1 l H<sub>2</sub>O d

Semy-dry transfer tampón 10X

144 g glicina

30.2 Tris base

1 l H<sub>2</sub>O d

Semi-dry transfer tampón 1x

700 ml H<sub>2</sub>O d

200 ml metanol

100 ml tampón semi-dry transfer 10x

TBS-T 10x

93.7 g NaCl

100 ml Tris-HCl pH 8 1M



## **5. RESULTADOS**



## 5.1 Pacientes estudiados

Los resultados se han agrupado según la presencia o no de desbalance genético en dos categorías: anomalías balanceadas (portadores de translocaciones) y no balanceadas (portadores de cromosomas marcadores), y no en el orden de estudio cronológico. Por tanto, las técnicas empleadas en cada caso han sido diferentes, ya que a medida que se han ido desarrollando nuevas metodologías, por ejemplo array CGH, las hemos ido incorporando a la caracterización de estos casos.

### 5.1.1 ANOMALÍAS NO BALANCEADAS

#### 5.1.1.1 Marcador 1: SMC(6).

El estudio del cariotipo en sangre periférica a la edad de 3 meses reveló la presencia de un pequeño cromosoma marcador en mosaico, con fórmula cromosómica inicial  $47,XY,+mar[13]/46,XY[7]$  (fig. X). Ambos padres tenían un cariotipo normal, por lo que el cromosoma marcador era *de novo*.

## RESULTADOS

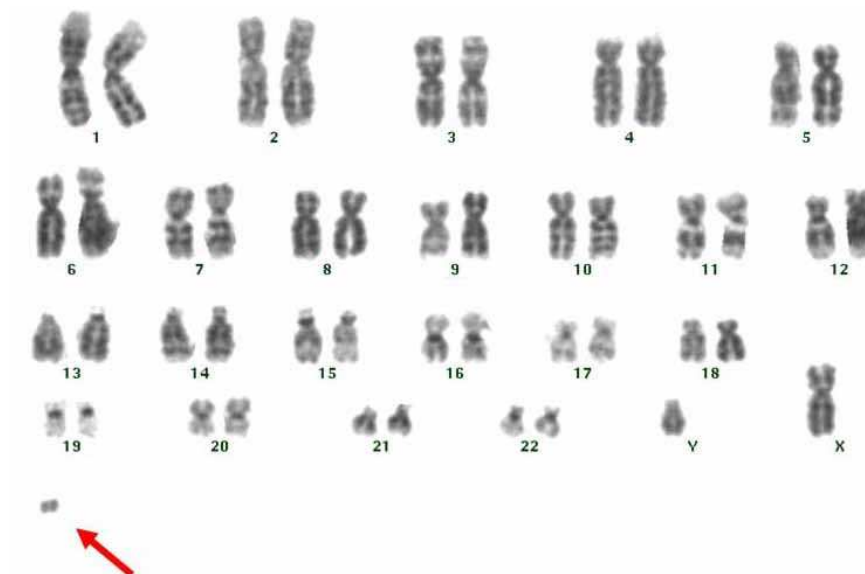


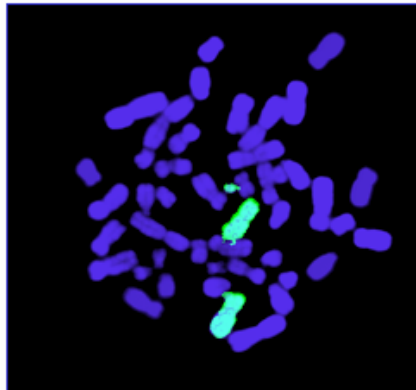
Figura 20. Cariotipo del paciente. Se aprecia un cromosoma marcador de pequeño tamaño (señalado con una flecha).

Para identificar el origen de este cromosoma, se aplicó en primer lugar la técnica de SKY-FISH, que reveló que el material del cromosoma marcador procedía del cromosoma 6 [SMC(6)]. Estos resultados se confirmaron con la técnica de pintado cromosómico (WCP o *whole chromosome paint*) específica para el cromosoma 6: ambos homólogos y el cromosoma marcador estaban completamente marcados. La fórmula cromosómica se definió como 47,XY,+mar.ish mar CEP6+,WCP6+.





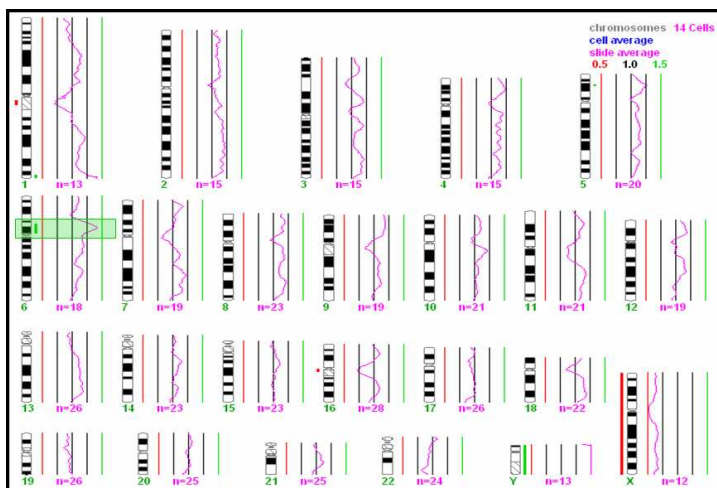
*Figura 21: SKY-FISH. Cada par cromosómico aparece codificado por un color específico.*



*Figura 22: Pintado cromosómico con sonda específica para el cromosoma 6.*

La HGC sobre metafases control mostró una ganancia de material del cromosoma 6 desde la región centromérica hasta 6p11.2.

## RESULTADOS



*Figura 23: Ideograma de los perfiles cromosómicos obtenidos con HGC. Hay una ganancia en la región 6p más cercana al centrómero; como control interno los cromosomas sexuales tienen patrón de pérdida para cromosoma X y ganancia para el Y al ser de sexo opuesto los ADN híbridos.*

Para definir el origen parental del cromosoma marcador se realizó un genotipado con marcadores microsatélite localizados en 6p11.2 (D6S257), 6p21.2 (D6S1610) y 6q15 (D6S462), que reveló la presencia de tres alelos en el locus 6p11.2, con presencia de material de ambos cromosomas homólogos de origen materno. El marcador D6S1610 presentaba dos alelos, mientras que el marcador D6S462 resultó no informativo.

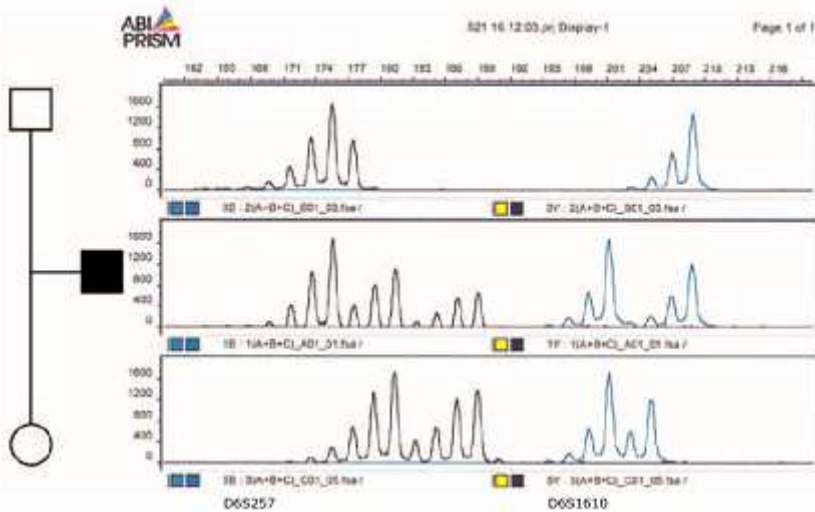


Figura 24: Gráfico de los marcadores microsatélites D6S257 y D6S1610.

Por lo tanto, el origen del cromosoma marcador se determinó como materno generado en meiosis I, ya que proviene de cromosomas diferentes. La presencia de alelos de origen paterno en todos los *loci* del cromosoma 6 descartó la existencia de UPD para este cromosoma.

Para poder determinar de manera más precisa los puntos de rotura y el tamaño del SMC, se aplicó la técnica de FISH mediante sondas no comerciales basadas en clones BACs, que permitió demarcar los puntos de rotura del cromosoma marcador en 6p21.1 entre los clones RP11-400E17 y RP11-444C15 (Mb 43-44) y el centrómero (Mb 59-60). Por tanto, el tamaño de la región trisómica (correspondiente al cromosoma marcador) se estableció en ~16 Mb aproximadamente conteniendo ~60 genes anotados (desde *SPATS1* hasta *C6orf216*) para los que el paciente presenta trisomía en las células que contengan el SMC(6).

## RESULTADOS

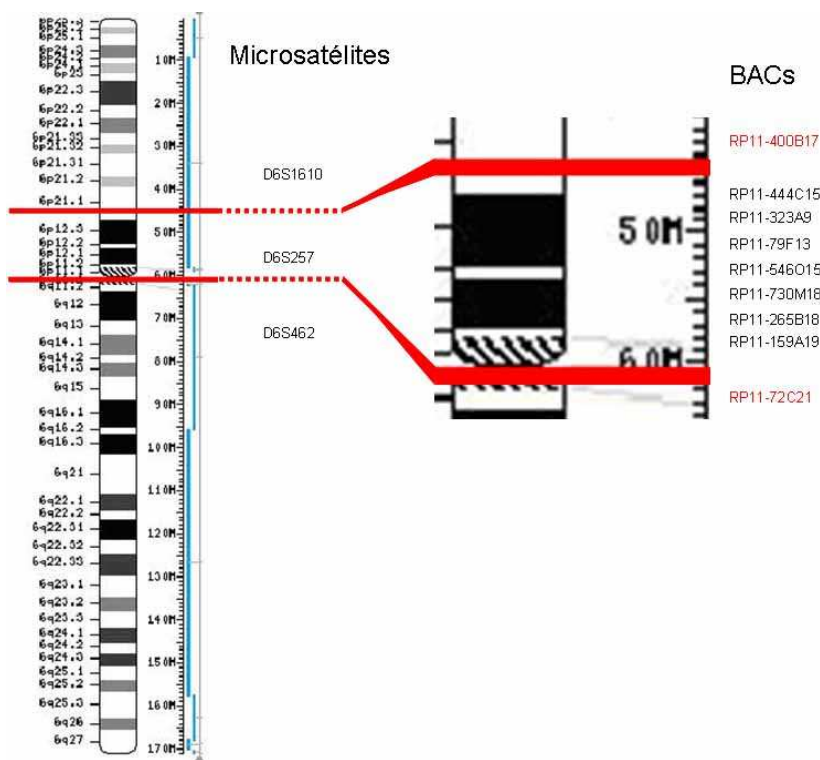


Figura 25: Ideograma del cromosoma 6 señalando la región trisómica.

Se emplearon un total de 10 clones a partir de BACs para localizar el punto de rotura del cromosoma marcador (tabla 6).

Clon (BAC ID)	Localización	Presencia en el cromosoma marcador
RP11-463G18	6p21.1	No
RP11-400E17	6p21.1	No
RP11-444C15	6p21.1	Sí
RP11-323A9	6p21.1	Sí
RP11-79F13	6p21.1	Sí
RP11-546O15	6p21	Sí
RP11-730M18	6p21	Sí
RP11-265B18	6p21/6p12.3	Sí
RP11-159A19	6p12.3	Sí
RP11-72C1	6q11	No

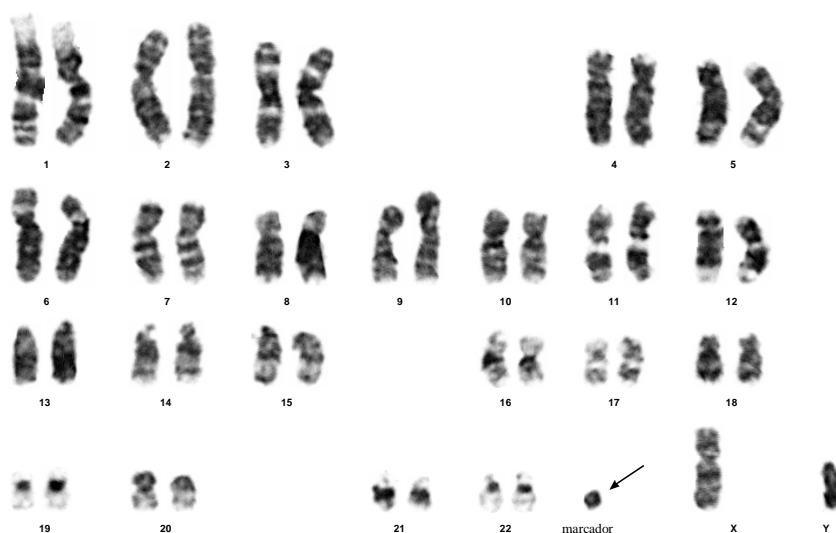
Tabla 6: Listado de los las sondas de FISH empleadas para delimitar el tamaño de la región trisómica.

El estudio citogenético del cariotipo se repitió a las edades de 10 y 18 meses. El mosaicismo del cromosoma marcador descendió del 70% (neonatal) al 30% (18 meses). También se comparó la diferencia en el porcentaje de mosaicismo en distintos tejidos, de origen ectodérmico (con ADN extraído de folículo piloso), mesodérmico (ADN de sangre periférica) y endodérmico (ADN de mucosa bucal) mediante cuantificación relativa de alelos tras PCR de microsatélites informativos. El mosaicismo estimado en sangre periférica fue ~30%, ~55% en mucosa bucal, y ~76% en pelo, aunque en este caso la inferior calidad del DNA extraído hace disminuir la fiabilidad de la técnica. El motivo de esta comparación fue intentar inferir el mosaicismo en el tejido diana del paciente (óseo, con origen mesodérmico), en el que la posible sobreexpresión de los genes del SMC está presumiblemente implicada en el fenotipo.

#### **5.1.1.2 Marcador 2: SMC(10).**

En el cultivo de LA se detectó un pequeño cromosoma marcador extra en mosaico, que se confirmó postnatalmente en cultivo de linfocitos de sangre periférica. El cariotipo se informó como 47,XY,+mar[76]/46,XY[24]. Los cariotipos de los padres eran normales, revelando que el cromosoma marcador era *de novo*.

## RESULTADOS



*Fig. 26. Cariotipo del paciente en el que se señala el cromosoma extra.*

Dada la decisión de continuar la gestación, la caracterización se realizó postnatalmente. La tinción con bandas C demostró la presencia de euromatina en el cromosoma marcador (fig. X).



*Fig. 27. Comparativa de los patrones de tinción obtenidos con bandas C y G en el cromosoma marcador. El cromosoma marcador presenta región de euromatina (zona más clara).*

La subsiguiente hibridación con el array de qGenomics mostró trisomía parcial de casi 12 Mb para la región pericentromérica del cromosoma 10 (10p11.21-10q11.22), desde la Mb 36.11 hasta la

Mb 48.21, una región con 140 genes anotados, entre *PBEF2* (límite proximal en 10p) y *GDF10* (límite distal en 10q).

Los resultados fueron validados mediante genotipado de varios marcadores microsatélite, lo que nos permitió determinar el origen del cromosoma derivativo del 10 como paterno.

<u>Locus</u>	<u>Mb</u>	<u>Marcador</u>	<u>R577 (padre)</u>	<u>DNA 1000 (hijo)</u>	<u>R576 (madre)</u>	<u>Observaciones</u>
10p11.21	35,59	D10S1247	195	195	195-203	
	35,92	D10S1780	229	<b>229</b> -231	223-231	Possible origen paterno (ratio 2:1)
	36,2	D10S1217	164-168	164-168	164-168	
	36,22	D10S1768	158-172	158-172	158-166	
	37	D10S578	92-100	98-100	92-98	
	37,14	D10S1791	<b>199-205</b>	<b>199-205</b>	<b>199-203</b>	Los alelos 203 y 205 son más altos (padres e hijo)
	37,8	D10S508	183-187	183-186	183	
10q11.21	39,54	D10S1746	141	<b>141</b> -143	143	Possible origen paterno (ratio 2:1)
	42,65	D10S513	199-205	<b>205</b> -221	211-221	
	43,44	D10S1669	216-222	216	216-222	
	43,76	D10S1783	161-165	165	159-165	
	44,04	D10S1233	135	135	135	
	44,15	D10S604	108-114	114	114	
	47,5,51.6	D10S225	269-277	<b>267-277</b>	267	Origen paterno
10p15	0,22	D10S249	117-123	123-123	123-123	No informativo
10q26	118,8	D10S587	103-107	95-107	95-95	Herencia biparental- descartada UPD(10)

*Tabla 7: listado de marcadores utilizados y haplotipos obtenidos para los progenitores y el paciente.*

Puesto que el cromosoma duplicado proviene del mismo cromosoma paterno, su origen es en meiosis II o postzigótico.

## RESULTADOS

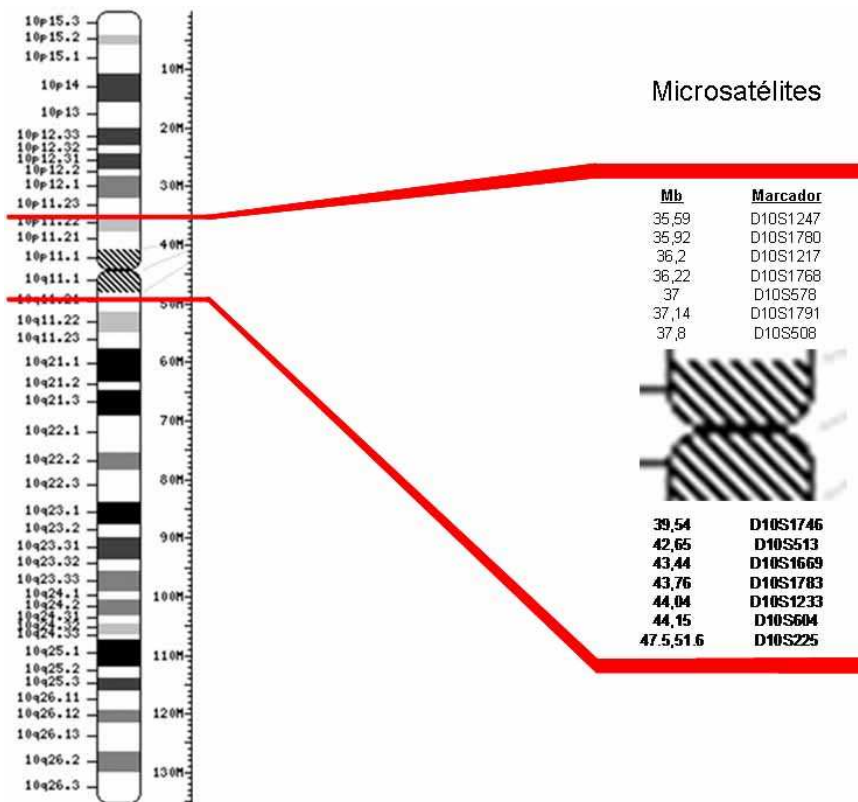


Fig. 28. Ideograma del cromosoma 10 en el que se señala la región duplicada incluida en el cromosoma marcador de este caso.



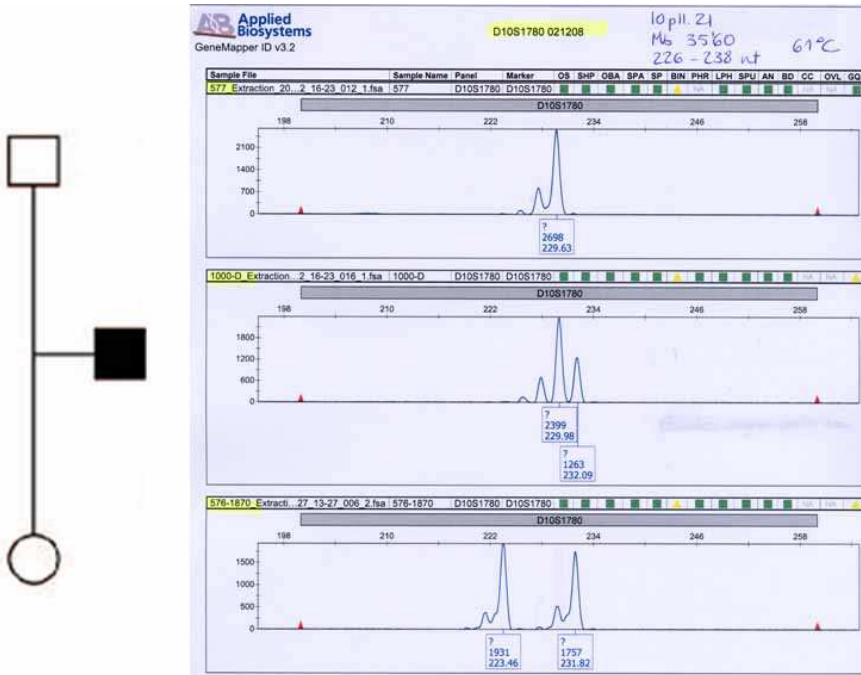


Fig. 29. Imagen de los alelos obtenidos para el marcador D10S1780 para el paciente y sus padres. En el paciente el ratio entre los alelos es 2:1.

Se descartó la presencia de UPD para el resto del cromosoma 10 en *loci* no incluidos en el cromosoma marcador mediante demostración de herencia biparental (marcadores microsatélites en 10p15 y 10q26: D10S249 y D10S587, respectivamente).

### 5.1.1.3 Marcadores 3: SMC(10) + SMC(14).

En estudio prenatal de LA se detectó la presencia de cromosomas marcadores no identificables citogenéticamente, en mosaicismo. La fórmula cromosómica fue 49,XY,+mar1,+mar2,+mar3[9]/48,XY,+mar1,+mar2[20]/47,XY,+mar1[36]. El cariotipo de ambos padres fue normal, demostrando que los cromosomas extras se habían producido *de novo*.

## RESULTADOS



*Fig.30. Metafase del paciente con 48,XY,+mar1,+mar2 en la que se aprecian dos marcadores extra diferentes.*

Para identificar el origen y contenido de los cromosomas marcadores, se hibridó la muestra del paciente con el array de qGenomics. La hibridación con el array mostró ganancia de dosis compatible con trisomía parcial de dos regiones: una de ~3.3 Mb en el cromosoma 10 (10p11.21-cen), y otra de ~2 Mb en el cromosoma 14 (14q11.2). Los valores de Log2R para los BACs del cromosoma 14 fueron mayores en la región cercana al centrómero (~0,5 Mb).

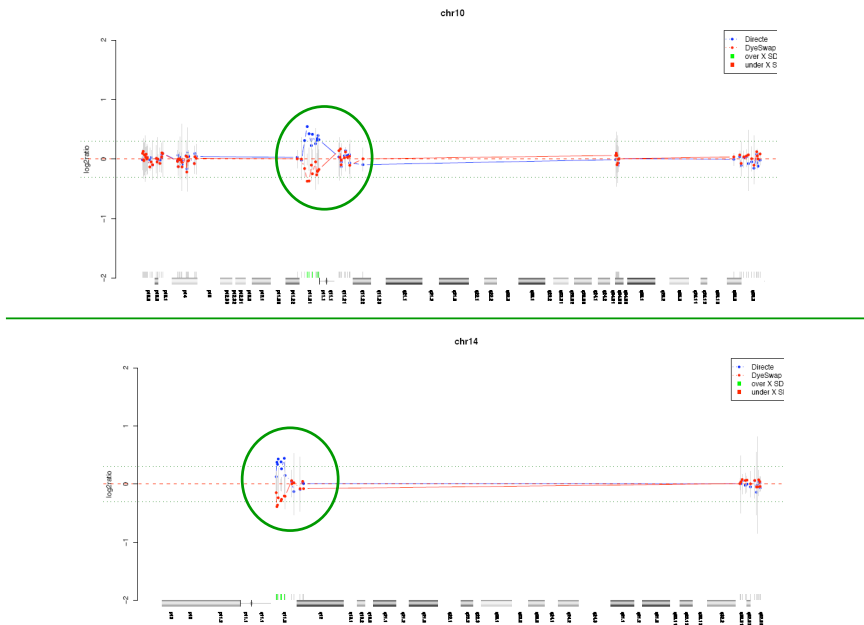


Fig. 31. Ideogramas de los cromosomas 10 y 14 sobre los que se aprecian los clones que aparecen ganados en el array (círculo verde) con marcaje directo (azul) y reverso (rojo).

En el cromosoma 10, la duplicación abarca desde la Mb 35.54 hasta la Mb 38.65. Esta región contiene 22 genes anotados desde *CREM* hasta *LOC1001290*.

El cromosoma marcador del 14 incluye el intervalo entre 19.48-21.48 Mb, que contiene 121 genes anotados desde *OR4K16P* hasta *TRAV9-2*, si bien muchos de ellos son familias de genes y pseudogenes (receptores olfatorios, tRNAs, receptores de linfocitos T,...).

Para validar los resultados obtenidos en el array, se realizaron técnicas de FISH con sondas centroméricas, así como genotipado de marcadores microsatélite para definir el origen del material duplicado, y comprobar si procedían o no del mismo cromosoma.

## RESULTADOS

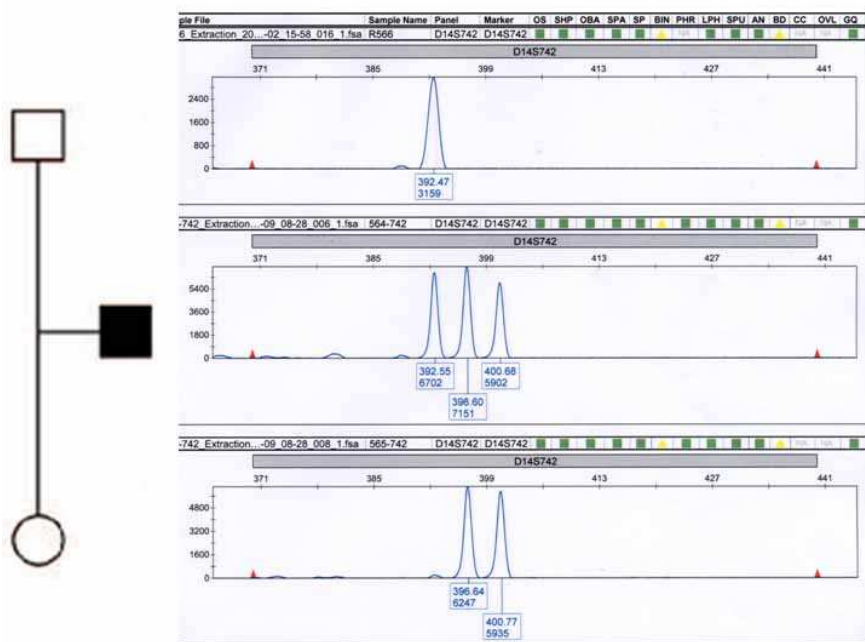


Fig. 32. resultado del marcador D14S742 (14q11.2) en la que el paciente presenta 3 alelos, dos de ellos de origen materno y procedentes de cromosomas diferentes.

Se descartó la presencia de UPD para los cromosomas 10 y 14 en diversos loci no incluidos en los cromosomas marcadores: 10p15 y 10q26 (D10S249, D10S587) y 14q31 (D14S280 y D14S985), en los que el paciente presentó herencia biparental. En la siguiente tabla se resumen los resultados obtenidos para los marcadores microsatélites en el paciente y sus padres.

## RESULTADOS

Locus	Mb	Marcador	R566 (padre)	R564 (hijo)	R565 (madre)	Observaciones
10p11.21	35,59	D10S1247	191-195	187-195	187-195	El alelo 98 en el padre es muy pequeño
	35,92	D10S1780	232-234	230-232	230-232	
	36,2	D10S1217	160-172	160	160	
	36,22	D10S1768	172-176	166-172-176	166-172	
	37	D10S578	90-98	98-100	100	
	37,14	D10S1791	199-203	203-206	206	
37,8	D10S508	179-183	183-187	183-187		
14q11.2	19,91	D14S261	297	275-297	275-297	Origen materno SMC(14)
	20,27	D14S499	371-381	377-381	377	
	21,27	D14S742	392	392-396-400	396-400	
14q31	68	D14S68	318-324	324	324	NO UPD(14) materna ni paterna
	72	D14S280	247-249	245-249	245	
	81	D14S985	254	252-254	252	
10p15	0,22	D10S249	123-131	119-131	119-119	Herencia biparental, descartada UPD(10) No informativo
10q26	118,8	D10S587	95-105	95-105	95-99	

### FISH CEP10+CEP 14/22:

Hay 3 señales CEP10 en todos los núcleos, y 1-2 señales extra de CEP 14/22 en algunos núcleos.

Tabla 8. Haplotipos obtenidos en el paciente y sus progenitores para diversos marcadores microsatélites de los cromosomas 10 y 14.

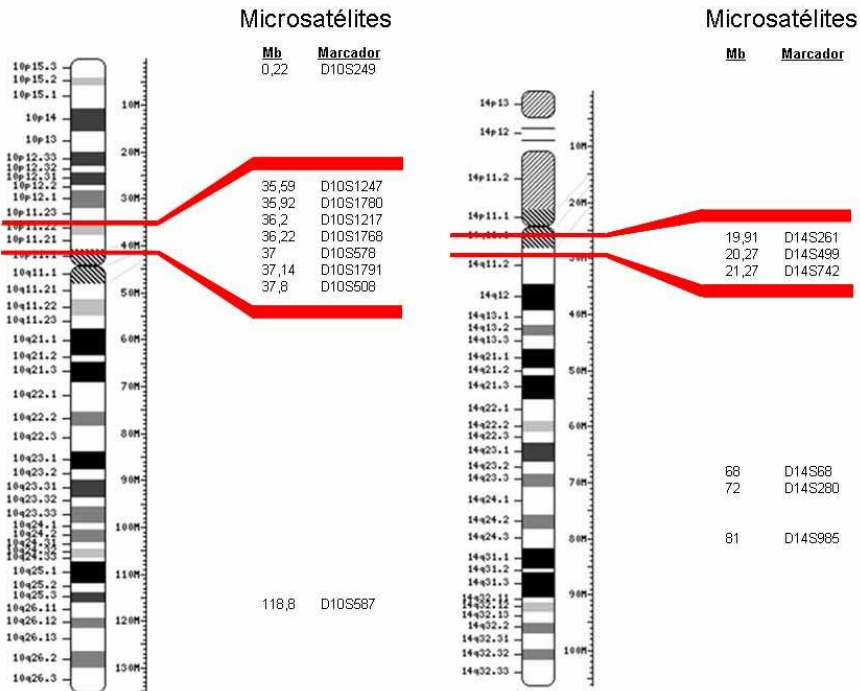


Fig. 33. Ideogramas de los cromosomas 10 y 14, en los que se señalan con líneas rojas las regiones duplicadas incluidas en los cromosomas marcadores.

#### 5.1.1.4 Marcador 4: SMC(7).

En este caso se detectó la presencia de un cromosoma marcador en mosaico en un cariotipo prenatal a partir de LA, que se confirmó postnatalmente. La fórmula cromosómica fue 47,XY,+mar[76]/46,XY[24].



*Fig. 34. Cariotipo del paciente. El cromosoma marcador está señalado con una flecha.*

El cariotipo paterno fue normal, mientras que no fue posible analizar muestra materna. El niño había sido concebido tras FIV por donación de óvulos. La caracterización del marcador se realizó postnatalmente.

En un principio el cromosoma marcador se identificó como procedente del cromosoma 7 por la técnica de M-FISH, lo que se confirmó mediante pintado cromosómico específico.

La caracterización y origen parental del cromosoma se determinó mediante array CGH de BACs (qGenomics), de SNPs (Illumina

370K), MLPA específico para genes del cromosoma 7 y genotipado de múltiples marcadores microsatélite.

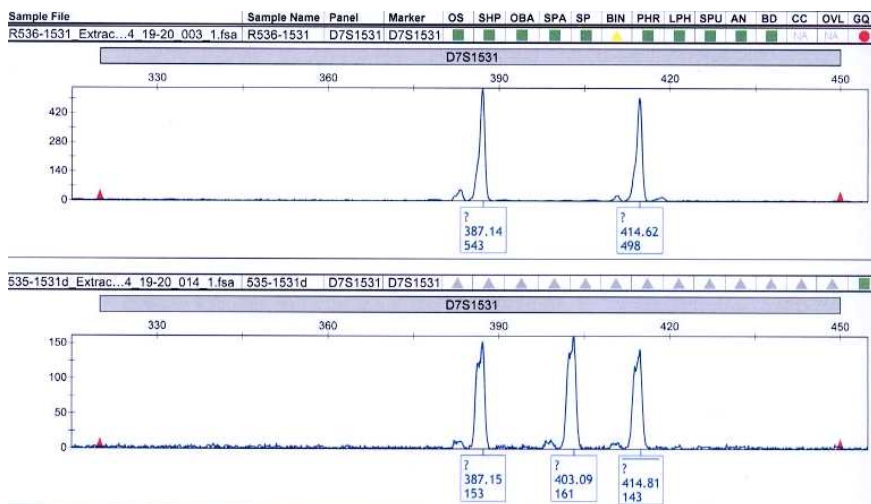
<u>Locus</u>	<u>Mb</u>	<u>Marcador</u>	<u>R536 (padre)</u>	<u>R535 (hijo)</u>	<u>Observaciones</u>	<u>Array SNPs Illumina 370K</u>
7p22.3	3,2	D7S531	282-287	282		
7p22.2	4,4	D7S517	252-256	252-256		
7p14.2	35,2	D7S484	105-113	111-113		
7p12.1	51,1	D7S2422	192-194	192		
7p11.2	53,4	D7S1911	95	95	<b>Duplicación qCHEAP</b>	<b>Duplicación Illumina 370 K</b>
7p11.2	55,57	D7S499	239-247	247-249	desde RP11-47L10 (7p12.1, Mb 53.46)	desde Mb 52.88
7p11.2	<b>56,1</b>	<b>D7S1531</b>	<b>387-414</b>	<b>387-403-414</b>	hasta RP11-237O15 (7p11.1, Mb 57.17)	hasta cen (Mb 58)
7q11.22	64-65	D7S3250	121-125	121-125		
7q11.22	66	D7S663	164-166	160-164		
7q11.23	66,7	D7S502	278-280	278-282		
7q11.23	69	D7S2500	117-119	117-119		
7q11.23	71	D7S672	138-140	140-142		
7q11.23	71	WS4.4	197	197-205		
7q11.23	71	GUIM	172-184	172		
7q11.23	71	D7S7280 (CUTL1)	305	305-309		
7q22.1	101	D7S515	169	163-169		
7q36.1	148	D7S2426	113-115	113-115		
7q36.1	148	D7S688	148-150	148-152		
7q36.1	150	D7S636	154-156	154-166	400 Kb proximal a CRYGN	<b>Duplicación Illumina 370 K</b>
7q36.1	150	D7S642	188	188	200 Kb proximal a CRYGN	desde Mb 150.345
7q36.1	150,766	CRYGN- MLPA	normal	duplicado		
7q36.1	<b>150,769</b>	<b>D7S2439</b>	<b>199-201</b>	<b>193-199-201</b>	alelo 201 ratio 0.6	hasta 152.026
7q36.2	152	D7S798	no salió	no salió		
7q36.3	155	D7S550	201	197-201		
7q36.3	<b>155</b>	<b>D7S2465</b>	<b>338-346</b>	<b>334-336</b>	Compatible con UPD materna	
7q36.3	156	D7S559	70	70		
7q36.3	156,8	D7S2423	245-249	245		

*Tabla 9: Listado de marcadores microsatélites empleados en la muestra del paciente y su padre, localización cromosómica y duplicaciones observadas en los arrays de qGenomics e Illumina 370K.*

Mediante análisis de marcadores microsatélite se observó trisomía parcial de 7p11 por duplicación de los loci D7S1531 (7p11.2), y paradójicamente también de D7S2439 (7q36.1) mientras que los marcadores intermedios y distales de 7q demostraron disomía con herencia biparental. No pudo confirmarse el origen parental del marcador debido a la ausencia de muestra materna. La presencia de alelos correspondientes con los del padre en todos los loci analizados sugirió no obstante un origen paterno.

La existencia de tres alelos distintos indicó un origen en meiosis I del cromosoma marcador. Se descartó UPD en múltiples loci del resto del cromosoma.

## RESULTADOS



*Fig. 35. Imagen de los alelos obtenidos para el marcador D7S1531 (7p11.2, Mb 56.1). En la parte superior está la muestra paterna, y en la inferior la del paciente, en la que se observan 3 alelos. No se puede determinar el origen parental al no tener muestra materna. En cualquier caso, el origen tiene que ser en meiosis I, ya que se origina a partir de cromosomas diferentes.*

El análisis por MLPA de múltiples sondas del cromosoma 7 detectó una duplicación del gen *CRYGN*, localizado en 7q36.3 (Mb 150.766).



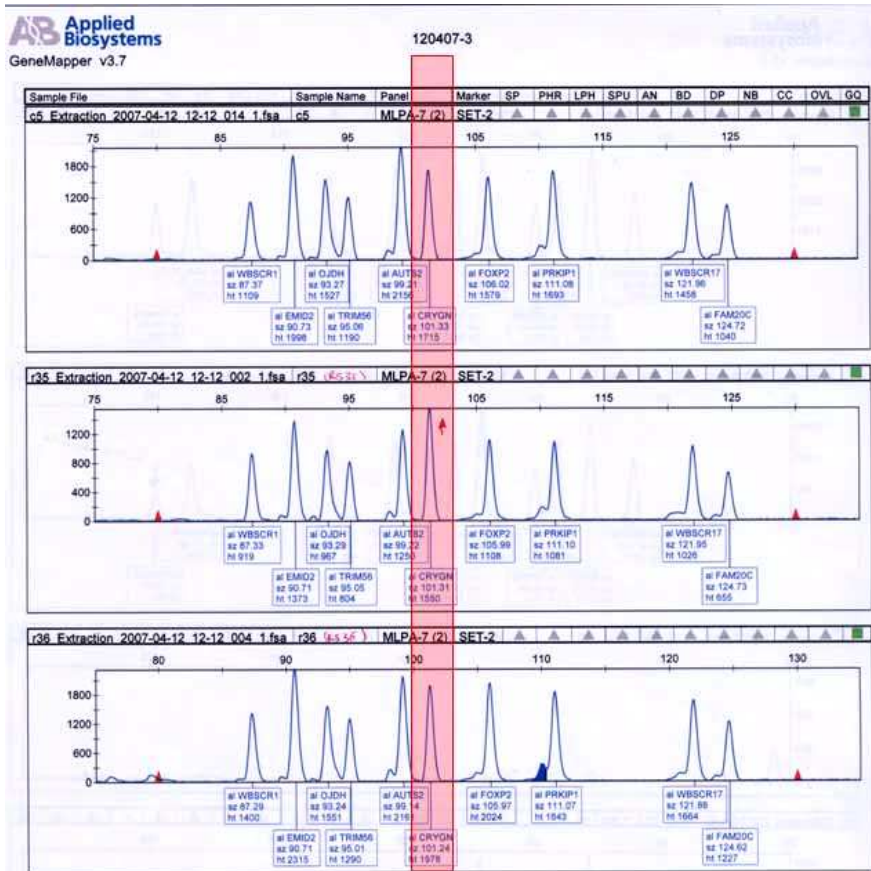
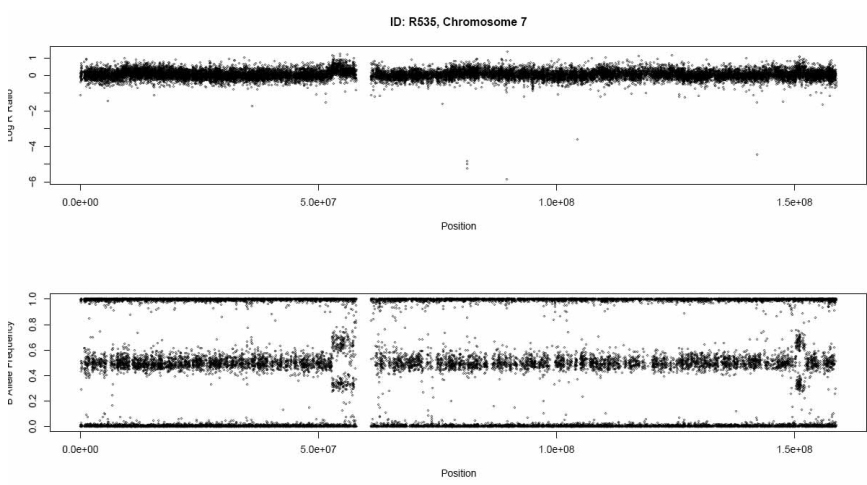


Fig. 36. Patrón de los picos obtenidos para el MLPA específico del cromosoma 7. En la parte superior hay una muestra control, en la media el paciente, mientras que en la inferior está la muestra del padre del paciente. Está señalado el pico correspondiente al gen CRYGN, en el que el paciente presenta un incremento de altura con respecto al resto de sondas.

Estos resultados se validaron mediante la hibridación con los arrays de BACs (aCGH) y de SNPs, revelando una región duplicada de ~4.72 Mb desde 7p12.1 (Mb 53.46) hasta el centrómero (Mb 58), así como una duplicación intersticial de ~1.7 Mb en 7q36.3 (en la Mb 150). La región 7p11.2-cen contiene 17

## RESULTADOS

genes anotados, desde *FLJ45974* hasta *LOC401357*. En la región de 7q36.3 hay 23 genes descritos, desde *NOS3* hasta *XRCC2*.



*Fig. 37. Plot del cromosoma 7. En la parte superior de la imagen están representados los valores de log ratio obtenidos para todos los SNPs de este cromosoma. Se pueden apreciar dos regiones con aumento de logratio. En la parte inferior está representada la frecuencia del alelo B (BAF), en la que se aprecia con claridad las regiones en las que hay un desequilibrio para los dos alelos.*

No se detectaron variaciones en número de copias relevantes en otras regiones genómicas en ninguno de los arrays.

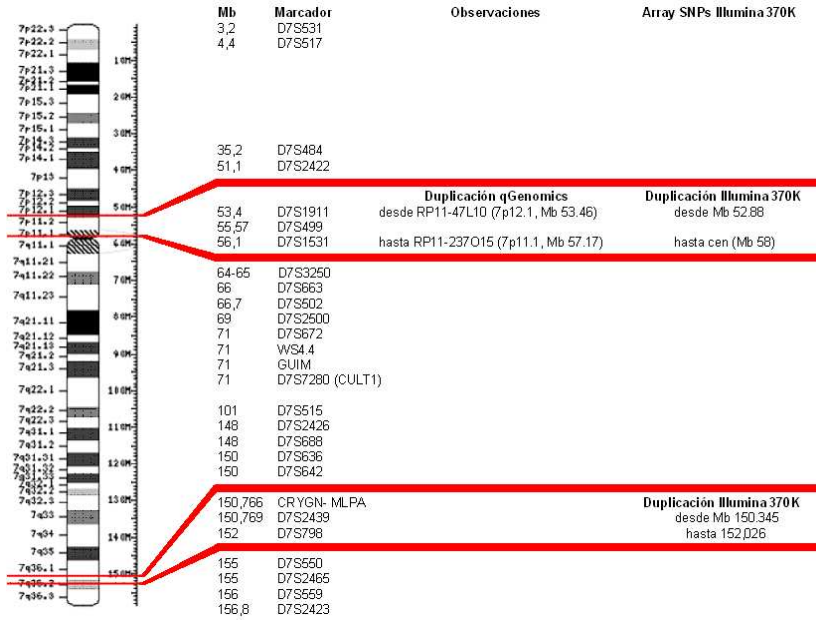
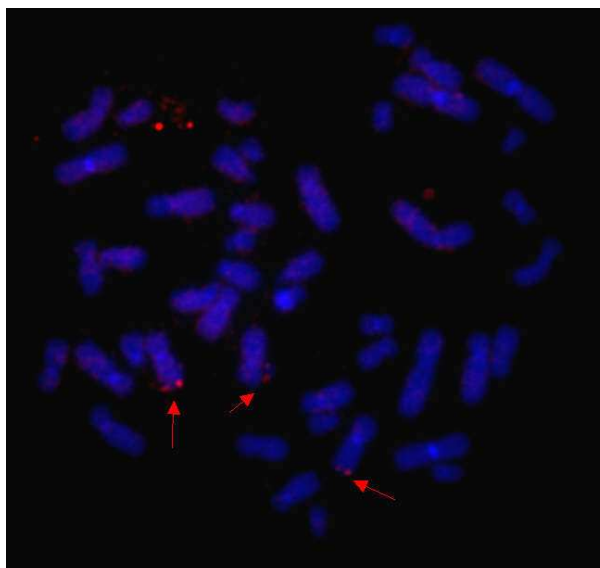


Fig. 38. Ideograma del cromosoma 7 en el que se señalan con líneas rojas las regiones duplicadas en este caso, incluidas en el cromosoma marcador.

Mediante FISH con el BAC RP11-193C16 (7q36.1), que contiene el gen *CRYGN*, se comprobó que esta región duplicada del paciente también se encuentra dentro del SMC.

## RESULTADOS



*Fig. 39. Imagen de FISH con la muestra del paciente hibridada con el clon RP11-193C16 (7q36.1). Las flechas señalan las señales de hibridación en los cromosomas 7 y en el pequeño cromosoma marcador.*

Por tanto, este paciente presenta una trisomía parcial de ~4.70 Mb desde la banda 7p12.1 hasta el centrómero (entre las Mb 52.88 y 58), así como de 1.7 Mb en 7q36.3 (Mb 150.345-152.026); ambas localizadas en el cromosoma marcador. Es difícil predecir el mecanismo de generación de un cromosoma marcador complejo con material de 7p11 y 7q36. El análisis *in silico* de las secuencias de ambas regiones genómicas no detectó homología significativa que pudiera haber facilitado el reordenamiento. La falta de muestra materna impidió estudios adicionales encaminados a determinar la posibilidad de un reordenamiento de susceptibilidad en la madre como una inversión pericéntrica o la presencia del propio marcador.

### 5.1.1.5 Marcador 5: iso(13)(p) ó iso(21)(p).

Este caso procedía de un diagnóstico prenatal a partir de cultivo de LA. En el cultivo se apreció un cromosoma marcador de pequeño tamaño en un feto sin alteraciones ecográficas.

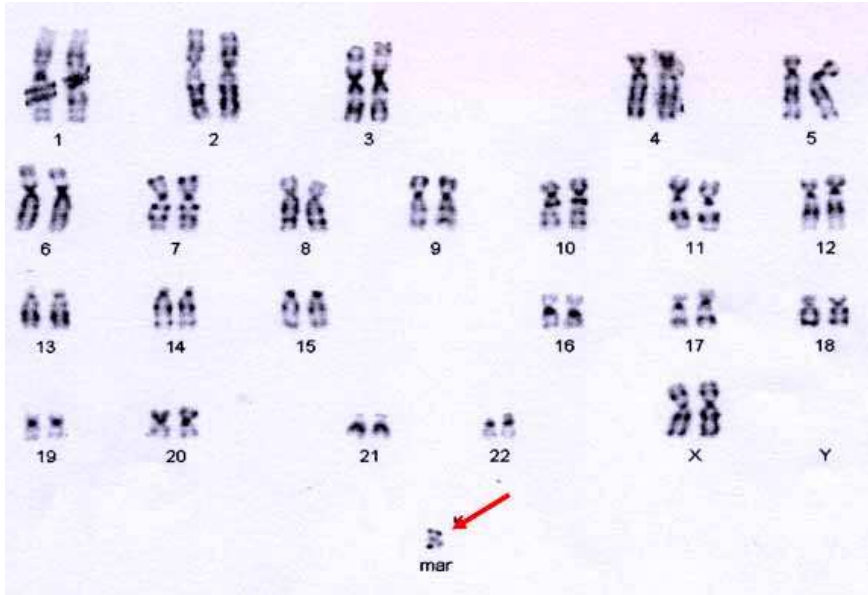


Fig. 40. Cariotipo de la paciente, con el pequeño cromosoma extra señalado.

Para comprobar la presencia de material satélite en el cromosoma marcador, se realizó una tinción NOR (*nucleolar organizing region*). La tinción de la muestra con la técnica de bandas NOR fue positiva para el marcador.

## RESULTADOS

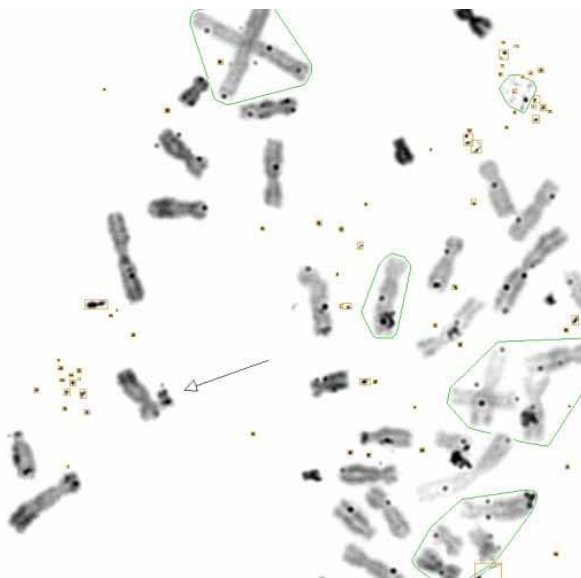


Fig. 41. Tinción bandas NOR, la flecha señala el cromosoma marcador.

Para su caracterización ulterior, se aislaron 8 unidades del cromosoma marcador mediante microdissección manual, que se usaron como sonda para FISH reverso sobre metafases de un control, así como sobre extensiones de la misma muestra.

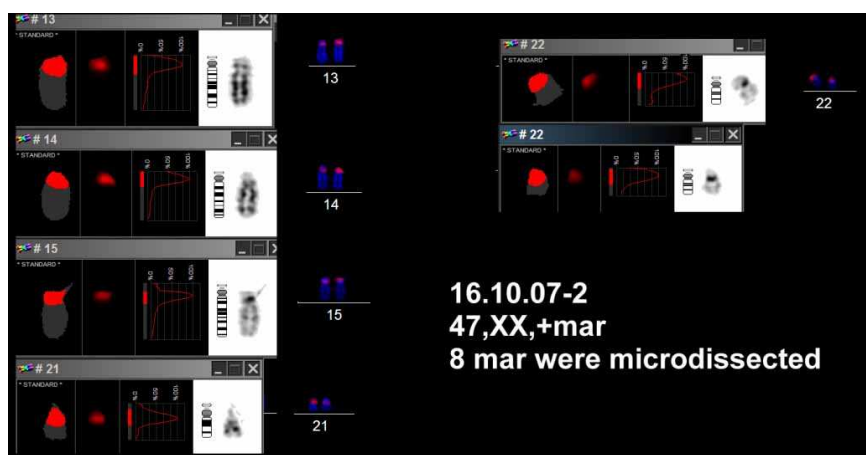


Fig. 42. FISH reverso del caso sobre metafases de un individuo control.

El FISH reverso usando como sonda el ADN de la microdissección mostró señal de hibridación en los centrómeros de los cromosomas acrocéntricos, así como en los satélites del cromosoma 22. La hibridación con las sondas centroméricas de los cromosomas 13/21 mostró señal de hibridación en el cromosoma marcador, mientras que la sonda para los centrómeros 14/22 no presentó señal. La hibridación con *Midi54*, una sonda específica de regiones satélite de los cromosomas acrocéntricos generada por microdissección manual en el laboratorio del Dr. Thomas Liehr, también dio señal en el cromosoma marcador.

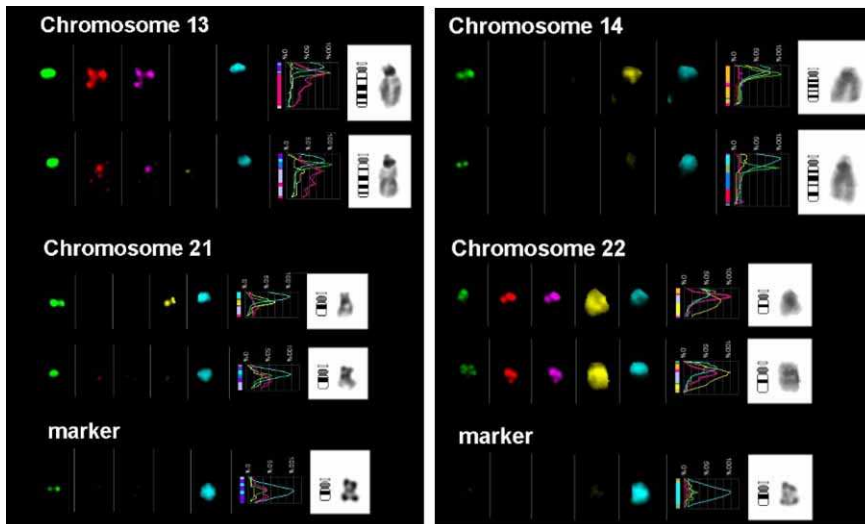


Fig. 43. Izquierda: FISH de la muestra con los centrómeros de 13/21 (spectrum green), *MiDi 54* (DEAC), 13q12 (*RP11-110K18*, rhodamin), 21q11 (*RP11-89H29*, Cy5). Derecha: centrómeros 14/22 (spectrum green), 22q11 (*Rp11-172O7*, spectrum orange), 22q (Cy5).

El cromosoma marcador se interpretó como material satélite del cromosoma 13 ó 21 (bisatelitado dada la morfología). En esta región no hay genes descritos, salvo secuencias repetitivas que codifican para las regiones organizadoras nucleolares (NOR).

En la siguiente tabla (tabla 10) se muestra un resumen de la caracterización de los casos con cromosomas marcadores.

<b>CASO</b>	<b>FÓRMULA CARIOTIPO</b>	<b>ORIGEN MARCADOR</b>	<b>DIAGNÓS TICO</b>	<b>MOTIVO GENÉTICO</b>	<b>ANÁLISIS</b>	<b>TAMAÑO, ORIGEN</b>	<b>Nº GENES INCLUIDOS</b>	<b>TÉCNICAS CARACTERIZACIÓN</b>
Marcador 1	47,XY,+mar[13]/46,XY[7]	De novo, materno, meiosis I	Postnatal	Craneosinostosis congénita		~16 Mb 6p11.2→cen	60	CGH, SKY FISH, WCP, FISH con BACs, PCR microsatélites
Marcador 2	47,XY,+mar[76]/46,XY[24]	De novo, paterno, meiosis II	Pre y postnatal	Anomalia ecográfica 2º trimestre		~10 Mb 10p11.21-q11.22	140	Array CGH BACs, PCR microsatélites
Marcador 3	49,XY,+mar1,+mar2,+mar3[9]/48,XY,+mar1,+mar2[20]/ 47,XY,+mar1[36]	De novo, materno, meiosis I	Pre y postnatal	Screening bioquímico 1º trimestre embarazo alterado		~3 Mb 10p11.21→cen ~1.2 Mb 14q11.2	22+121	Array CGH BACs, PCR microsatélites, FISH centromérica
Marcador 4	47,XY,+mar (prenatal) 47,XY,+mar[65]/46,XY[20] (postnatal)	De novo?, paterno?, meiosis I	Pre y postnatal	Retraso crecimiento intrauterino		~4.7 Mb 7p12.1→cen; 1.7 Mb 7q36.3	17+23	M-FISH, WCP, Array CGH BACs, Array SNPs Illumina 370K, MLPA, PCR microsatélites, FISH con BACs
Marcador 5	47,XX,+mar[20]	Hereditado, materno	Pre y postnatal	Edad materna avanzada		~20-32 Mb 13p13→cen ó 21p13→cen	0	Microdissección manual, FISH reverso, FISH centromérica



## 5.1.2 Anomalías balanceadas

### Translocaciones recíprocas

#### 5.1.2.1 Translocación 1: 46,XX,t(9;11)(q34;p11.2)

En esta paciente (CR) con retraso global leve y trastorno específico del lenguaje, se obtuvo un cariotipo en sangre periférica con una translocación recíproca aparentemente equilibrada con fórmula: 46,XX,t(9;11)(q33;p11).

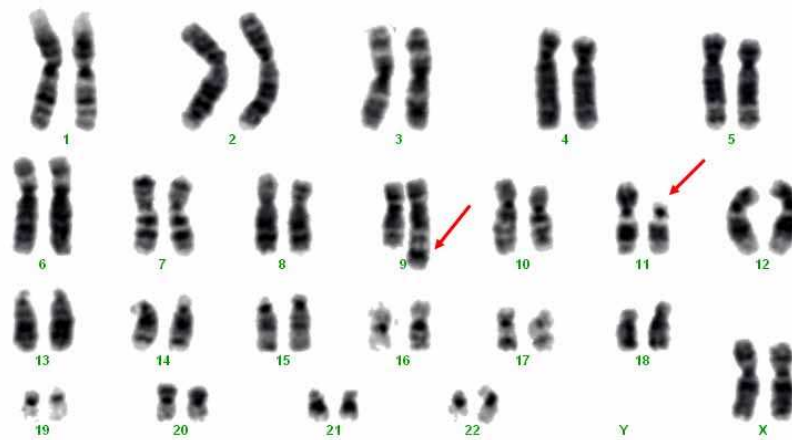
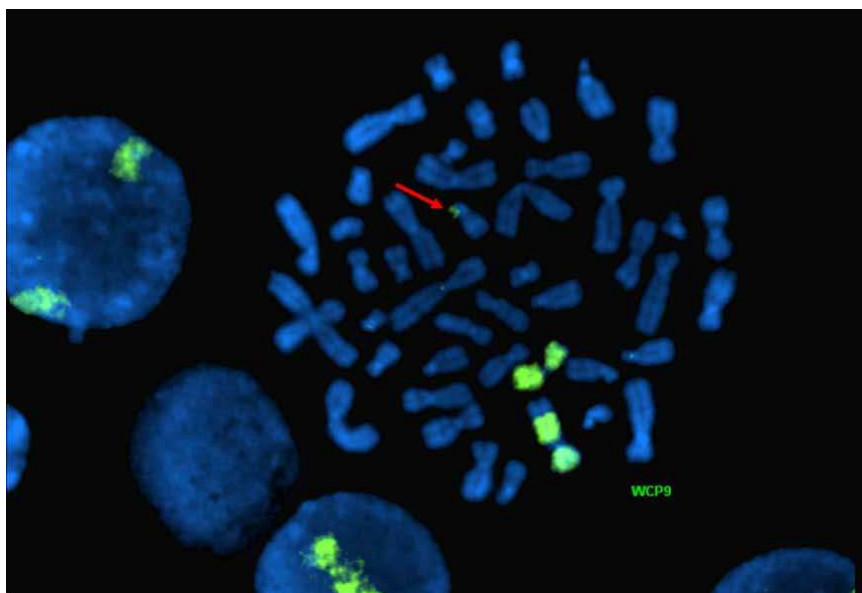


Figura 44: Cariotipo en el que se aprecia una translocación entre los cromosomas 9 y 11.

Los cariotipos de sus padres fueron normales, indicando que la translocación de CR era *de novo*. La sonda de pintado cromosómico específica del cromosoma 9 (WCP9) mostró una pequeña señal de hibridación visible en el cromosoma derivativo 11. Dado que la resolución de esta técnica es aproximadamente de unas 10 Mb, el fragmento del cromosoma 9 translocado al cromosoma 11 debería ser igual o mayor a 10 Mb.



*Figura 45: Metafase con la hibridación WCP9. La flecha roja indica la señal de hibridación en el der(11).*

Para la caracterización de los puntos de rotura en los cromosomas 9 y 11 se usaron clones de BACs como sondas. En cada uno de los cromosomas se fue acotando la región mediante hibridaciones sucesivas desde los extremos centromérico y telomérico predichos por citogenética convencional. En concreto se usaron 10 clones para el cromosoma 11, localizados desde el centrómero (Mb 50) hasta la Mb 34. Para localizar el punto del cromosoma 9 se emplearon 20 clones, desde la Mb 133 hasta la Mb 122. En la siguiente tabla se muestra la lista de los clones empleados, así como su localización y el cromosoma en que mostraban señal de hibridación.

Clon BAC	Localización	Hibridación
RP11-277N8	11p13	der(9)
RP11-768P16	11p12	der(9)
RP11-70A9	11p11.2	der(9)
RP11-306K10	11p11.2	der(9)
RP11-784O22	11p11.2	der(9)
RP11-369O4	11p11.2	der(9)
RP11-343D9	11p11.12	der(9)+ der(11)
RP11-702F3	11p11.12	der(11)
RP11-425G10	11p11.12	der(11)
RP11-576I8	11p11.12	der(11)
RP11-89A1	11p11 (cen)	der(11)

Clon BAC	Localización	Hibridación
RP11-778D5	9q34.11	9
RP11-85C21	9q34.11	9
RP11-121C13	9q34.11	der(9)
RP11-634C23	9q34.11	der(9)+ der(11)
RP11-582A18	9q34.11	der(9)+ der(11)
RP11-258M22	9q34.11	der(11)
RP11-391L15	9q34.11	der(11)
RP11-513D3	9q34.11	der(11)
RP11-423C15	9q34.11	der(11)
RP11-161P7	9q34.11	der(11)
RP11-661B9	9q34.11	der(11)
RP11-809E4	9q34.12	der(11)
RP11-451D9	9q34.12	der(11)
RP11-809P13	9q34.13	der(11)
RP11-723C24	9q34.2	der(11)
RP11-666F23	9q34.3	der(11)

Tabla 11: Listado de los BACs empleados para localizar el punto de rotura de la translocación. En color rojo están señalados los que cohibridaban en ambos cromosomas derivados.

El punto de rotura del cromosoma 9 se encuentra en la zona de solapamiento de los clones RP11-634C23 y RP11-582A18.

El telómero 9qter está aproximadamente en 133 Mb, por lo que el fragmento translocado del cromosoma 9 tendría ~12 Mb.

## RESULTADOS

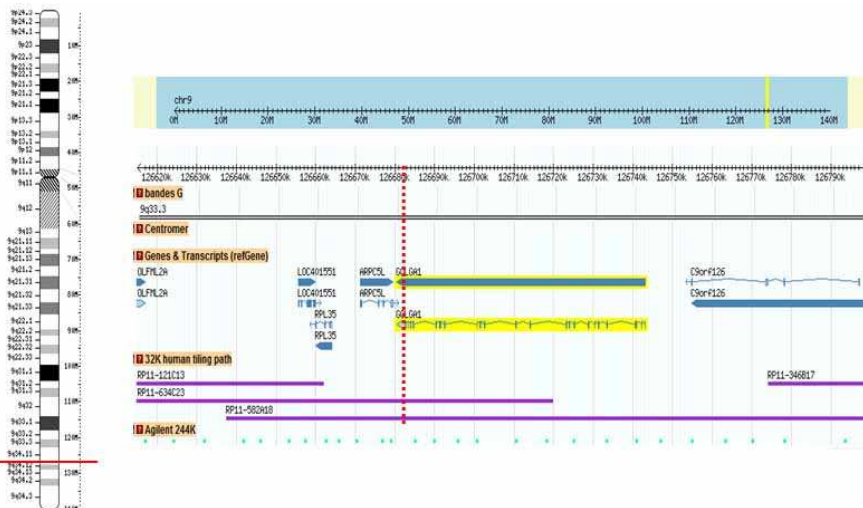


Figura 46: Mapa de la región donde se encuentra el punto de rotura del cromosoma 9.

El punto de rotura del cromosoma 11p11.2 se localiza en el clon RP11-343D09, siendo el fragmento translocado de este cromosoma de ~46 Mb.

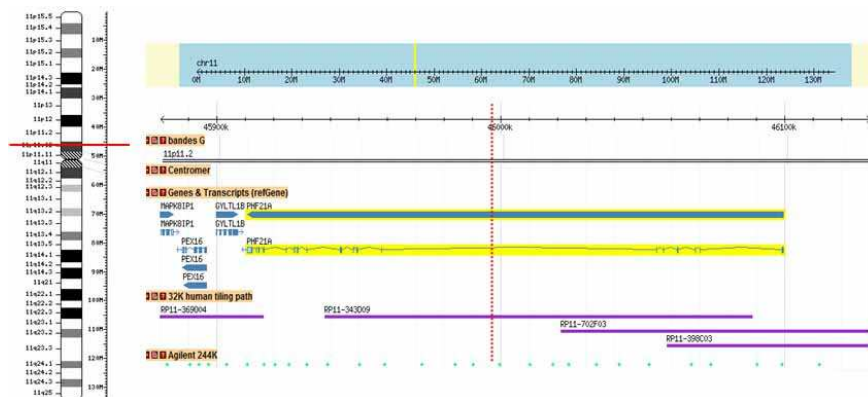


Figura 47: Mapa de la región donde se encuentra el punto de rotura del cromosoma 11.

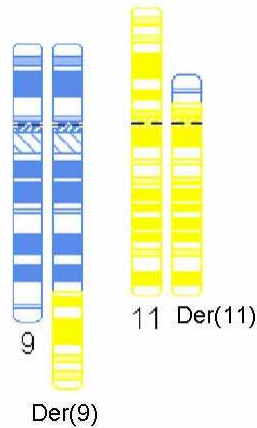


Fig. 48. Ideogramas de los cromosomas 9 y 11, así como de los derivados resultantes de la translocación.

Para acotar las regiones afectadas por la translocación en ambos cromosomas se empleó la técnica de Southern blot radioactivo. Se desarrollaron diversas (14) sondas en el intervalo crítico en ambos cromosomas por PCR con cebadores específicos. La sonda rosa detectó un fragmento nuevo en la paciente que debería contener el fragmento de unión.

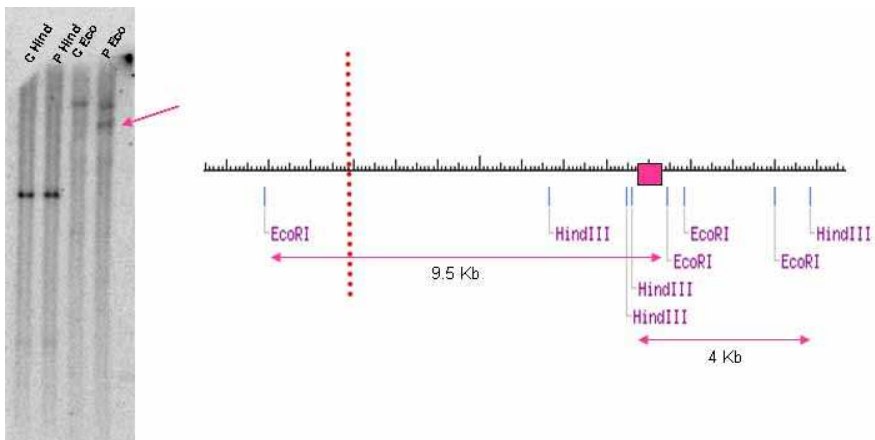


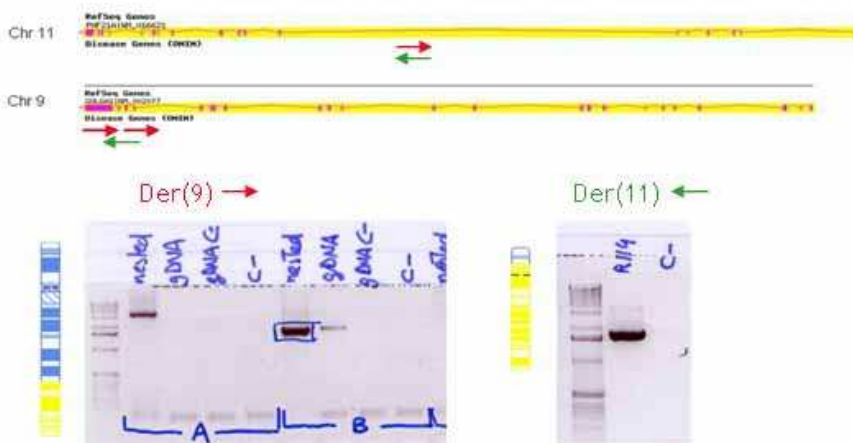
Figura 49: Izquierda: imagen obtenida con Southern blot en la que se señala la banda extra presente en la digestión de muestra de la paciente.

## RESULTADOS

*Derecha: mapa de restricción con la localización de la sonda y los fragmentos esperados. Mediante la hibridación con la sonda localizada en el intrón 7 del gen PHF21A (Chr11, nt 45981209-45981661, hg 18) se detectó la presencia de una banda extra en el ADN de la paciente que no aparece en el ADN control. El tamaño esperado para la digestión con EcoRI era de 9 Kb mientras que para la digestión con HindIII era de 4 Kb.*

En la paciente observamos una banda extra para EcoRI de ~7 Kb (representada en el esquema como una línea roja discontinua). Por tanto, el punto de rotura de la translocación generaba una nueva diana para el enzima EcoRI.

El diseño para clonar y secuenciar los puntos de rotura de los cromosomas derivados se realizó mediante PCR de larga distancia con parejas de cebadores enfrentados diseñados cada uno en un cromosoma. Se probaron varias combinaciones de cebadores hasta que se dio con la pareja que obtuvo un producto de PCR específico en la paciente. Este producto fue secuenciado y la secuencia analizada por BLAT.



*Fig. 50. Arriba: esquema de la localización de los cebadores en los genes PHF21A y GOLGA1. Debajo: imagen de la migración de los productos de PCR, con resultado positivo para la muestra de la paciente.*

El punto de rotura de la translocación del derivativo 9 se localizó entre el intrón 19 y el exón 23 de GOLGA1, posición en la que se detectó una deleción de 2627 pb (126684023 -12686650). El punto de rotura del derivativo 11 se localizó en el intrón 7 de *PHF21A* existiendo una inserción de 1 nucleótido como único desbalance.

```

- Chr9 126686661 AAGCTTATCCCAGCTTTGTTTAAA 126686638
  Der (11) AAGCTTATCCCAAGTTCAGACCTT
+ Chr11 45983628 ATGGGCACCAAATGTTTCAGACCTT 45983651

- Chr9 126684032 TCTTCGAAAGTCCGGGAGAAA 126684013
  Der (9) CAAATTAGGACCGGGAGAAA
           del ins 5pb
           2627pb
+ Chr11 45983636 CAAATGTTTCAGACCTTCCTGTTCT 45983650
    
```

El punto de rotura en 9q33.3 interrumpe un único gen: *GOLGA1* (golgi autoantigen, golgin subfamily a, 1). El gen tiene un tamaño de 62 Kb, con 23 exones. Existen dos variantes de splicing: la primera sólo contiene 3 exones (524 pb) y podría codificar para una proteína de 83 aminoácidos, mientras que la segunda corresponde a la proteína golgin97, contiene los 23 exones (4797 pb) y se traduce en una proteína de 767 aminoácidos (97 KDa).

El punto de rotura en 11p11.2 interrumpe el gen *PHF21A* (*PHD finger protein 21A*). Este gen codifica para una proteína componente del complejo de histona deacetilasa, que media la represión de genes específicos de neuronas a través del RE1 (*repressor element 1*), o a través del NRS (*neural restrictive silencer*). Este gen tiene un tamaño de 189 Kb y contiene 18 exones, con un intrón de unas 100 Kb entre los exones 7 y 8. Tiene dos transcritos: uno de 634 aminoácidos que codifica para una proteína de 70.2 KDa, y otro de 681 aminoácidos que genera una proteína de 74.9 KDa.

## RESULTADOS

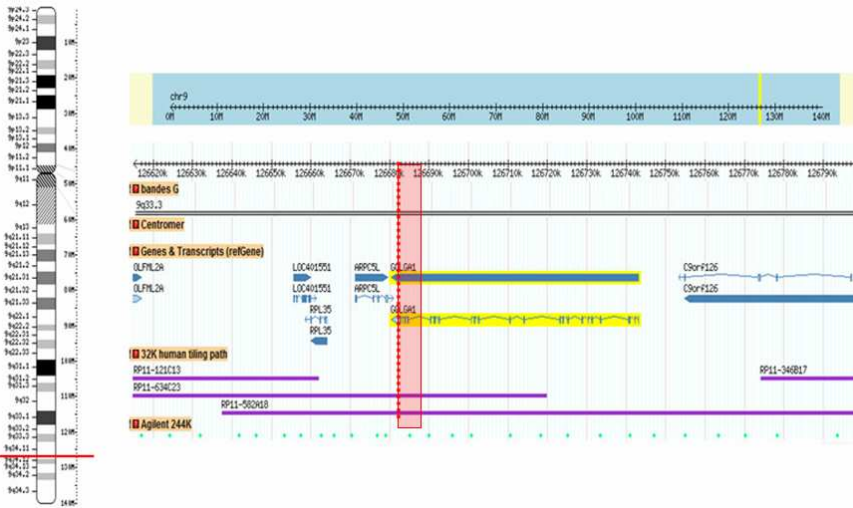


Fig. 51 Representación de los puntos de rotura del cromosoma 9, en el rectángulo rojo están contenidas las 2.6 Kb delecionadas.

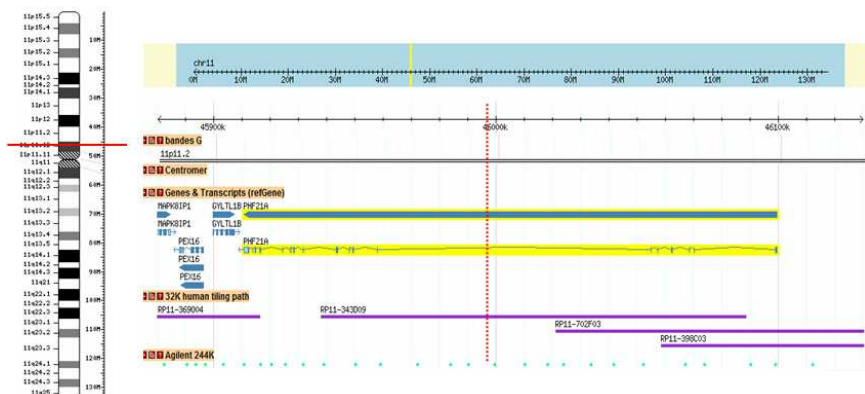


Fig. 52 Esquema de la región del cromosoma 11 en el que se señala el punto de rotura del gen PHF21A con una línea roja.

La orientación transcripcional de los genes *PHF21A* y *GOLGA1* es opuesta, por lo que en los cromosomas derivativos nuevos que se originan por la translocación no es predecible la formación de un gen de fusión.

La cuantificación relativa de los niveles de expresión de los genes *PHF21A* (exones 7-9 -interrumpidos por el punto de rotura de la translocación- y exones 16-17) y *GOLGA1* (exones 19-23 -



interrumpidos por el punto de rotura- y exones 6-10) se realizó mediante PCR cuantitativa a tiempo real con SYBRgreen, a partir de ADNc de linfocitos de sangre periférica y de linfoblastos de línea celular, de la paciente y 11 individuos control. El gen control interno fue *PBGD* (11q23.3; exones 1-4).

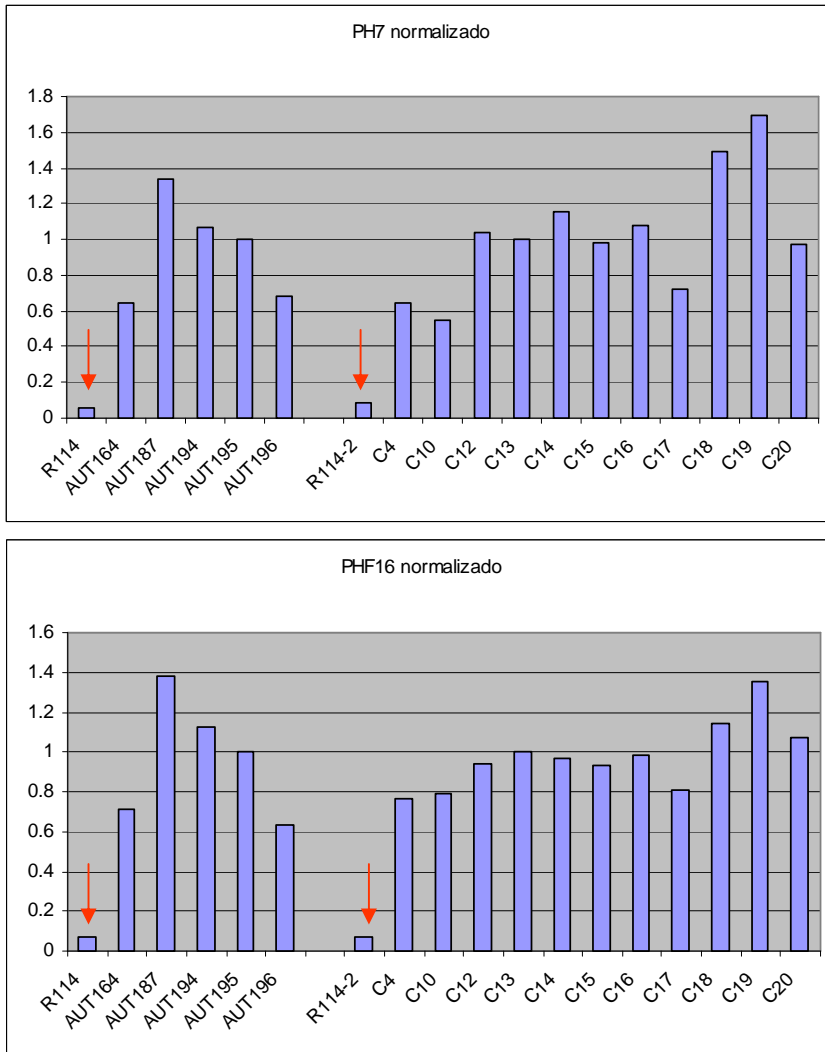


Fig. 53. Gráficos en los que se muestra la expresión relativa del gen *PHF21A* (parte superior: exones 7-9; parte inferior: exones 16-17) normalizada con respecto al gen *PBGD* en muestras de linfocitos de

## RESULTADOS

sangre periférica. Los resultados de la paciente se indican con flechas. La expresión está comparada con dos grupos controles distintos (izquierda-derecha).

Se detectó una disminución de la expresión de *PHF21A* (exones 7-9 y 16-17) en la paciente en linfocitos de sangre periférica, compatible con haploinsuficiencia por la presencia de una sola copia funcional del gen.

En cambio, en el análisis de linfoblastos no hay diferencias de expresión en ninguno de los genes entre la paciente y los controles. Comparando la cantidad de expresión entre los dos tipos celulares, las líneas linfoblastoides tienen una reducción drástica de expresión de este gen (60-75%), de modo que las posibles diferencias de expresión están minimizadas.

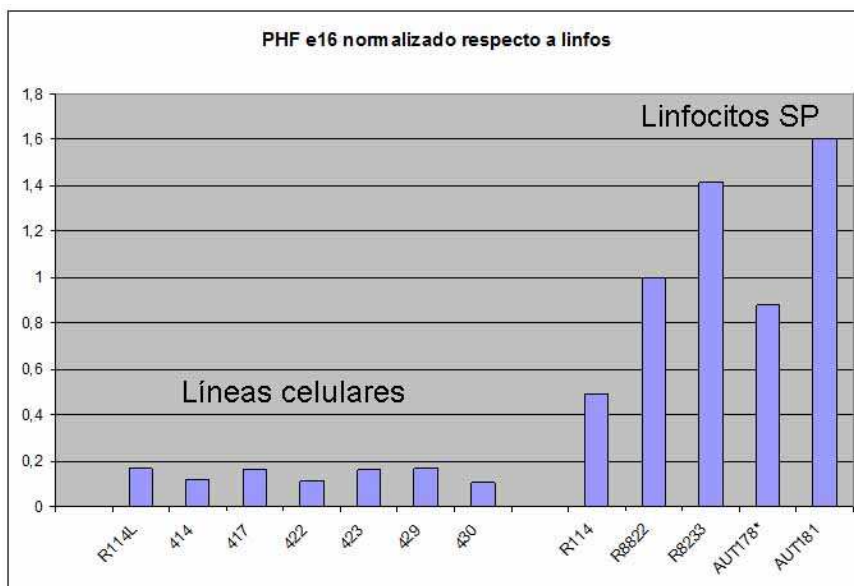


Fig. 54. Comparación de la expresión relativa de muestras a partir de líneas celulares con respecto a muestras a partir de linfocitos de SP con los exones 16-17 del gen *PHF21A*.

También se observa reducción de expresión del gen *GOLGA1* (por RTPCR de exones 19-23 y 6-10) en la paciente. El estudio mediante Northern blot no obtuvo señal en ninguna muestra. Posiblemente porque la expresión de este gen en linfocitos es baja.

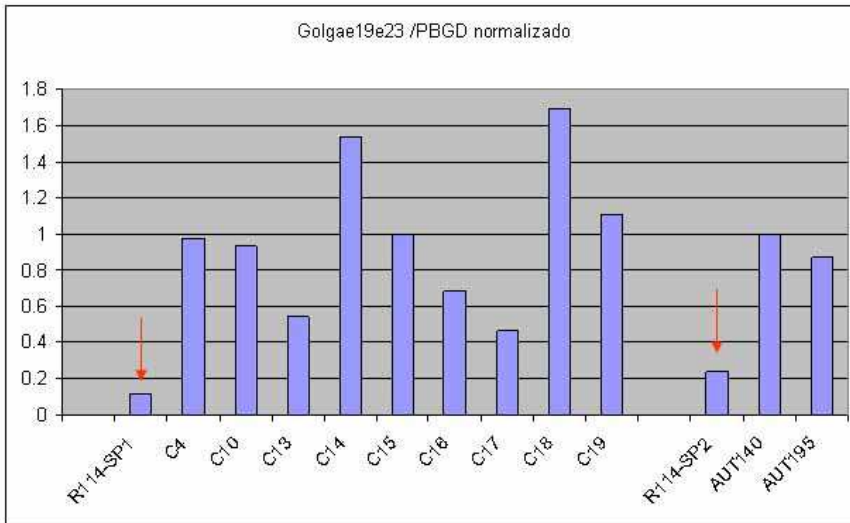
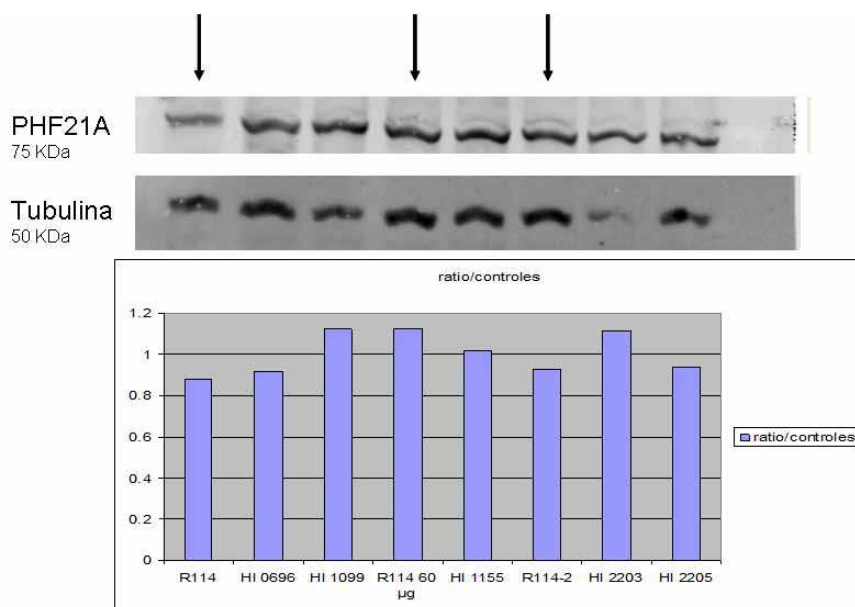


Fig. 55. Comparación de la expresión relativa de muestras de la paciente (señaladas con flechas) a partir de linfocitos de SP con los exones 19-23 del gen *GOLGA1*.

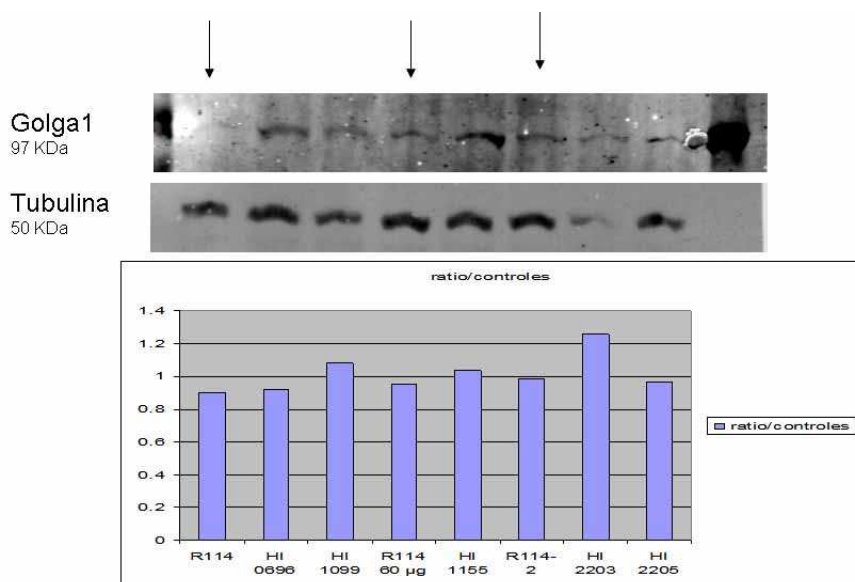
El estudio funcional de estos genes se realizó mediante Western blot en extractos proteicos de linfoblastos de línea celular de la paciente y de individuos controles, con anticuerpos para *PHF21A* (*BHC80*) (monoclonal de ratón contra la región C terminal del gen, correspondiente a los aminoácidos 331-431); y para *GOLGA1* (policlonal de conejo contra la región C terminal).

Con este estudio se pretendía comprobar si la disminución de expresión de estos dos genes se traducía también en una reducción de la cantidad de proteína en la paciente, así como descartar o comprobar la presencia de proteínas de tamaño anómalo procedentes de alguno de los cromosomas derivados).

## RESULTADOS



*Fig. 56. Western blot con el anticuerpo específico para PHF21A y tubulina como control. Las muestras de extracto proteico de la paciente están señaladas con flechas.*



*Fig. 57. Western blot con el anticuerpo específico para GOLGA1 y tubulina. Las muestras de extracto proteico de la paciente están señaladas con flechas.*

No se observó diferencia de expresión entre la paciente y los controles con ninguno de los dos anticuerpos, ni proteínas anómalas presente específicamente en la paciente con ninguno de los dos anticuerpos. Las proteínas proceden de las células de la línea linfoblastoide; en los experimentos de PCR cuantitativa tampoco se observó diferencia de expresión entre la paciente y los controles, y sí una disminución del 60-75% de expresión comparado con las muestras de material de linfocitos de sangre periférica.

Teniendo en cuenta que el gen *PHF21A* pertenece al complejo BRAF35/HDAC2 histona deacetilasa, que media la represión de genes específicos de neuronas y su haploinsuficiencia en la paciente con TEL, este gen podría ser un buen candidato como responsable de este fenotipo. El complejo está integrado por 6 subunidades: *BRAF35*, *RCOR1*, *HDAC1*, *HDAC2*, *BHC110* y *PHF21A*. Para hacer una búsqueda rápida de posibles reordenamientos en este gen u otro de los genes de este complejo, se diseñó un juego de sondas de MLPA en nuestro laboratorio que incluía estos 6 genes, y además sondas para las 2 únicas regiones descritas asociadas a TEL: el gen *FOXP2* (7q31) y la región del síndrome de Williams-Beuren (WBS), de la que seleccionamos el gen *WBSCR1*. Se realizó este rastreo en 19 pacientes con TEL, 165 pacientes con RM idiomático (78 mujeres y 87 hombres), 87 autistas y 52 controles. No se observaron diferencias de número de copias (pérdidas o ganancias) para ninguno de estos genes en ninguna de las poblaciones estudiadas. Posteriormente se realizó una búsqueda de mutaciones en el gen *PHF21A* mediante secuenciación directa de los 18 exones en la

## RESULTADOS

población de 19 individuos con TEL. En este caso, la única variación detectada fue 1 SNP en el exón 12 en 2 individuos (SNP rs3736508). En la base de datos de Hapmap, la frecuencia de este SNP en población europea (CEU) es de 0.955 para el alelo CC (107/112 individuos), mientras que para los heterocigotos CT es de 0.045 (5/112 individuos).

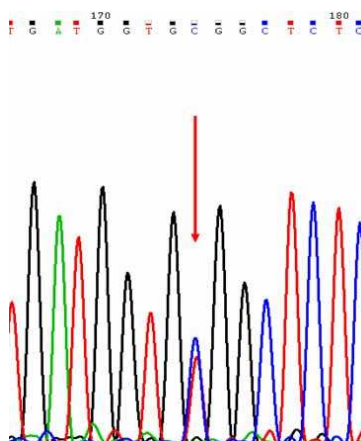


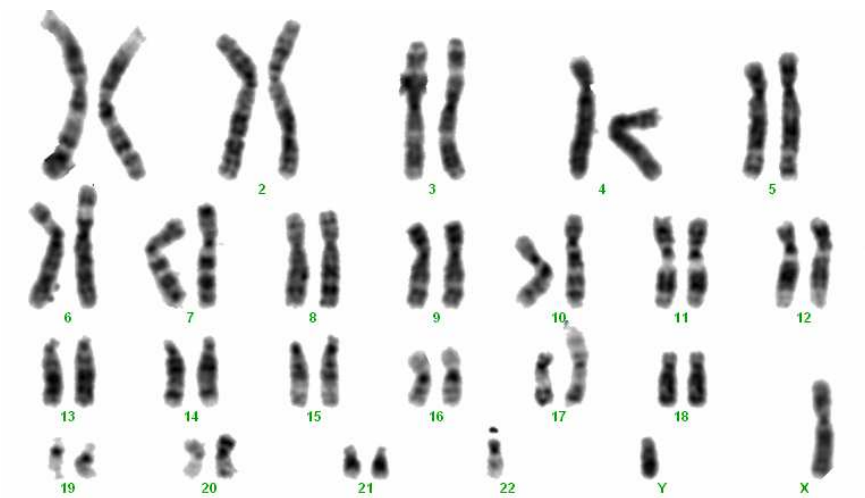
Fig. 58. Fragmento de secuencia del exón 12 del gen *PHF21A* en el individuo AUT222 01, en el que se puede apreciar el SNP C/T.

En resumen, esta paciente es portadora de una translocación *de novo* aparentemente balanceada con fórmula  $t(9;11)(q34.1;p11.2)$ , que interrumpe dos genes: *GOLGA1* en el 9q34 y *PHF21A* en 11p11.2. A nivel molecular hay una delección de 2.6 Kb en el cromosoma 9, y una inserción de 1 pb en el cromosoma 11. Los estudios de expresión para ambos genes en linfocitos de SP revelaron una reducción en la paciente (compatible con haploinsuficiencia), pero en linfoblastos de línea celular establecida los niveles de expresión y de proteína de ambos genes eran iguales en la paciente y los controles, aunque reducidos un 60-75% con respecto a linfocitos. Los rastreos de reordenamientos en

el gen *PHF21A* y los demás miembros del complejo al que pertenece (BRAF35/HDAC2 histona deacetilasa) en diversos pacientes con fenotipos de RM, TEL y autismo no mostraron alteraciones, ni tampoco el rastreo de mutaciones por secuenciación directa de *PHF21A* en la cohorte de pacientes con TEL.

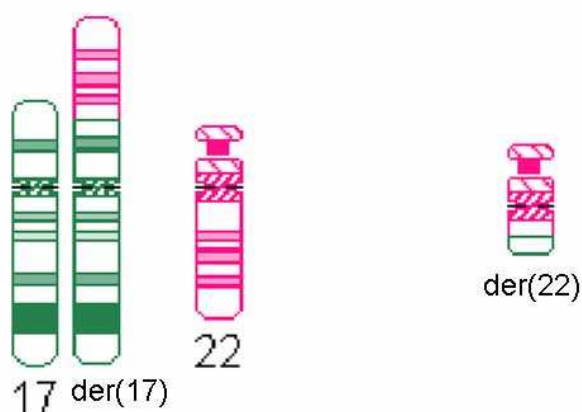
### 5.1.2.2 Translocación 2: 45,XY,t(17;22)(p13.3;q11.2),-22

En este paciente con rasgos dismórficos, anomalías de las extremidades y RM severo, se obtuvo un cariotipo en sangre periférica con una translocación no balanceada: 45,XY,t(17;22)(p13.3;q11.2),-22, con pérdida de la región 17pter, así como de la más proximal del cromosoma 22.



*Fig. 59. Imagen del cariotipo del paciente (caso índice) en la que se aprecian los 45 cromosomas y la translocación (17;22). La flecha indica el der(17).*

## RESULTADOS



*Fig. 60. Ideogramas de los cromosomas después de la translocación. En la parte derecha de la imagen se observa el cromosoma derivativo 22, que incluye la región DGS y la región 17pter, ausente en el paciente.*

El cariotipo de su madre y hermana presentaba la misma translocación. Revisando la historia familiar, el abuelo materno era portador de la translocación balanceada, con presencia de un der(22) que incluía las dos regiones ausentes en el paciente, su madre y su hermana, habiendo además diversas manifestaciones clínicas en varios miembros de la familia, como se representa en la Figura 61.



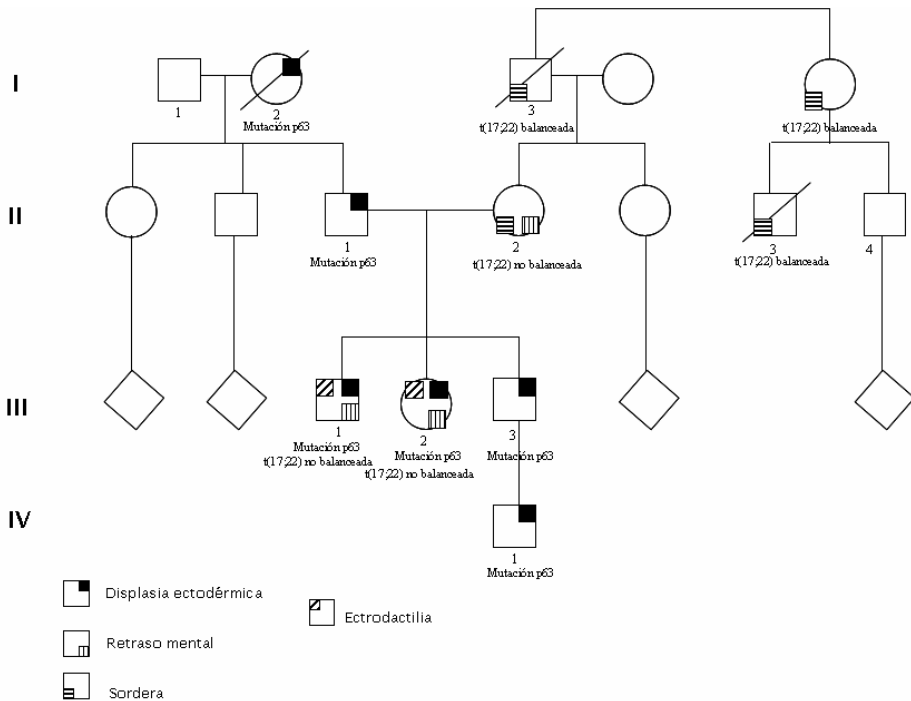


Fig. 61. Árbol genealógico de la familia del paciente con la  $t(17;22)$ , [individuo III-1].

Para definir el tamaño de la deleción de 17pter se hibridó la muestra del paciente con el array de qGenomics. Los clones CTD-2348K1 (nt 2-116762) y CTD-2009B12 (nt 371341-489193) se detectaron delecionados, mientras que RP13-479I05 (nt 454021-571377) obtuvieron resultados intermedios, con alguna réplica con log ratio  $<-0.20$ . En los experimentos de FISH este clon mostró dos señales, una de ellas menos intensa [der(17)]. Los ratios del siguiente clon (RP11-408L19; nt 623188-820015) fueron normales, de modo que se definió la deleción desde el telómero hasta ~489 Kb. Esta región contiene 3 genes descritos: *RPH3AL*, *LOC400566* y *FAM101B*, así como el gen *VPS53*, que se encuentra interrumpido por la translocación.

## RESULTADOS

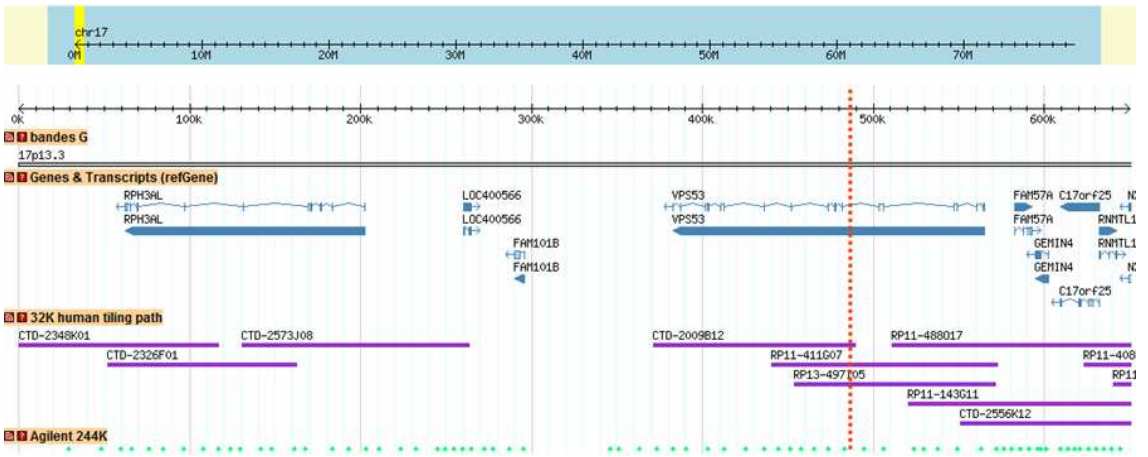


Fig. 62. Región p terminal del cromosoma 17, donde se señala con línea discontinua la localización aproximada del punto de rotura de la translocación. La zona proximal a este punto está delecionada en el paciente.

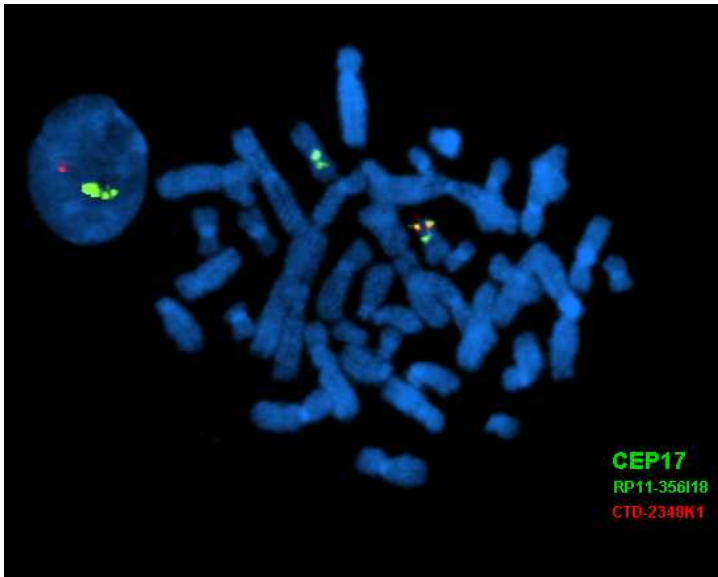


Fig. 63: Imagen de FISH de una metafase y un núcleo de la extensión del paciente en la que se aprecia la deleción del clon CTD-2348K1 (17p13.3, clon más telomérico) en el der(17), señalado por la flecha.

El análisis de PCR con el marcador microsatélite D17S289 (17pter, 417 Kb del telómero) confirmó la deleción así como el origen materno.

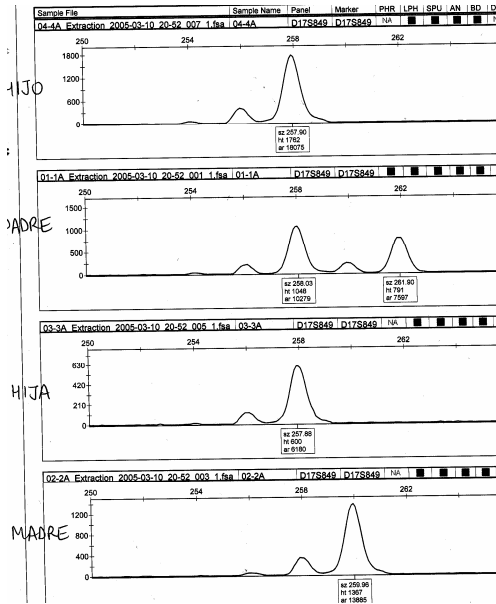


Fig. 64. Imagen del microsatélite D17S289. De arriba abajo: hijo (III-1), padre (II-1), hija (III-2) y madre (II-2).

Se descartó una posible variación de número de copias en otros loci del genoma con la hibridación *array* qGenomics, mientras que con el *array* de cobertura total para el cromosoma 22 (*tiling path* 287 clones) se definió la región delecionada como la parte proximal de 22q11, incluyendo 1.5Mb de la región crítica del síndrome DiGeorge/velocardiofacial (DGS/VCFS).

## RESULTADOS

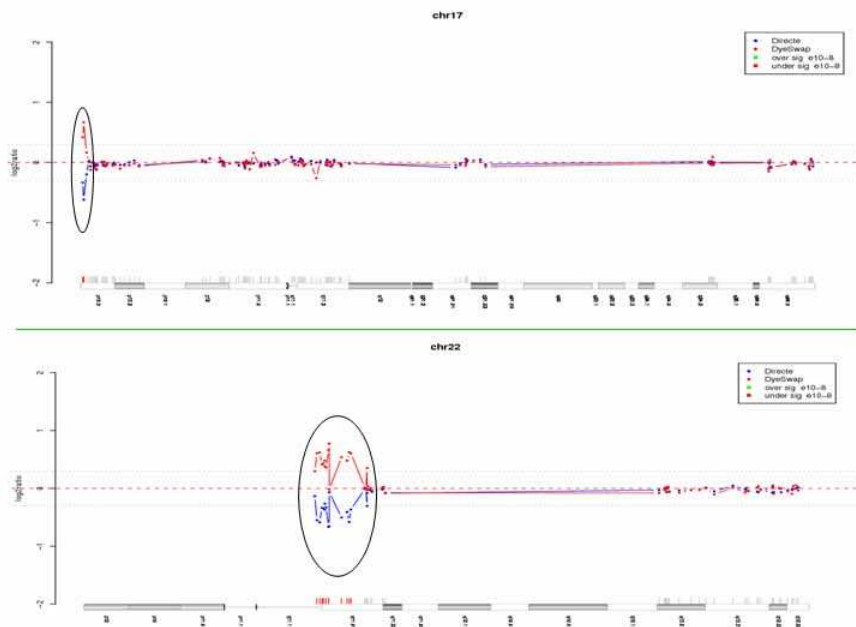


Fig. 65. Plots de los cromosomas 17 y 22 obtenidos con el array de qGenomics. Las sondas deletcionadas están señaladas dentro de la elipse.

Considerando el fenotipo de displasia ectodérmica que presentan el paciente, su padre, hermanos y sobrino se solicitó una búsqueda mutacional en el gen *p63* al laboratorio de genética clínica del Hospital de Rouen (Francia), mediante secuenciación directa de los 16 exones a partir de ADN genómico. Todos ellos son portadores de la mutación c.680 G>A, localizada en el exón 6 del gen *p63*.

Por tanto, el paciente es portador de una translocación no balanceada de herencia materna que genera una delección de casi 500 Kb en 17pter, y de varias Mb desde 22pter a 22q11.2 incluyendo la región crítica de DGS/VCFS, así como una mutación en el gen *p63* de herencia paterna. La coexistencia de ambos reordenamientos genera un fenotipo más severo (malformaciones

en extremidades y RM profundo) tanto en el paciente como en su hermana, aunque con expresividad variable.

### 5.1.2.3 Translocación 3: 46,XY,t(7;18)(p15.3;q21).

En este paciente, con un diagnóstico de hipogonadismo hipogonadotrópico, se observó en linfocitos de sangre periférica una translocación aparentemente balanceada con fórmula 46,XY,t(7;18)(p15.3;q21).

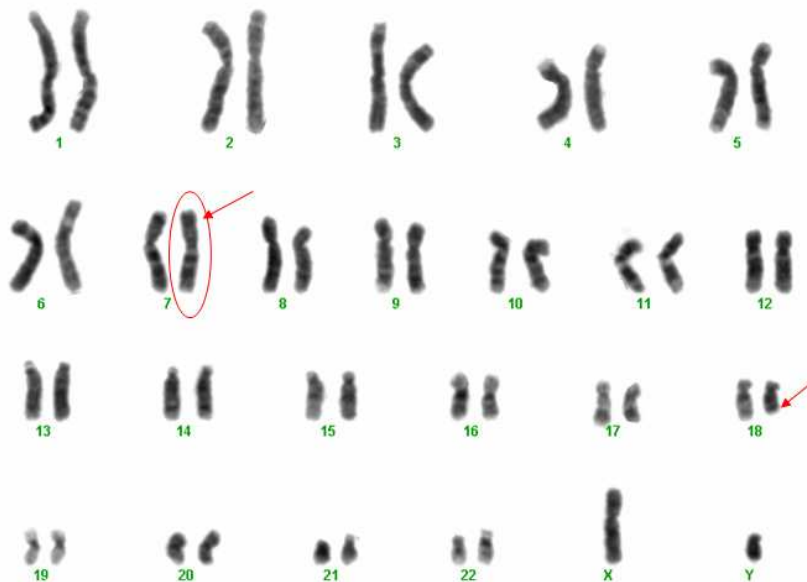


Fig. 66. Cariotipo del paciente con la t(7;18). Las flechas indican los puntos de rotura de la translocación.

## RESULTADOS

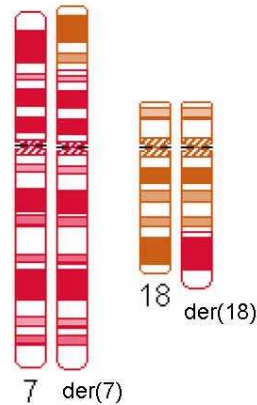


Fig. 67. Ideogramas de los cromosomas 7 y 18 después de la translocación.

Se realizaron cariotipos a los familiares disponibles (madre y 4 hermanos), resultando todos normales. Sin embargo, no se pudo estudiar el cariotipo paterno por haber fallecido. Para comprobar que la translocación era *de novo*, se realizó un análisis de los marcadores microsatélites flanqueantes a los puntos de rotura de la translocación en el paciente, su madre, y dos de sus hermanas. El análisis de haplotipos mostró la herencia de los mismos alelos paternos en el paciente y sus hermanas, lo que reduce la probabilidad de que hayan ocurrido cuatro reordenamientos en cada cromosoma en una meiosis paterna a  $\sim 5.76 \times 10^{-14}$ , por lo que se consideró que esta translocación era *de novo*.

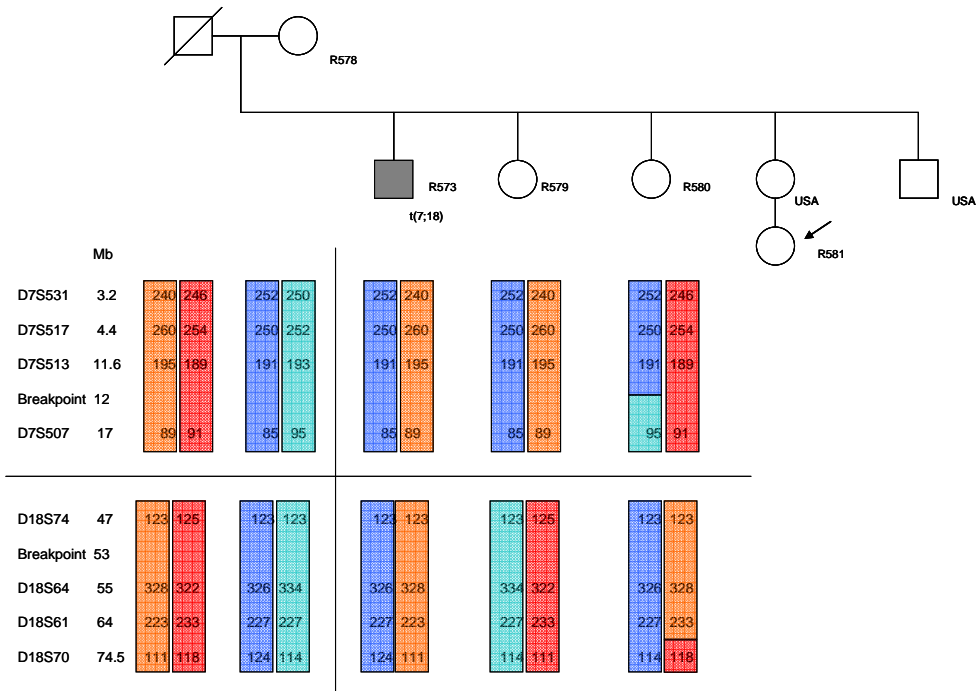
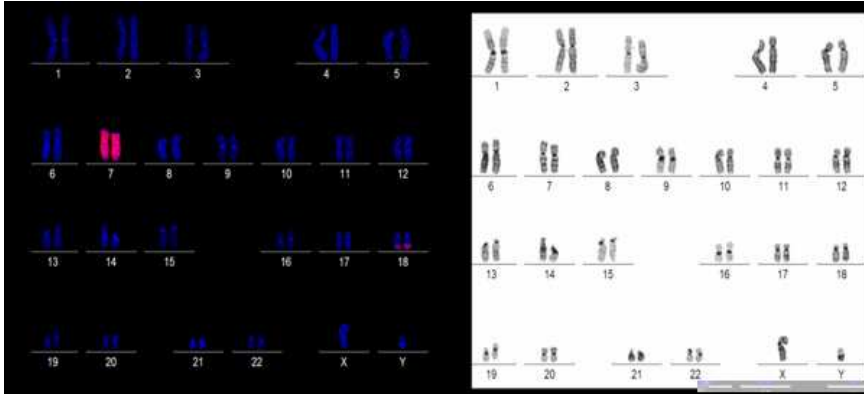


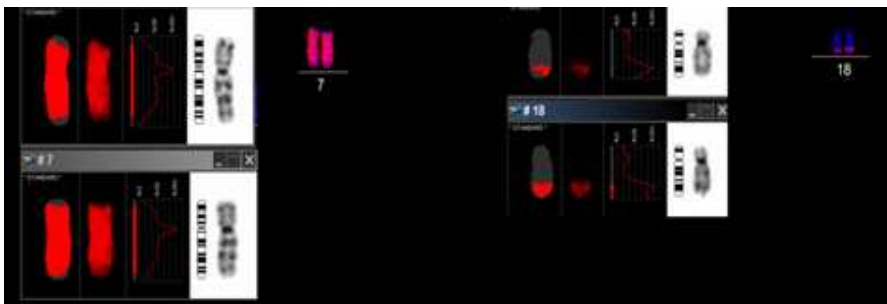
Fig. 68. Haplotipos obtenidos en el paciente, su madre y sus hermanas con marcadores microsatélite flanqueantes a los puntos de rotura para descartar la posible herencia de la translocación.

Para analizar el contenido génico de uno de los derivados se aislaron 6 unidades del der(7) mediante microdissección manual y posterior FISH reverso sobre metafases de una muestra control, en el que se observó señal de hibridación en la práctica totalidad del cromosoma 7 (excepto 7pter) y en la parte distal del cromosoma 18.

## RESULTADOS



*Fig. 69. Metafase de un individuo control hibridada con FISH reverso del material der(7) amplificado.*



*Fig. 70. Imagen ampliada de los cromosomas 7 y 18, en los que se observa señal de hibridación en casi la totalidad de los cromosomas 7 (excepto en pter), así como la parte distal de 18qter.*

El material aislado del der(7) se hibridó sobre un array de oligonucleótidos Agilent 244k, con cobertura de sondas cada ~8.9 kb. Para analizar los resultados del array se usaron directamente los valores de intensidad de señal, para evitar la pérdida de información, ya que mediante la normalización convencional los valores tendían a 0. Por tanto, se consideró el criterio de presencia de intensidad, es decir, se tomaron como positivas las sondas con valor >0.



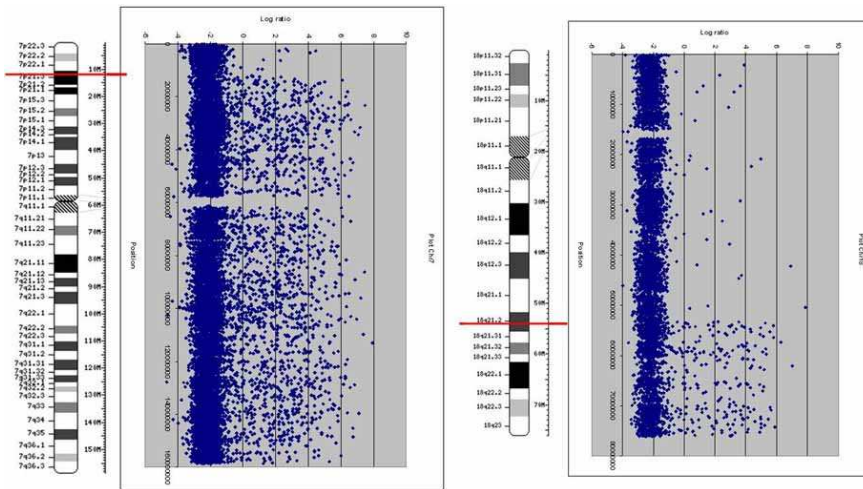
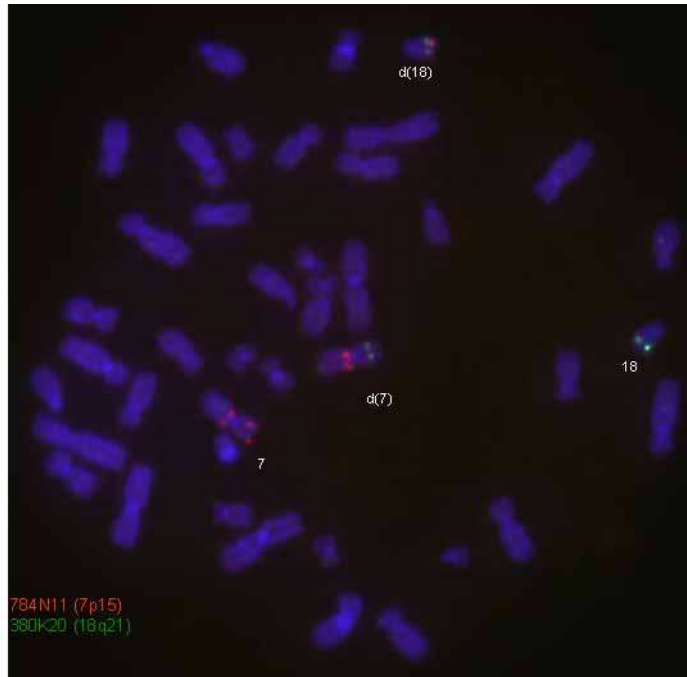


Fig. 71. Ideogramas de los cromosomas 7 y 18, con los puntos de rotura de la translocación señalados. A su lado, plots de las sondas del array Agilent 244K, con aumento de  $\log_2$ ratio en las regiones contenidas en el der(7).

La primera sonda en un cluster con ratio mayor que 0 en el cromosoma 7 fue A\_16\_P37928307 (nt 12068751, 7p21.3), a 11744 pb de la siguiente sonda proximal. En el cromosoma 18, la primera sonda en un cluster con ratio significativo fue A\_16\_P03376897 (nt 53262907, 18q21.31), a 5861 pb de la sonda proximal más cercana. El porcentaje de falsos positivos para los cromosomas 7 y 18 fue del 0.7% y 0.6%, respectivamente; mientras que el de falsos negativos de un 84% y 88%.

A partir de estos datos se seleccionaron 3 clones BACs para FISH en cada cromosoma. Una de las combinaciones mostró señal de fusión en ambos derivados abarcando el punto de rotura en cada cromosoma.

## RESULTADOS



*Fig. 72. FISH con los BACs RP11-784N11 (7p15, marcada en rojo) y RP11-380K20 (18q21, marcada en verde). El clon del cromosoma 7 cohibrida en 7q11.*

La distancia entre el punto de rotura predicho por el array de oligonucleótidos y punto de rotura aproximado del clon que mostró señal de hibridación en los dos derivados es de ~117 Kb en el cromosoma 7, y de ~70 Kb en el cromosoma 18.

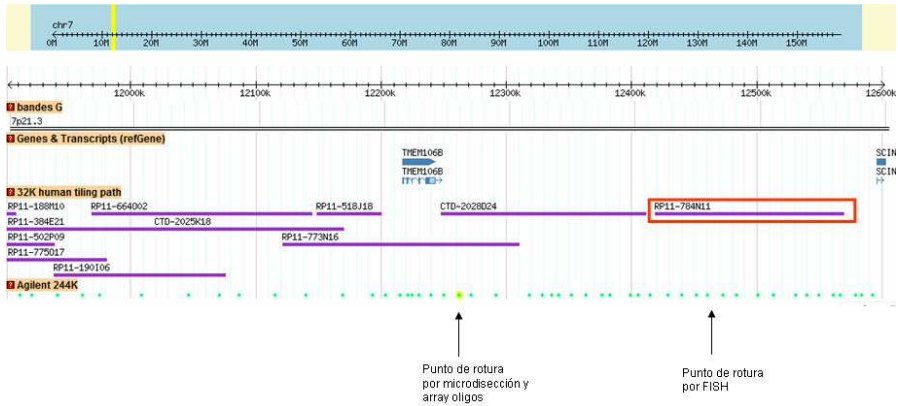


Fig. 73. Región del cromosoma 7 donde se localiza el punto de rotura de la translocación, se señalan los puntos de rotura predichos por el array de oligonucleótidos y posteriormente por FISH con BACs.

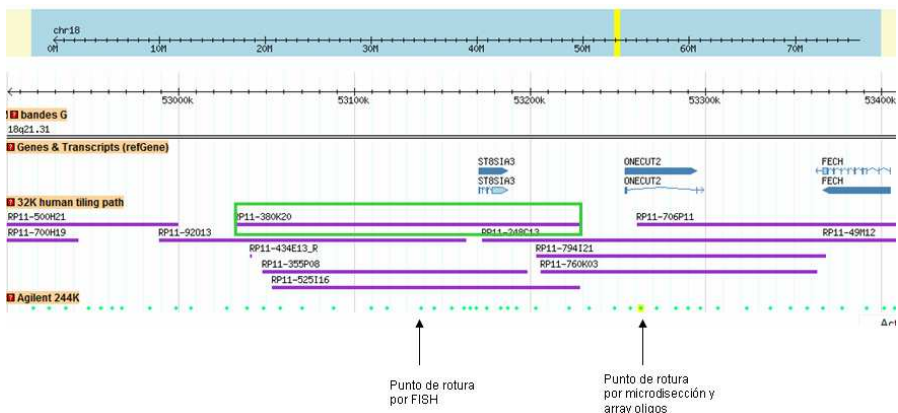


Fig. 74. Región del cromosoma 18 donde se localiza el punto de rotura de la translocación. Están señalados el BAC que cohibrida en ambos derivados y la sonda del array donde estaba predicha la localización del punto de rotura.

En el cromosoma 7 no hay ningún gen anotado contenido en el BAC interrumpido por el punto de rotura de la translocación, mientras que en el cromosoma 18 el gen que puede estar afectado es *ST8SIA3* (*ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 3*). Este gen tiene expresión descrita en cerebro

## RESULTADOS

fetal y adulto, así como en hígado fetal. Está implicado en la glicosilación (adición de carbohidratos) de proteínas, y pertenece a la familia de la sialotransferasas, que transfieren ácido siálico a las glicoproteínas o glicolípidos.

Mediante secuenciación total a partir de ADN<sub>g</sub> con la tecnología de *Paired end mapping* se obtuvo un número total de lecturas específicas de un sólo *locus* de 6.5 millones, de las cuales 72800 eran híbridas, es decir, tenían extremos correspondientes a dos cromosomas diferentes. En concreto 219/72000 de las lecturas tenían extremos del cromosoma 7 y 18, ninguna de ellas cercana a los puntos de rotura predichos por FISH.

Para comprobar la presencia de posibles reordenamientos en los puntos de rotura, así como en otros *loci* del genoma se hibridó una muestra de ADN<sub>g</sub> este paciente con el array de SNPs de alta densidad de Illumina (370K). No se apreciaron pérdidas ni ganancias de material genético en las zonas de los puntos de rotura de ninguno de los cromosomas con la densidad de sondas que proporciona este array.

Como único reordenamiento en otro *locus* del genoma se observó una duplicación de 245 Kb en el cromosoma X (Xq22.1, Mb 101) que contiene las dos variantes descritas del gen *NXF2* (*nuclear RNA export factor 2*), implicada en el transporte del ARNm del núcleo al citoplasma, pendiente de validar. Este *locus* no está alterado en ninguna de las 1978 muestras de controles hibridadas con el array de Illumina 1M en nuestro laboratorio.

Para intentar clonar el punto de rotura a nivel de nucleótido se diseñó una batería de cebadores en cada cromosoma (7 y 18), con orientaciones opuestas para amplificar en cada derivativo, sin éxito hasta el momento.

Por tanto, este paciente presenta una translocación *de novo* aparentemente balanceada entre los cromosomas 7 y 18, cuyos puntos de rotura definidos mediante microdissección manual, FISH reverso y FISH con BACs no predicen la formación de un nuevo gen de fusión y sí la posible interrupción o desregulación del gen *ST8SIA3* (18q21.21).

#### 5.1.2.4 Translocación 4: 46,XX,t(11;13)(q21;q22)

En este caso la paciente era una niña con RM y retraso del lenguaje que presentaba una translocación en sangre periférica aparentemente balanceada *de novo*: t(11;13)(q21;q22).

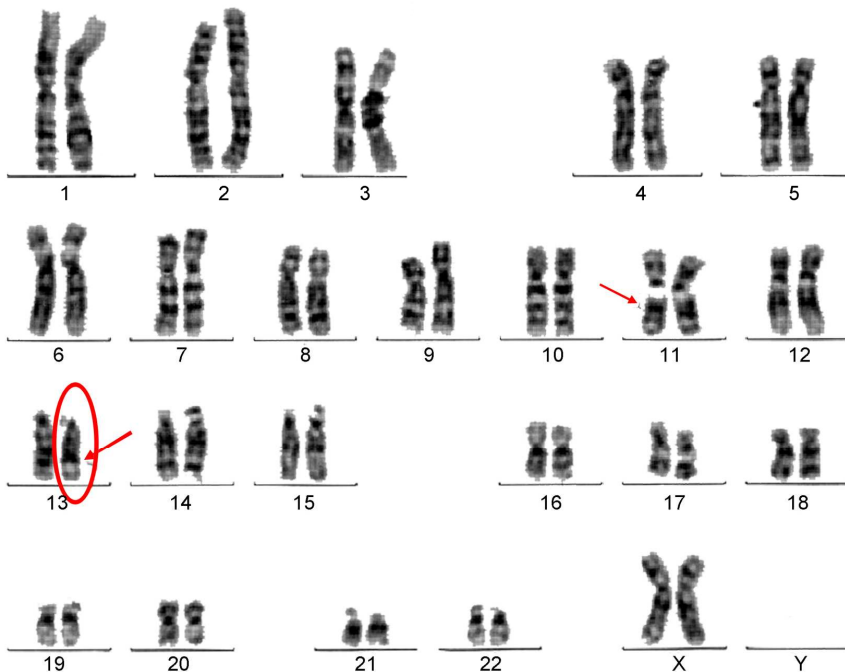
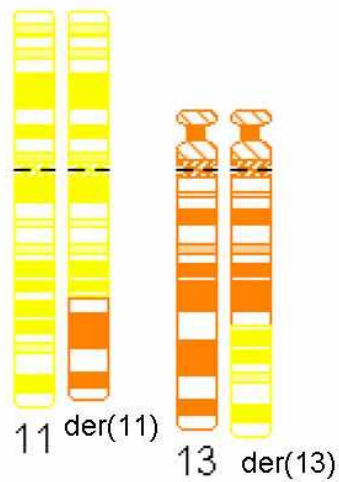


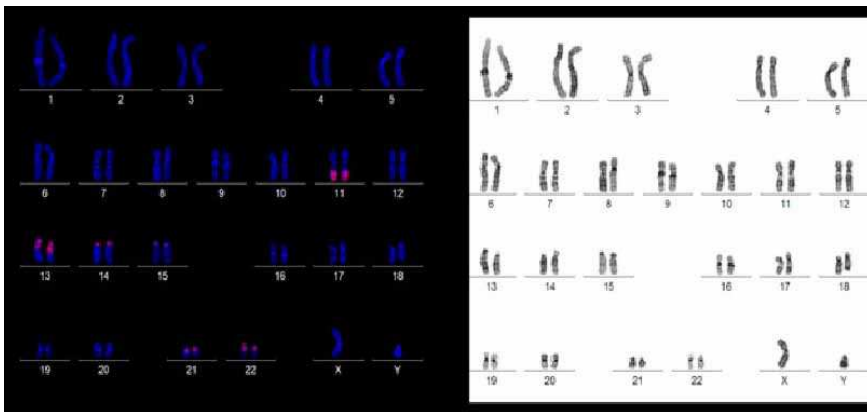
Fig. 75. Imagen del cariotipo de la paciente. Con flechas se señalan los puntos de rotura de la translocación. El cromosoma der(13) es el que aislamos por microdissección para analizar su contenido génico.

## RESULTADOS

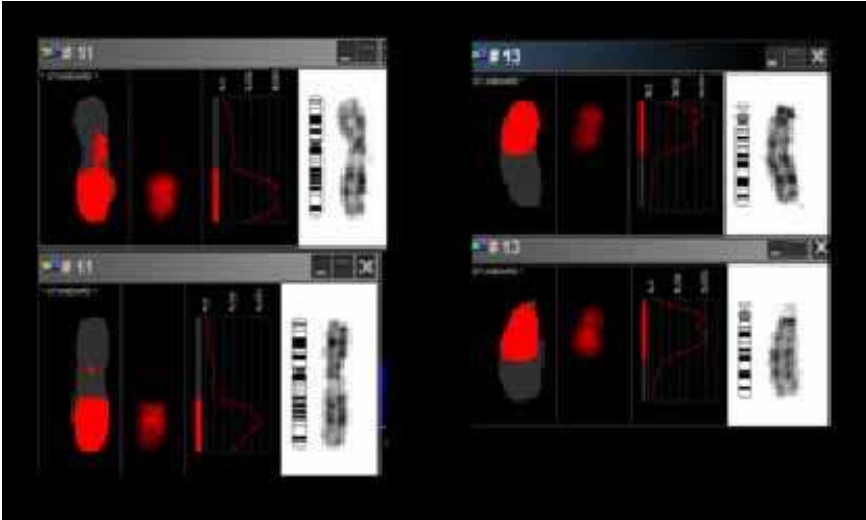


*Fig. 76. Ideogramas de los cromosomas 11 y 13 después de la translocación.*

Para clonar los puntos de rotura se aislaron 7 unidades de der(13) mediante microdissección manual, FISH reverso sobre metafases de una muestra control e hibridación sobre arrays (BACs y oligonucleótidos).



*Fig. 77. Imagen del FISH reverso de la hibridación del der(13) sobre metafases de un caso control. Se puede apreciar cohibridación en los centrómeros de los cromosomas acrocéntricos debido a la homología parcial de secuencia.*



*Fig. 78. Señal de hibridación obtenida para los cromosomas 11 y 13 con el FISH reverso del material amplificado del der(13).*

El ADN aislado y amplificado a partir de la microdissección se hibridó primero con el array de qGenomics para comprobar el comportamiento de este tipo de material sobre un array. Los resultados evidenciaron un aumento en el log ratio de los clones contenidos en el cromosoma aislado.

RESULTADOS

CHR11

CHR13

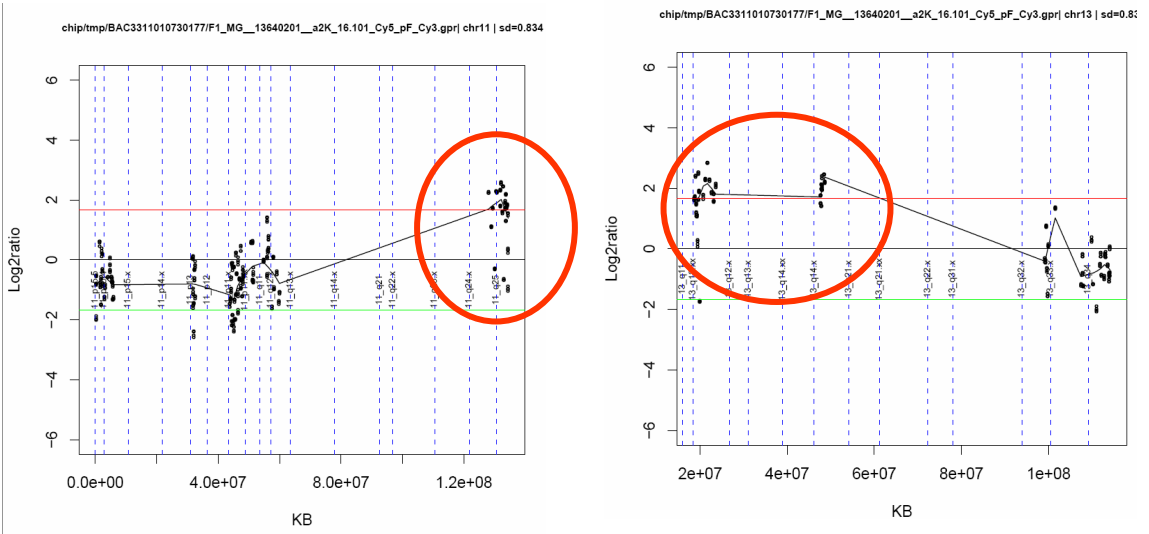


Fig. 79. Representación de los plots de los cromosomas 11 y 13 con el array qGenomics, en el que se señalan con un círculo rojo los clones que muestran ganancia.

A continuación se hibridó sobre el array de oligonucleótidos de Agilent 244K, obteniendo un patrón de hibridación muy similar, como se puede apreciar en la siguiente figura:

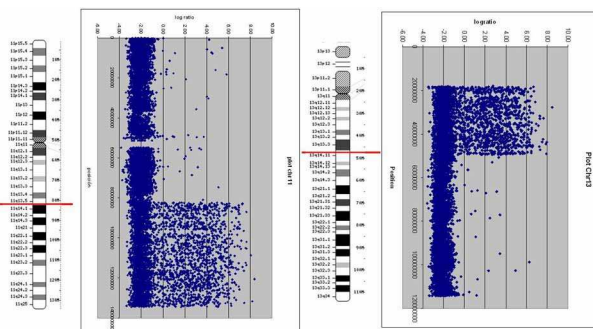


Fig. 80. Ideogramas de los cromosomas 11 y 13 en los que se señalan los puntos de rotura de la t(11;13), y en la parte derecha se representan las sondas de los oligonucleótidos del array Agilent 244K, en la que se puede apreciar el contenido génico del der(13).



La hibridación del material obtenido a partir de la microdissección sobre el array de oligonucleótidos permitió delimitar las sondas que estaban contenidas en el cromosoma derivativo. En el cromosoma 11, la primera sonda en un cluster con un ratio mayor que 0 es A\_16\_P02481378 (nt 82321946, 11q14.1), a 8886 pb de la siguiente sonda más proximal. En el cromosoma 13, la primera sonda que tiene un ratio mayor que 0 es A\_16\_P19809542 (nt 49430199, 13q14.2), a 12.3 Kb de la siguiente sonda. El porcentaje de falsos negativos para ambos cromosomas fue del 65%, mientras que el de falsos positivos un 0.5% en el caso del cromosoma 11 y un 0.45% para el cromosoma 13.

Una vez obtenidos los resultados del array de oligonucleótidos se seleccionaron los clones adyacentes a los puntos de rotura predichos para FISH, y la combinación que presentaba señal de hibridación en ambos derivados era la que formaban los clones RP11-815M10 (11q14.1, nt 82131926 - 82282297) y RP11-413A14 (13q14.2, nt 49405812 - 49541416). Por tanto, la fórmula cromosómica se reescribió como 46,XX, t(11;13)(q14.1;q14.3).

## RESULTADOS

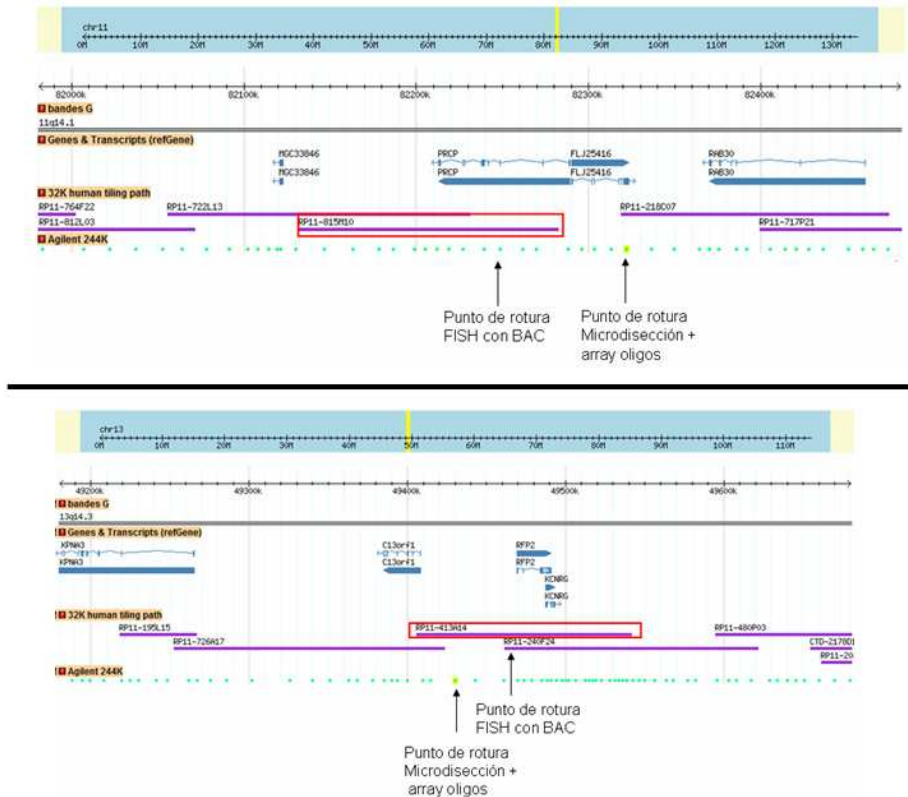


Fig. 81. Regiones donde se localizan los puntos de rotura de la translocación. En color amarillo están destacadas las sondas del array donde fijamos los puntos de rotura. Parte superior: cromosoma 11, parte inferior: cromosoma 13.

En el cromosoma 11 el punto de rotura interrumpe el gen *PRCP* (*prolylcarboxipeptidase*), puesto que la señal del BAC RP11-815M10 es mucho más visible en el der(11) que en el der(13), donde prácticamente no se aprecia, con lo que el punto de rotura está situado en la zona terminal del clon, precisamente donde localiza el gen *PRCP*. En el cromosoma 13 el BAC que abarca el punto de rotura contiene los genes *RFP2* (*TRIM13*), incluido en la región mínima delecionada en la leucemia linfática crónica tipo B (LLC-B); y el gen *KCNRG* (*potassium channel regulador*). La

distancia entre el punto de rotura predicho por el array de oligonucleótidos y el punto de rotura aproximado del clon que abarca el punto de rotura es de ~60 Kb en el cromosoma 11 y ~30 Kb en el cromosoma 13.

No se ha podido definir más el punto de rotura ni la presencia de otros reordenamientos en el genoma por disponer únicamente de material de cromosomas en fijador y no disponer de muestra de ADN.

En resumen, esta paciente presenta una translocación de novo aparentemente balanceada entre los cromosomas 11 y 13, cuyos puntos de rotura definidos mediante microdissección manual, FISH reverso e hibridación con array de oligonucleótidos no predicen la formación de un gen de fusión debido a la orientación transcripcional opuesta de los genes *PRCP* (11q14) y *RFP2* y *KCNRG* (13q14); si no la posible disrupción de alguno de estos genes.

#### **5.1.2.5 Translocación 5:**

**46,XY,t(4;15)(q24;q26),add(7)(q36)[15]/46,XY[5]**

Este caso es un paciente con una leucemia aguda mieloide secundaria a una leucemia crónica mielomonocítica tipo 2, con cariotipo en médula ósea (MO): 46,XY,t(4;15)(q24;q26),add(7)(qter)[15]/46,XY[5]. Para definir los puntos de rotura de la translocación se aislaron nueve unidades del cromosoma der(15) mediante microdissección manual. A pesar de la mala calidad de las metafases obtenidas, este cromosoma se pudo identificar con

## RESULTADOS

relativa facilidad al ser un cromosoma acrocéntrico de un tamaño mucho mayor que el resto de acrocéntricos (figura 82).

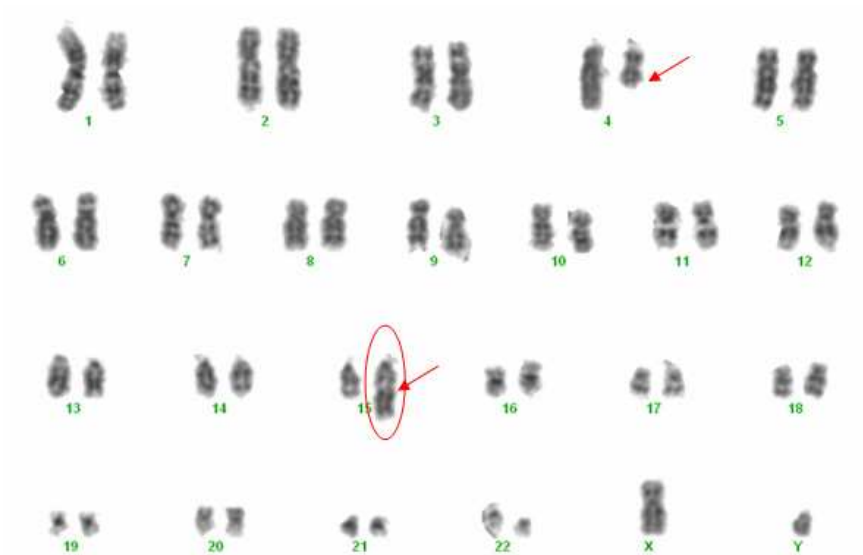


Fig. 82. Cariotipo del paciente, en el que se señalan con flechas los puntos de rotura de la translocación, así como el derivativo estudiado (rodeado en rojo).

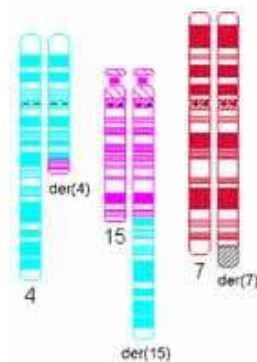
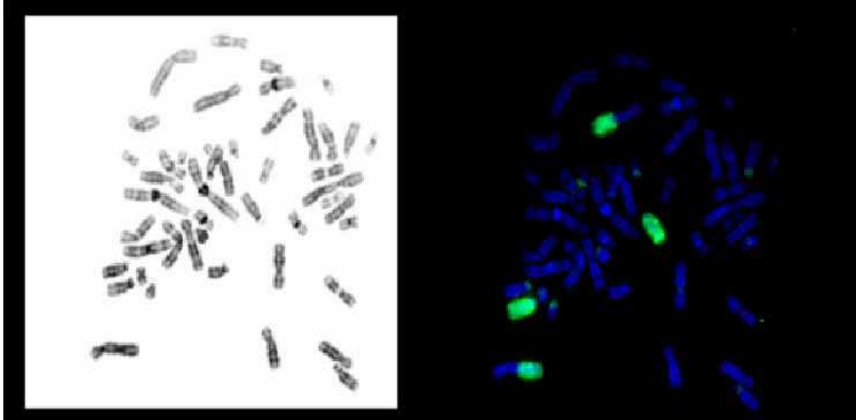
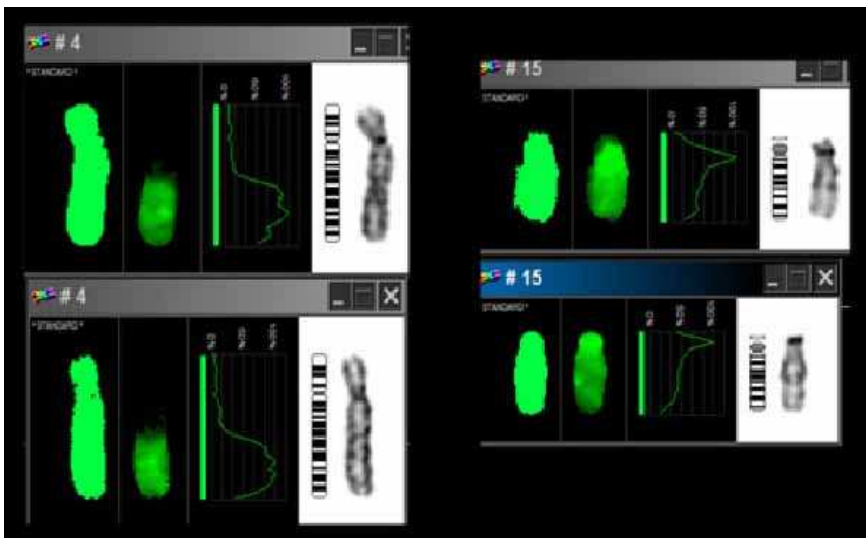


Fig. 83. Ideogramas de los cromosomas después de la translocación, y del cromosoma 7 con el material añadido en q terminal.

Las señales de hibridación del FISH reverso localizaban sobre la práctica totalidad de los cromosomas 15 y la parte distal del cromosoma 4.



*Fig. 84. Metafase hibridada mediante FISH reverso con el material amplificado a partir del der(15).*



*Fig. 85. Señal de hibridación del FISH reverso en los cromosomas 4 y 15, respectivamente. Hay señal de hibridación en la parte distal del cromosoma 4 y en la casi entera totalidad del cromosoma 15.*

## RESULTADOS

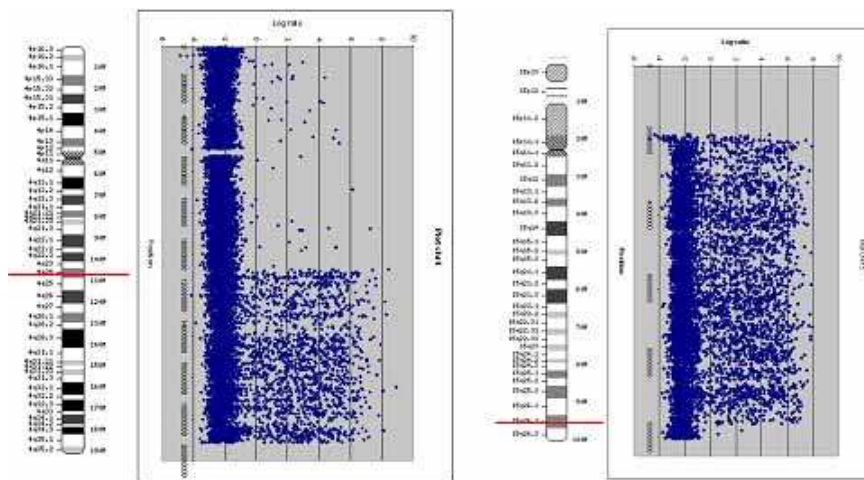


Fig. 86. Ideogramas de los cromosomas 4 y 15 con los puntos de rotura de la translocación. A su lado, plots obtenidos para las sondas del array Agilent 244K.

La hibridación del ADN obtenido a partir de la microdissección sobre el array de oligonucleótidos permitió delimitar las sondas contenidas en el cromosoma derivativo. En el cromosoma 4, la primera sonda en un cluster que tiene un ratio mayor que 0 es A\_14\_P104898 (nt 107324727, 4q24), a 11032 pb de la siguiente sonda proximal. En el cromosoma 15, la sonda es A\_16\_P20363081 (nt 96148374, 15q26.2), a 12234 pb de la siguiente sonda distal. En el cromosoma 4, el porcentaje de falsos negativos fue del 73%, y el de falsos positivos un 0.4%; mientras que en el cromosoma 15 se detectó un 70.12% de falsos negativos y un 0.64% de falsos positivos.

En el cromosoma 4 el punto de rotura estaría en la región más distal del gen *MGC16169* (*TBC domain-containing protein kinase-like*, 4q24). En el cromosoma 15 no hay genes descritos en la región implicada en el punto de rotura. En este caso, por tanto, no

es predecible tampoco la posible formación de un nuevo gen de fusión en ninguno de los cromosomas derivados.

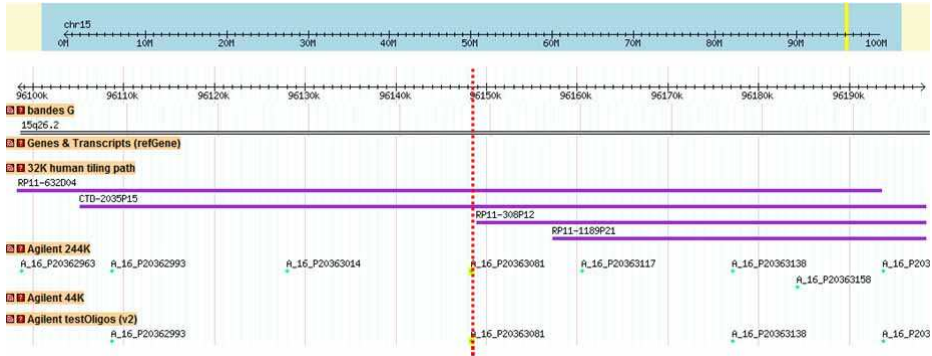


Fig. 87. Localizaciones de los puntos de rotura predichos por el array de oligonucleótidos en el cromosoma 15 señalados por una línea roja.

A partir de los datos obtenidos en el array de oligonucleótidos se seleccionaron BACs del cromosoma 4 para realizar FISH. El análisis del FISH reveló que el punto de rotura predicho por el array (entre los clones RP11-344A14 y RP11-41F09) coincidía con los resultados del FISH, puesto que el clon más proximal (RP11-344K14, 4q24, Mb 107) estaba deletado en las metafases portadoras de la translocación.

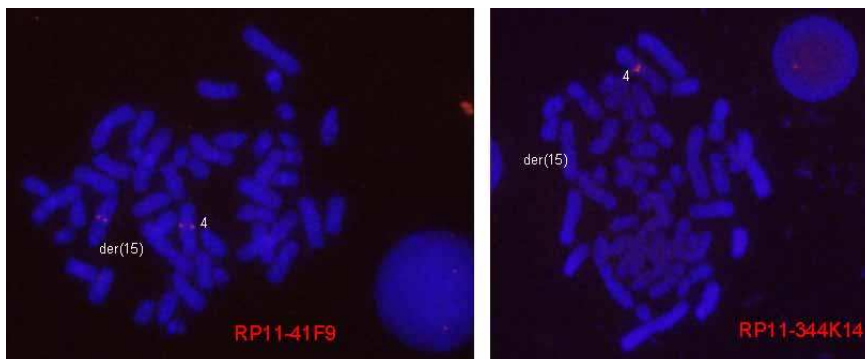


Fig.88. FISH con los clones RP11-41F9 (izquierda), que aparece translocado, y RP11-344K14 (derecha) que está deletado (sin señal en der(15) y una sola señal en núcleo interfásico).

## RESULTADOS

La hibridación con más BACs proximales reveló la presencia de una deleción de ~6 Mb (desde el clon RP11-416P03 hasta RP11-334K14), que incluye 38 genes anotados, desde *DDIT4L* hasta *MGC16169*, incluyendo el gen *TET2*, descrito recientemente como gen supresor de tumores asociado a alteraciones de la línea mieloide<sup>122-127</sup>. Se realizó un análisis mutacional de los 11 exones del gen *TET2* en el paciente, para descartar una mutación homocigota, con resultado negativo. Sólo se encontró el SNP rs2454206 (I1762V), localizado en el exón 11.

El punto de rotura proximal de la deleción estaba situado entre los clones RP11-470F02 (4q23, Mb 99.5) y RP11-416P03 (4q23, Mb 101.2).

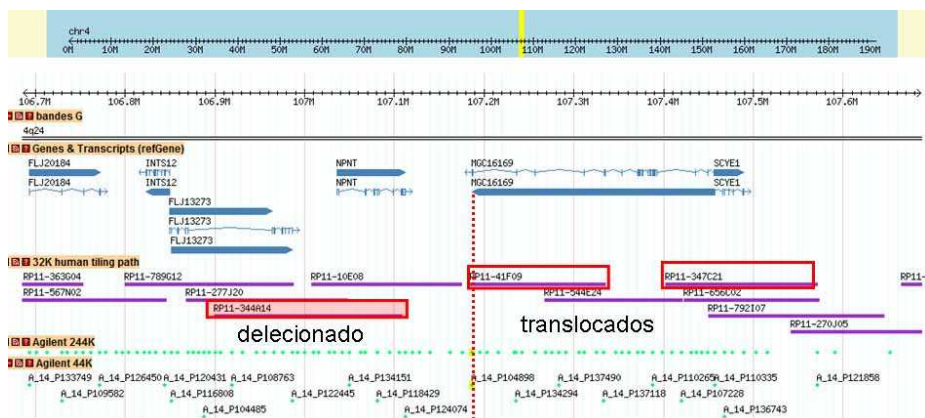


Fig.89. Situación de los BACs hibridados en la muestra, el más proximal delecionado. La línea discontinua indica el punto de rotura predicho por el array de oligonucleótidos.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos por FISH y array CGH, la fórmula citogenética se reescribió como 46,XY,t(4;15)(q24;q26),add(7)(qter)[15]/46,XY[5]. Por tanto, este paciente presenta una translocación aparentemente balanceada



en MO entre los cromosomas 4 y 15, con una delección de ~6 Mb en el cromosoma 4 (que incluye el gen *TET2*), así como una adición de material extra en 7qter de origen desconocido. Los puntos de rotura de la translocación predichos por microdissección manual, FISH reverso e hibridación con array de oligonucleótidos no predicen la formación de un gen de fusión, y sí la posible disrupción del gen *MGC16169* (4q24) y delección del gen *TET2*.

En la siguiente tabla se resumen las técnicas aplicadas para la caracterización de los casos portadores de translocaciones y los genes interrumpidos en cada uno de ellos (tabla 12).

<b>CASO</b>	<b>FÓRMULA CARIOTIPO</b>	<b>FENOTIPO</b>	<b>GENES INTERRUPTIDOS</b>	<b>TÉCNICAS CARACTERIZACIÓN</b>
Translocación 1	46,XX,t(9;11)(q34.1;p11.2)	RM, TEL	<i>GOLGA1</i> en 9q33.1, <i>PHF21A</i> en 11p11.2	WCP, FISH con BACs, Southern blot, PCR, secuenciación, western blot, northern blot
Translocación 2	45,XY,t(17;22)(p13.3;q11.2),-22	RM, síndrome polimalformativo	<i>VPSS3</i> en 17p13.3	FISH con BACs, array CGH, PCR microsatélites
Translocación 3	46,XY,t(7;18)(p15.3;q21)	Hipogonadismo hipogonadotrópico	<i>ST8S1A3</i> en 18q21?	FISH con BACs, microdissección manual, array oligonucleótidos, ultrasecuenciación, array SNPs Illumina 370K
Translocación 4	46,XX,t(11;13)(q14.1;q14.3)	Retraso desarrollo, lenguaje, TDAH	<i>PRCP</i> en 11q14.1 <i>RFP2</i> , <i>KCNRG</i> en 13q14.3?	Microdissección manual, array oligonucleótidos
Translocación 5	46,XY,t(4;15)(q24;q26),add(7)(qter)[5]/46,XY[5]	Leucemia aguda mielóide	<i>MGC16169</i> en 4q24 Delección de <i>TET2</i> (4q24)	Microdissección manual, array oligonucleótidos, FISH con BACs, secuenciación

*Tabla 12. Resumen de los resultados obtenidos para las translocaciones estudiadas y técnicas empleadas para su caracterización.*

## 5.2 MICRODISECCIÓN MANUAL Y LÁSER

### 5.2.1 Microdissección manual con aguja

Antes de procesar las muestras de los pacientes se procedió a aislar material cromosómico de 4 muestras diferentes usadas como control, realizando FISH reverso para comprobar los resultados.

En el caso de los controles, dependiendo del tamaño del cromosoma a aislar se empleó el método en seco o húmedo (tabla 13):

Control	Nº unidades aisladas	Método
Banda 2q subterminal	10	Seco
Cromosoma 2	8	Húmedo
Brazo 7p	9	Seco
SMC invdup(14)	10	Seco

*Tabla 13. Relación del número de unidades aisladas y el método empleado para los controles previos de microdissección.*

## RESULTADOS

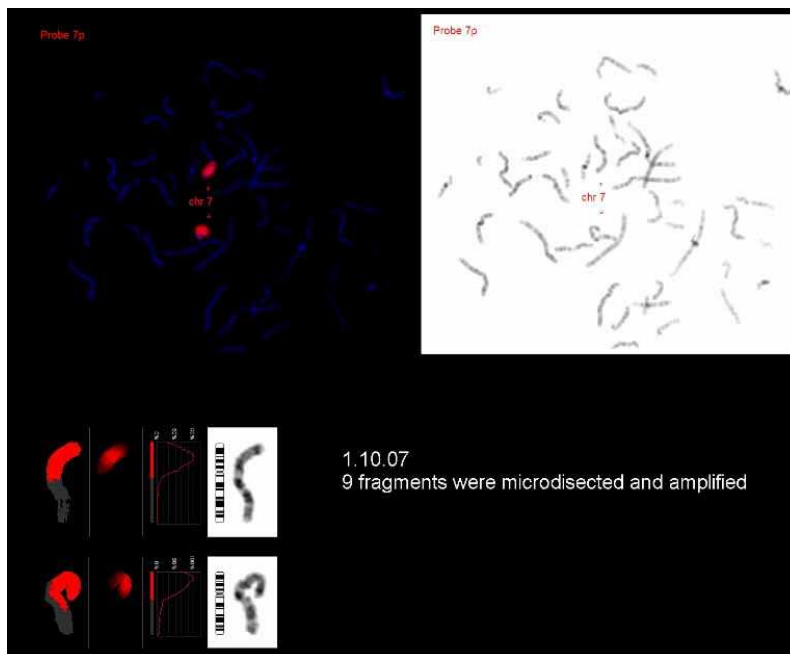


Fig. 90. FISH reverse de un caso control en el que se aislaron 9 unidades del brazo cromosómico 7p.

Una vez analizado el resultado obtenido con los controles, se procesaron tres casos de pacientes con translocaciones aparentemente balanceadas (translocaciones 3, 4 y 5) y un caso con un cromosoma marcador (marcador 5), obtenidos a partir de muestras en fijador de cultivos desde líquido amniótico, sangre periférica y médula ósea.

En estos casos, que se caracterizaron mediante microdissección manual, *painting* reverse y arrays de BACs y oligonucleótidos, los cromosomas derivados a aislar se eligieron por la facilidad para su identificación. Se aislaron entre 6 y 9 unidades dependiendo de la concentración de metafases de la muestra y de la distribución del cromosoma de interés en las extensiones, es decir, de que fueran abordables mediante el micromanipulador con aguja sin riesgo de contaminación con otros cromosomas.

Caso	Cariotipo	Cromosoma aislado	Nº unidades	Muestra
Marcador 5	47,XX,+mar	mar	8	LA
Translocación 3	46,XY,t(7;18)(p15.3;q21)	der(7)	6	SP
Translocación 4	46,XX,t(11;13)(q21;q22)	der(13)	7	SP
Translocación 5	46,XY,t(4;15)(q24;q26), add(7)(qter)[15]/46,XY[5]	der(15)	9	MO

*Tabla 14. Listado de los cromosomas aislados en cada uno de los casos y el material de origen para realizar el cultivo citogenético.*

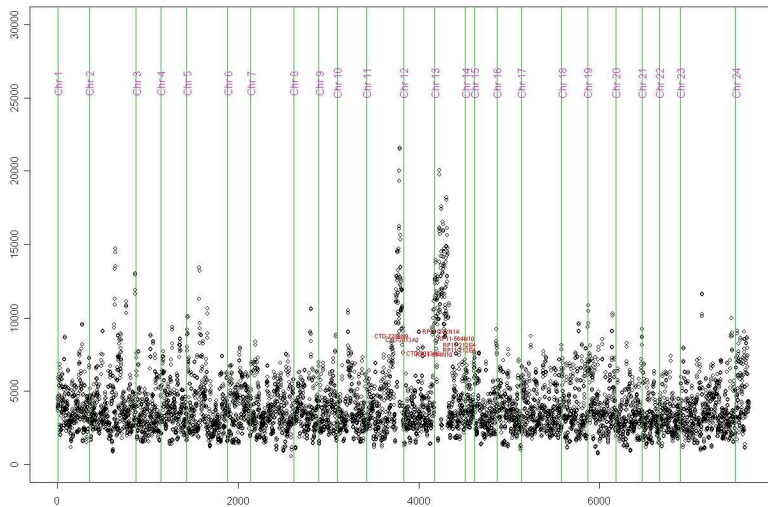
A partir de los cromosomas aislados se realizaron tres rondas de amplificación por DOP-PCR, obteniendo concentraciones y purezas similares en todos los casos. El material empleado como sustrato para la hibridación sobre los arrays de BACs o de oligonucleótidos fue el obtenido en la primera ronda de amplificación de DOP-PCR.

Muestra	Nº unidades aisladas	[ ] ng/µl	Ratio 260/280	Ratio 260/230	ng totales
2q subter	10	447.9	1.78	1.97	20155
Chr 2	8	519.8	1.67	1.52	23391
7p	9	370.3	1.75	1.76	16663
Invdup(14)	10	393.9	1.75	1.79	17725
Marcador 5	8	378.2	1.7	1.68	17019
Translocación 3	6	563.1	1.72	1.69	5631
Translocación 4	7	403	1.7	1.68	18135
Translocación 5	9	440.4	1.71	1.71	19818

*Tabla 15. Concentraciones y purezas obtenidas para cada una de las muestras después de la primera ronda de amplificación por DOP-PCR.*

## RESULTADOS

En el análisis de los resultados de la hibridación del material del der(13) de la translocación 4 [t(11;13)(q21;q22)] sobre el array de BACs de qGenomics, se usaron los datos crudos, y se observó un aumento del  $\log_2$ ratio de los clones localizados en la parte distal del cromosoma 11 y proximal del cromosoma 13, como se puede apreciar en la siguiente imagen:



*Fig. 91. Gráfico en el que se muestran los valores de intensidad de fluorescencia de todos los BACs del array de qGenomics.*

En la hibridación sobre el array de oligonucleótidos de Agilent (244K) este aumento de intensidad de las sondas presentes en el cromosoma derivativo quedaba patente al representar todas las sondas de los cromosomas que formaban parte de la translocación:

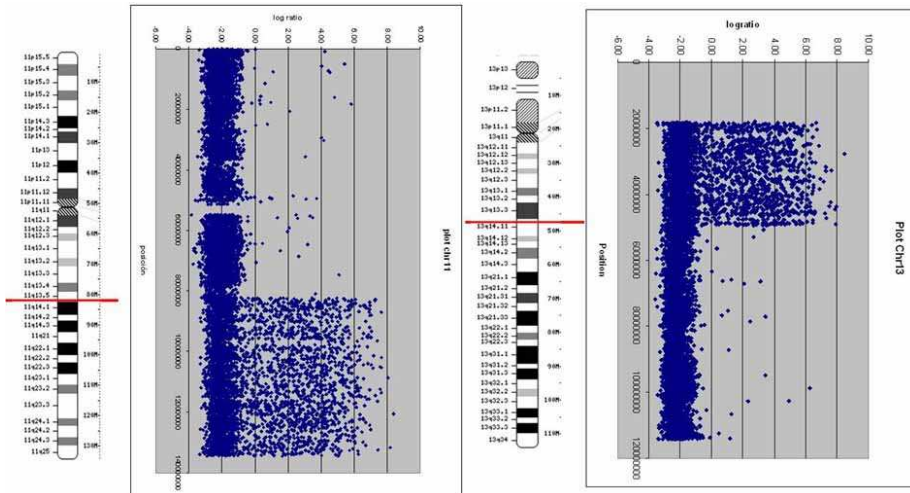


Fig. 92. Gráficos de los resultados obtenidos para las sondas de los cromosomas 11 y 13 en el array de oligonucleótidos de Agilent 244K, con un aumento en la intensidad de fluorescencia en las regiones distales del cromosoma 11 y proximales del cromosoma 13.

## 5.2.2 Microdissección láser

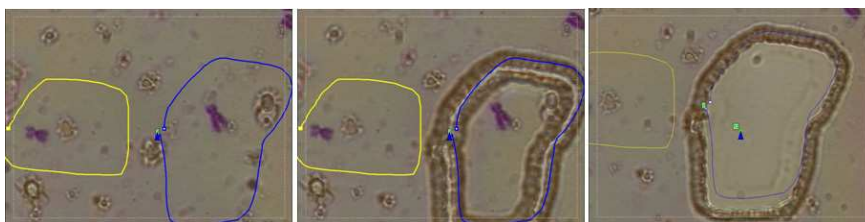
Mediante este método se han realizado diversas pruebas con distintas combinaciones de microdisector, soporte, tinción, captura, digestión, amplificación y validación.

- Se han probado dos plataformas de aislamiento de cromosomas mediante microdissección láser: PALM y Leica LMD6000.
- Como soportes se han usado: cubreobjetos con membranas PEN y POL, marcos con membrana sola (PET) y cubreobjetos sin membrana.
- Las tinciones empleadas fueron Giemsa o Wright, en ocasiones con previo tratamiento con 2xSSC a 65°C.
- Los cromosomas se recogieron en tapones de tubos de 200  $\mu$ l con 20  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O, TE o tampón de enzima de restricción; o en tapones de tubos de 200  $\mu$ l de silicona.

## RESULTADOS

- Se realizaron pruebas de digestión con proteinasa K del material después del aislamiento.
- Se probaron tres sistemas de amplificación: DOP-PCR, Genomiphi y *Ligation-adaptor mediated PCR*.
- Para realizar la validación se realizó PCR de locus específico, FISH reverso o CGH sobre metafases.

Las pruebas realizadas sobre extensiones con membrana evidenciaron que el grosor del láser ( $\sim 4 \mu\text{m}$ ) era prácticamente igual al tamaño de los cromosomas, dependiendo de la metafase. El área mínima de membrana necesaria para separar del soporte ( $\sim 150 \mu\text{m}^2$ ) implica que los cromosomas deben estar suficientemente extendidos y separados entre ellos para que puedan ser aislados individualmente; así como para evitar contaminaciones, como se puede apreciar en las siguientes imágenes:



*Fig. 93. Extensión sobre un cobreobjetos con membrana PEN, en la que se aprecian un cromosoma 16 y un 12 a 100X. El cromosoma 12 se corta mediante láser PALM y después se catapulta para su aislamiento.*



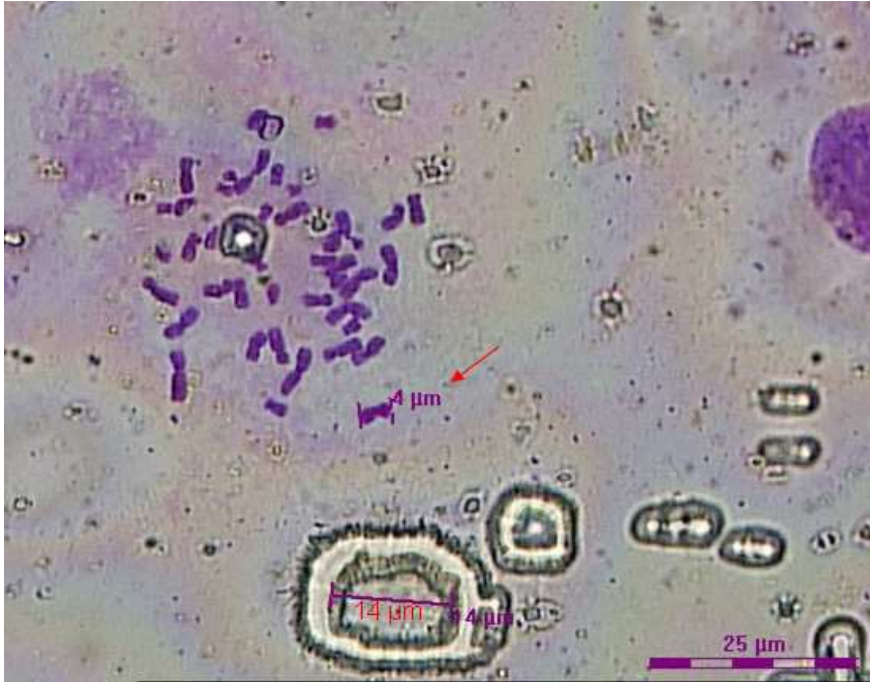


Fig. 94. Metafase en cubreobjetos con membrana PEN, a 63X, en microdisector Leica. El cromosoma señalado con la flecha es del grupo C (cromosoma 11) y tiene un tamaño de 4  $\mu\text{m}$ , prácticamente igual al grosor del láser.

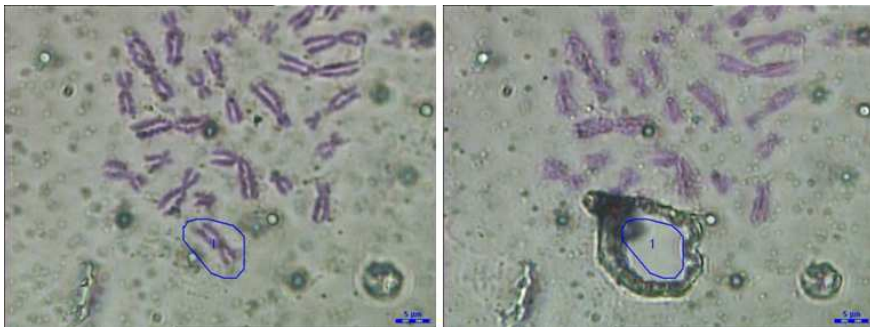
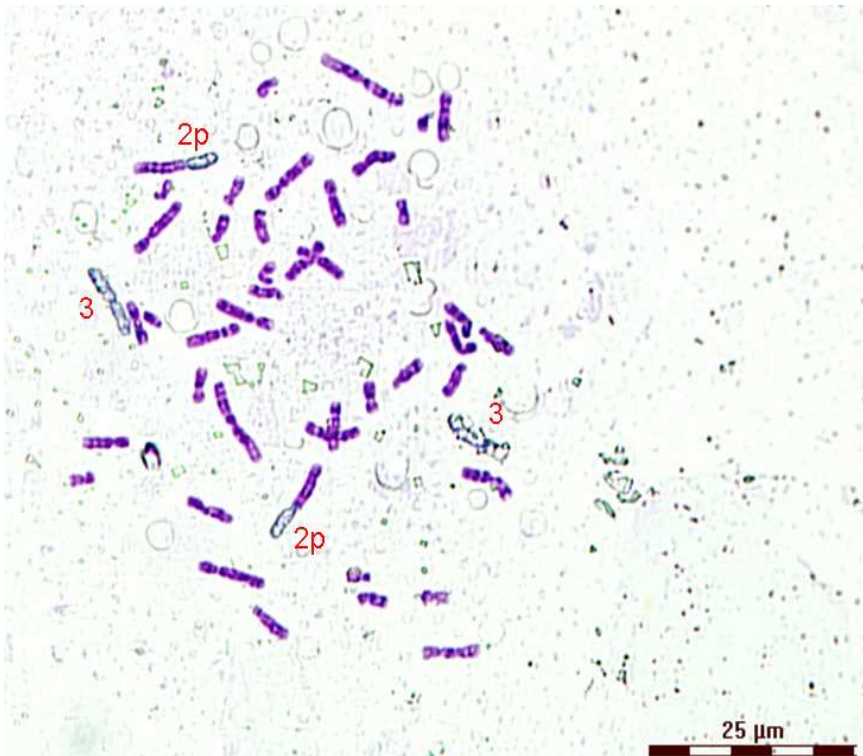


Fig. 95. Metafase sobre un soporte de membrana PET únicamente, a 150X en microdisector Leica. En la imagen derecha se ha aislado un cromosoma del grupo C.

## RESULTADOS

La identificación de los cromosomas sobre las extensiones con membrana también resultó muy dificultosa en algunas ocasiones, debido a la mala calidad del patrón de bandas obtenido y las irregularidades de la superficie de la membrana. Por estos motivos, el número mayor de cromosomas que se aislaron fue reducido (21 unidades del cromosoma 3).

Las siguientes pruebas sobre cubreobjetos sin membrana mostraron una mejora sensible en la identificación de los cromosomas. En esta ocasión el láser debía incidir directamente sobre el cromosoma, lo que permitió aislar brazos cromosómicos, incluso de pequeño tamaño como 8p. La mejora en la identificación así como la posibilidad de aislar cromosomas cerca de otros permitió aumentar en casi 10 veces el número de unidades aisladas, hasta llegar a 182 cromosomas (cromosoma 1).



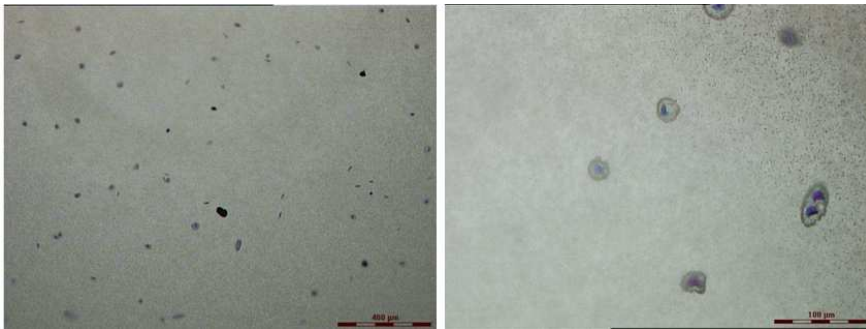
*Fig. 96. Metafase en cubreobjetos sin membrana, a 63X en microdisector Leica. Se han aislado los brazos cromosómicos de 2p y los cromosomas 3.*

La validación de los resultados obtenidos se realizó mediante la técnica de PCR de locus específico, diseñadas para amplificar fragmentos de pequeño tamaño (165-456 pb). El resultado de esta validación mediante PCR fue negativo. En los casos en los que la validación se realizó mediante las técnicas de DOP-PCR y FISH reverso, de forma similar al protocolo de microdisección manual, tampoco se observó señal de hibridación.

No fue posible observar si los cromosomas aislados estaban presentes el tapón colector, debido a que la valoración del tapón se realiza con un objetivo de 10X, y además en el caso de aislamiento sin membrana el material está fragmentado.

## RESULTADOS

Otra de las pruebas que se realizó consistió en el aislamiento de núcleos en lugar de cromosomas, con el objetivo de aumentar la cantidad de material. La extensión se realizó sobre un cubreobjetos con membrana PEN, y los núcleos se recogieron en un tapón de silicona, lo que permitía comprobar visualmente si el material aislado llegaba al tapón. Después de aislar 63 núcleos se visualizaron ~30 en el tapón, mientras que tras 750 núcleos se contabilizaron ~320 en el tapón (4 campos de ~78 núcleos). La tasa de recuperación fue aproximadamente del ~50% del material aislado. En la siguiente imagen se puede apreciar cómo se observan los núcleos aislados en el tapón:



*Fig. 97. Núcleos aislados por microdissección láser desde cubreobjetos con membrana. Izquierda, a 10X; derecha, a 20X.*

## **6. DISCUSIÓN**



La discusión de los casos está en el mismo orden que los resultados, para facilitar el seguimiento.

### **6.1 Trisomía parcial de 6p. Marcador 1.**

Hemos caracterizado la muestra de un paciente con craneosinostosis y leve retraso del desarrollo asociado a TDAH que presenta un cromosoma extra en mosaico (~16 Mb en la región 6p11.2→ cen), detectado por cariotipo postnatal a los 3 meses de vida en sangre periférica. Hemos observado una reducción del porcentaje de células portadoras del marcador en sangre, pasando del 70% a los 3 meses de vida al 30% a los 18 meses y una variabilidad importante entre tejidos procedentes de distintas capas embrionarias. Se comparó asimismo la posible diferencia de porcentaje de mosaicismo en distintos tejidos: origen ectodérmico (DNA extraído de folículo piloso), mesodérmico (DNA de sangre periférica) y endodérmico (DNA de mucosa bucal). El mosaicismo en sangre periférica era de un 30%, en mucosa bucal de un 55% y en pelo superior (76%), aunque en este caso la inferior calidad del DNA extraído disminuye la fiabilidad de la técnica. Dado que el origen del cromosoma es materno, con presencia de dos alelos maternos diferentes, podemos concluir que el cromosoma marcador procede de un error en meiosis I materna. El patrón mosaico se debe probablemente a la pérdida del marcador que puede ocurrir en algunas mitosis al condicionar un mayor riesgo de mal apareamiento cromosómico en cada división celular.

## DISCUSIÓN

Esta región contiene ~60 genes descritos, desde *SPATS1* hasta *C6orf216*, para los que el paciente es trisómico en todas las células en las que el SMC(6) esté presente.

La trisomía parcial de la región 6p es una alteración poco frecuente, y generalmente es secundaria a una translocación no balanceada en los progenitores. Hay aproximadamente 40 casos descritos, en los que la trisomía afecta casi siempre regiones más teloméricas, con puntos de rotura que varían desde 6p11 hasta 6p25<sup>132-135</sup>. En este caso la trisomía parcial es de una región más centromérica (desde 6p21.1 hasta el centrómero), que aparece en forma de cromosoma adicional. Revisando la literatura, este es el primer caso que presenta una trisomía parcial de la región 6p11 en forma de cromosoma marcador.

La craneosinostosis se define como una fusión prematura de una o más suturas craneales. Es una de las anomalías craneofaciales más comunes, con una prevalencia de 1:2100-3000 recién nacidos. Están descritos más de 100 síndromes genéticos diferentes asociados con craneosinostosis<sup>136</sup>. Hay tres causas principales que pueden producir un resultado de craneosinostosis: una microcefalia primaria, una anomalía ósea primaria y otros factores externos con efecto deformador durante el embarazo. En la región cromosómica incluida en el SMC no está descrita la presencia de ningún locus de craneosinostosis ni microcefalia, con lo que el hecho de que la única alteración citogenética observada sea este cromosoma marcador sugiere que puede haber genes sensibles a aumento de dosis en la región trisómica que tengan efecto o influencia en el fenotipo del paciente y el desarrollo anormal del cerebro. En la siguiente tabla (tabla 16) se resumen



los principales síndromes asociados a craneosinostosis y los genes asociados <sup>136</sup>:

Síndrome	Gen	Localización
Apert	<i>FGFR2</i>	10q24-q25
Crouzon	<i>FGFR2</i>	10q24-q25
Pfeiffer	<i>FGFR1</i>	8p11.2
	<i>FGFR2</i>	10q24-q25
Saethre-Chotzen	<i>TWIST</i>	7p21.1
Tipo Boston	<i>MSX2</i>	5q35
Muenke	<i>FGFR3</i>	4p16.3
Jackson-Weiss	<i>FGFR2</i>	4p16.3
Beare-Stevenson	<i>FGFR2</i>	4p16.3
Crouzon con acantosis nigricans	<i>FGFR3</i>	4p16.3

La dificultad de determinar el gen o genes mejores candidatos en esta alteración se debe al tamaño de esta región (16 Mb), que contiene gran cantidad de genes. Basado en su función conocida, un posible candidato para la craneosinostosis es *BMP5* (*bone morphogenetic protein*), localizado en 6p12, con expresión durante la fusión de las suturas craneales. Por lo tanto es lógico proponer que la sobreexpresión de este gen por su estado trisómico en el paciente, podría acelerar el patrón normal de fusión de las suturas craneales, resultando en un fenotipo de craneosinostosis. Teniendo en cuenta que el cromosoma marcador es posiblemente menos estable en cada mitosis y que su distribución en diferentes tejidos es variable, lo que se corrobora con nuestros resultados, no podemos saber cual es el porcentaje de células trisómicas en los tejidos de interés (huesos del cráneo y SNC).

En resumen, nuestros datos han permitido definir el fenotipo para

una trisomía parcial previamente no descrita y bien caracterizada a nivel molecular (16 Mb desde 6p21.1 hasta el centrómero) y proponer genes nuevos candidatos para craneosinostosis. El caso ilustra la conveniencia de realizar siempre un cariotipo cuando se observa una microcefalia aislada con craneosinostosis que no se corresponde a uno de los cuadros monogénicos conocidos (ver anexo <sup>137</sup>).

### **6.2 Trisomía parcial de 10p y 10q. Marcador 2.**

Hemos caracterizado el contenido génico y el origen de un cromosoma marcador *de novo* en mosaico detectado pre y postnatalmente en un paciente con labio leporino y anomalías cardíacas (comunicación interventricular). Este cromosoma contiene material del cromosoma 10 (10p11.21-q11.22; Mb 36.11-48.21), tiene un tamaño de ~12 Mb y es de origen paterno. La presencia del mismo alelo paterno duplicado indica que el origen del SMC es postzigótico, probablemente debido a un error en meiosis II, ya que se originan a partir de la duplicación del mismo cromosoma. Esta región contiene 140 genes descritos, desde *PBEF2* hasta *GDF10*. Se ha descartado la disomía uniparental para el cromosoma 10 en dos *loci* no incluidos en el cromosoma marcador. El paciente presenta por tanto una trisomía parcial para una región genómica importante del cromosoma 10. En ausencia de otras alteraciones detectadas, esta trisomía podría ser la causa de los problemas de desarrollo que presenta (corazón y línea media).

En la base de datos de sSMCs (<http://www.med.uni-jena.de/fish/sSMC/00START.htm>) figuran dos pacientes descritos

con cromosomas marcadores originarios del cromosoma 10 de similar tamaño con fenotipo normal, así como otros dos casos con fenotipo anómalo: retraso de crecimiento y déficit de atención; y problemas de lenguaje (dispraxia oral).

En la literatura se ha descrito la presencia de un cromosoma marcador en anillo [r(10)(p10p12)] en un paciente de 16 años con RM moderado, fisura del paladar y rasgos dismórficos (orejas de implantación baja con antihélice prominente y micrognatia), sin anomalías cardíacas. En sangre periférica este anillo está presente en un 66% de células. El origen del SMC se definió con sondas centroméricas del cromosoma 10, y sondas específicas de 10p11.2 (presentes en el cromosoma extra) y 10q11.2 (sin señal en el SMC) <sup>138</sup>. El contenido de este marcador, pese a no estar definido con la precisión de nuestro caso, solapa parcialmente, por lo que puede haber genes en 10p11 que contribuyan a la correcta fusión del paladar.

Recientemente se han descrito siete casos con duplicaciones de la región 10p11.2 -10q11.2 (en forma de duplicación directa o de sSMC) sin anomalías fenotípicas <sup>139</sup>. Solamente uno de ellos (caso 4) ha sido caracterizado mediante array CGH, delimitando los puntos de rotura con una precisión equivalente a la de nuestros casos. Presenta una duplicación de 9.07 Mb (Mb 34.75-43.82) que contiene 21 genes descritos, desde *PARD3* hasta *ZNF32*. Entre estos genes se encuentra el oncogén *RET*, cuya amplificación no ha sido descrita en patología. Puesto que el paciente no tiene un fenotipo asociado, los autores proponen que la presencia de 3 copias de este gen puede tener un efecto protector con respecto a la predisposición a cáncer <sup>139</sup>. Teniendo en cuenta que la

## DISCUSIÓN

duplicación de estos 21 genes (15 de los cuales solapan con el caso del marcador 2) no se asocia con una alteración fenotípica, los posibles genes responsables del fenotipo del paciente con el SMC(10) [marcador 2] deben estar localizados en la región distal (Mb 43.82-48.21).

Uno de los posibles genes que pueden contribuir al fenotipo es *LOC100310*, un mRNA que codifica para una proteína similar a *migration-inducing gene 16 protein* (neurogénesis). Como genes candidates, destacan también *GDF2* (*Growth differentiation factor 2, BMP9*) y *GDF10* (*Growth differentiation factor 10, BMP3B*). Ambos localizan en 10q11.22, en la Mb 48.03 y 48.05, respectivamente. Son miembros de la familia BMP (*Bone morphogenetic protein*) implicados en la regulación del crecimiento y diferenciación celular en tejidos embrionarios y adultos, así como en la formación y morfogénesis del hueso<sup>140-144</sup>. *GDF2* tiene una función inhibitoria en la regulación de la migración de células endoteliales y en el crecimiento celular, mientras que *GDF10* está implicado en el desarrollo del músculo esquelético<sup>141</sup>. Una sobreexpresión de estos genes podría afectar el patrón de migración y cierre del paladar, resultando en un fenotipo de labio leporino.

No obstante, ningún caso publicado tiene bien definidos los puntos de rotura para poder comparar con nuestro caso y establecer correlaciones precisas. Es necesario un seguimiento clínico para comprobar el desarrollo psicomotor y de aprendizaje de este paciente, ya que podrían presentarse otras alteraciones fenotípicas de manifestación más tardía que la edad actual del paciente (12 meses).

### 6.3 Trisomía parcial de 10q y 14q. Marcadores 3.

En este caso hemos caracterizado dos cromosomas marcadores *de novo* originarios de los cromosomas 10 y 14, respectivamente, en un paciente con mínimos rasgos dismórficos. La trisomía del cromosoma 10 abarca ~3 Mb desde 10p11.21→p10 (Mb 35.54-38.65) y 2 Mb del cromosoma 14 (14q11.2, Mb 19.48-21.48). El tercer marcador procede también del cromosoma 14 y es algo más pequeño (1.2 Mb desde el centrómero). El paciente presenta por tanto tetrasomía y/o trisomía para las regiones eucromáticas del cromosoma 14 incluidas en los marcadores (~0.5 y 1.5 Mb, respectivamente). El origen de ambos cromosomas marcadores es materno, y teniendo en cuenta la presencia de dos alelos diferentes maternos, podemos suponer que la presencia de estos SMC se debe a un error en meiosis I, ya que se originan a partir de cromosomas diferentes. Se ha descartado asimismo la existencia de disomía uniparental de los cromosomas 10 y 14 en *loci* no incluidos en los SMCs.

La región del cromosoma 10 contiene 22 genes anotados, desde *CREM* hasta *LOC1001290*. En cambio, la región del cromosoma 14 incluye 121 genes descritos: desde *OR4K16P* hasta *TRAV9-2*, si bien muchos de ellos son familias y pseudogenes (receptores olfatorios, tRNAs, receptores de linfocitos T,...).

En la base de datos de sSMC (<http://www.med.uni-jena.de/fish/sSMC/00START.htm>) figuran dos individuos descritos con marcadores originarios del cromosoma 10 de similar tamaño, así como diversos casos con marcadores del 14 también similares, en todos los casos con fenotipo normal. Recientemente el mismo

## DISCUSIÓN

grupo ha descrito siete casos con duplicaciones de la región 10p11.2 -10q11.2 (en forma de duplicación directa o de sSMC) sin anomalías fenotípicas <sup>139</sup>. Solamente el caso 4 ha sido caracterizado mediante array CGH. Presenta una duplicación de 9.07 Mb (Mb 34.75-43.82) que contiene 21 genes descritos, desde *PARD3* hasta *ZNF32*. Al igual que el caso anterior, también está incluido en el marcador el oncogén *RET*, cuya amplificación no se asocia a patología conocida. El SMC(10) de nuestro caso es de un tamaño menor, por lo que la ausencia de fenotipo en ambos pacientes nos lleva a proponer un asesoramiento de buen pronóstico con respecto a la duplicación de esta región del cromosoma 10.

La mayoría de los casos descritos derivados del cromosoma 14 son invdup(14)(q11.1). Sin embargo, no hay casos previamente descritos con marcadores múltiples afectando a los dos cromosomas de este paciente. Se desconocen las posibles repercusiones fenotípicas, si existen, de la alteración descrita. Teniendo en cuenta que en la actualidad el paciente presenta un correcto desarrollo psicomotor y de crecimiento, con mínimos rasgos dismórficos, se podría conjeturar que la presencia de estos SMCs no está relacionada con repercusión clínica. No obstante, debido a la edad actual del paciente (10 meses) sería importante realizar un exhaustivo seguimiento clínico para comprobar si aparece algún tipo de manifestaciones fenotípicas de aparición más tardía (dificultades de aprendizaje, leve retraso mental, etc.).

#### 6.4 Trisomía parcial de 7p y una región distal de 7q. Marcador 4.

En este caso hemos caracterizado un cromosoma marcador complejo originario de dos regiones diferentes del cromosoma 7, detectado pre y postnatalmente en un paciente con un fenotipo fundamental de retraso del crecimiento. El cariotipo prenatal en líquido amniótico era 47,XY,+mar; mientras que en el postnatal en SP el cromosoma está en mosaicismo: 47,XY,+mar[65]/46,XY[20]. El cariotipo paterno es normal, sin embargo no hay disponible muestra materna puesto que el paciente fue concebido mediante FIV con donación de óvulos.

Mediante M-FISH y pintado cromosómico se identificó el SMC prenatalmente como originario del cromosoma 7. El contenido génico se definió postnatalmente por array CGH de BACs y array de SNPs. Este paciente presenta una trisomía parcial de ~4.70 Mb desde la banda 7p12.1 hasta el centrómero (entre las Mb 52.88 y 58), así como de 1.7 Mb en 7q36.3 (Mb 150.345-152.026); ambas intercromosómicas. Tanto el exceso de material en 7p12.1 como el material procedente de 7q36.3 se encuentran dentro del cromosoma marcador. La región 7p11.2-cen contiene 17 genes anotados, mientras que en la región 7q36.3 hay 23 genes descritos. Como genes candidatos a estar relacionados con el fenotipo podemos destacar *EGFR* (*epidermal growth factor receptor*) y *ECOP* (*EGFR-coamplified and overexpressed protein*) de la región 7p12.1-cen. En la región de 7q36.3 localizan los genes *CDK5* (*cyclin dependent kinase 5*) y *RHEB* (*Ras homolog enriched in brain*). Estos dos genes están implicados en la regulación del

## DISCUSIÓN

ciclo celular, y *RHEB* en concreto en regulación del crecimiento por la vía insulina/TOR/S6K.

El origen parental no ha podido determinarse con certeza por la ausencia de muestra materna, aunque la presencia de dos alelos iguales a los del padre no descarta el origen en meiosis I paterna. No hay disomía uniparental (UPD) en ninguno de los *loci* duplicados ni en el resto del cromosoma 7, con lo que la causa del retraso de crecimiento tipo síndrome de Silver-Russel no parece ser la UPD. Hay una excepción en 7q36.3 en el marcador D7S2465 (Mb 155), en el que se observaron 2 alelos (334-336) no coincidentes con los paternos (338-246), lo que sería compatible con UPD materna, o con una mutación en el cebador del marcador que origine un deslizamiento que genere un producto de PCR de tamaño distinto, interpretándose como un alelo diferente. En cualquier caso, no hay genes con impronta descritos en esta región distal del cromosoma 7. La ausencia de muestra materna impidió comprobar esta posible UPD, así como la presencia de reordenamientos que facilitasen la presencia de este SMC, como una inversión pericéntrica o la propia presencia del cromosoma marcador.

La trisomía parcial de 7p12.1 se ha descrito en otros casos asociada a cromosomas marcadores sin repercusión fenotípica aparente, en ausencia de UPD. No se han descrito otros casos con duplicación de la región específica de 7q36.3, por lo que se desconocen sus posibles consecuencias fenotípicas.

Es difícil proponer un mecanismo de generación de este cromosoma marcador, con dos regiones tan alejadas e



intersticiales. La región 7p12.1 es adyacente al centrómero, y por tanto permite que el cromosoma se mantenga estable en cada mitosis celular. En cualquier caso, la presencia de la región 7q36.3 implica dos reordenamientos (roturas) en una de las meiosis I parentales y posterior enlace con los *loci* de 7p11.2.

Como en los casos anteriores, se precisa un seguimiento exhaustivo del desarrollo de crecimiento y psicomotor del niño para una correcta evaluación fenotípica, y poder definir mejor la relación genotipo-fenotipo.

### **6.5 Isocromosoma 13p ó 21p. Marcador 5.**

El caso índice es una muestra prenatal a partir de líquido amniótico en la que se detectó un cromosoma marcador de pequeño tamaño. La amniocentesis se realizó por indicación de edad materna, sin anomalías ecográficas. La gestación llegó a término y la niña no presentaba alteraciones fenotípicas. Mediante microdissección manual, FISH reverso y posterior validación con FISH con sondas centroméricas se identificó el cromosoma extra como un i(13p) ó i(21p). Dado que la región alfa satélite de los cromosomas 13 y 21 es parcialmente común, no podemos identificar con seguridad el origen del cromosoma. En cualquier caso, las regiones de los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos no presentan contenido génico, sino secuencias repetitivas que codifican para ARN ribosómicos, que conforman las regiones organizadoras nucleolares (NOR). Mediante una tinción específica para estas regiones satélite (tinción NOR) y una hibridación con una sonda generada a partir de microdissección (MiDi54) comprobamos que el cromosoma marcador era positivo para estas regiones. La madre

## DISCUSIÓN

de esta niña era portadora a su vez del mismo cromosoma marcador de igual aspecto citogenético. En un embarazo posterior también se detectó la presencia de este cromosoma.

En la base de datos de SMCs se describen 55 casos de SMCs originarios de los cromosomas 13/21 sin implicación fenotípica, caracterizados mediante FISH centromérica del 13/21. En 3/55 casos se especifica el origen del brazo cromosómico del SMC como p, al igual que en este caso.

Por tanto, teniendo en cuenta la ausencia de genes en esta región, y el hecho de que sea una alteración heredada de una madre sin fenotipo aparente, nos lleva a poder informar de un teórico buen pronóstico sin implicación fenotípica.

### **6.6 Disrupción de los genes PHF21A y GOLGA1 en una paciente con retraso fundamental del lenguaje. Translocación 1.**

Hemos caracterizado a nivel de nucleótido los puntos de rotura en ambos derivados en una paciente con fenotipo de retraso global leve del desarrollo y afectación severa del lenguaje, portadora de una translocación *de novo* t(9;11)(q34.1;p11.2). Los puntos de rotura en ambos cromosomas interrumpen genes: *GOLGA1* en 9q34.1 y *PHF21A* en 11p11.2. El primero codifica para una proteína del aparato de Golgi implicada en el tráfico intracelular de vesículas, con expresión ubicua. La translocación produce además una delección de 2627 pb entre el intrón 19 y el exón 23, de modo que hay una pérdida de los exones 20-22 y parte del 23 en este gen.

En el cromosoma 11 el punto de rotura está localizado en el intrón 7 del gen *PHF21A*, y la translocación provoca la inserción de un sólo nucleótido, sin pérdida de material genético. *PHF21A* es un gen que codifica para la proteína BHC80, que pertenece al complejo BRAF35 histona deacetilasa. Este complejo represor contiene LSD1 (*lysine specific demethylase 1*) y HDAC (*histone deacetylase*), que en células no neuronales regula negativamente la transcripción de genes específicos de neuronas <sup>145, 146</sup>. En concreto, *PHF21A* reconoce el residuo lisina 4 de la histona no metilada H3 (H3L4M0); y es requerido para la represión transcripcional mediada por LSD1, en la que LSD1 se une a los promotores <sup>147</sup>. La expresión preferencial de este gen es en cerebro, aunque se expresa en mucha menor medida en otros tejidos.

*PHF21A* es uno de los 15 genes localizados en la región crítica delecionada en el síndrome de Potocki-Shaffer (11p11.2p12, Mb 45.9; PSS, OMIM #601224), cuyo fenotipo incluye retraso de desarrollo, RM, exostosis múltiples, forámina parietal, fontanela anterior alargada, anomalías craneofaciales menores, anomalías oftalmológicas y anomalías genitales en varones <sup>148, 149</sup>. La haploinsuficiencia de los genes *EXT2* y *ALX4* se ha correlacionado con la presencia de exostosis múltiples y forámina parietal, respectivamente. En cambio, no se han identificado el/los genes responsables del RM. Estableciendo una correlación entre los tamaños de deleción y el fenotipo de 10 pacientes con PSS, se delimitó la región crítica del síndrome para el fenotipo de RM a 2.1 Mb (Mb 44.6-46.7), entre D11S1393 y D11S1385 <sup>150</sup>, precisamente donde se sitúa el gen *PHF21A*.

## DISCUSIÓN

En linfocitos de sangre periférica de la paciente se observó un descenso de la expresión de ambos genes *GOLGA1* y *PHF21A* con respecto a controles, compatible con haploinsuficiencia. Sin embargo, en el análisis de proteína (obtenida desde células de la línea linfoblastoide inmortalizada), no observamos diferencia de expresión entre la paciente y los controles con ninguno de los dos anticuerpos (*GOLGA1* y *PHF21A*). En los experimentos de PCR cuantitativa con cDNA de linfoblastos tampoco se apreció diferencia de expresión entre la paciente y los controles en ninguno de los dos genes, y sí una disminución del 60-75% de expresión comparado con las muestras de material de linfocitos de SP. Esta discordancia sugiere que la regulación de expresión de estos genes en líneas celulares linfoblastoides inmortalizadas está sometida a mecanismos de compensación diferentes, por lo que los linfoblastos transformados no parecen un modelo adecuado para estudiar la repercusión de los reordenamientos que afectan a dichos genes.

Debido a la opuesta orientación transcripcional de los genes *GOLGA1* y *PHF21A* no está predicha la formación de una proteína quimérica en ninguno de los cromosomas derivados. Aún así, no hemos detectado mensajero ni proteína quimérica de ninguno de los genes a partir de los cromosomas derivados.

La región cromosómica descrita asociada a TEL más estudiada es 7q31, donde se localiza el gen *FOXP2* (OMIM #602081). Este gen codifica para una proteína reguladora que funciona como factor de transcripción, que se expresa en cerebro fetal y adulto. La haploinsuficiencia de este gen implica dispraxia verbal<sup>21, 151</sup>. Más

recientemente se ha relacionado al gen *CNTNAP2* (*contactin-associated protein like-2*) con alteraciones del lenguaje y autismo<sup>152</sup>. Este gen pertenece a la superfamilia de las neurexinas (proteínas neuronales transmembrana relacionadas con adhesión celular). *CNTNAP2* está implicado en reconocimiento neuronal, adhesión celular y mantenimiento del voltaje de los canales de potasio; se expresa en el córtex cerebral durante el desarrollo. *FOXP2* disminuye la expresión de *CNTNAP2*<sup>151, 153</sup>. Los pacientes con duplicación recíproca a la delección de la región 7q11.23, causa del Síndrome de Williams-Beuren (OMIM #194050), también presentan un fenotipo de afectación del lenguaje similar, asociado o no a otros problemas (OMIM #609757)<sup>154-156</sup>. Sin embargo, ninguno de los *loci* afectados por los puntos de rotura de la translocación en los cromosomas 9 y 11 están descritos en la literatura asociados a TEL.

Debido a su función descrita, y a su expresión preferencial en cerebro, creemos que el gen candidato a causar el fenotipo de retraso y TEL en la paciente es *PHF21A*. Para realizar un rastreo rápido de reordenamientos en este gen, se diseñó un juego de MLPA específico, que incluía además el resto de genes del complejo BRAF35 histona deacetilasa y dos de los genes descritos hasta el momento asociados a TEL: *FOXP2* y *WBSCR1*. Este rastreo se aplicó a 19 pacientes con TEL, 87 autistas y 165 pacientes con RM y del lenguaje, con resultado negativo. A continuación se realizó un rastreo mutacional de los 18 exones de *PHF21A* en los 19 pacientes con TEL, en los que no se encontró ninguna mutación. Por tanto, *PHF21A* no es un candidato frecuente para el fenotipo de TEL, al menos en nuestra cohorte de estudio.

En resumen, esta paciente con fenotipo fundamental de TEL presenta una translocación *de novo* que genera la disrupción de un gen en cada punto de rotura. Uno de estos genes, *PHF21A*, es un gran candidato como responsable del RM y la afectación del lenguaje en la paciente, debido a su expresión preferencial en cerebro y a su función como miembro de un complejo represor de genes específicos de neuronas. Además, este gen está incluido en la región crítica delecionada en el síndrome de Potocki-Shaffer, por lo que es posiblemente responsable del fenotipo de RM que ocurre en este síndrome. Sin embargo, la búsqueda de reordenamientos de este gen en otros pacientes con fenotipo de TEL y RM no mostró alteraciones ni mutaciones, por lo que mutaciones de *PHF21A* no son frecuentes en otros pacientes con TEL o RM, al menos en nuestra cohorte.

### **6.7 Monosomía parcial de 17pter y deleción de 22q (DGS/VCFS). Translocación 2.**

Este paciente de 34 años presenta un retraso mental severo, rasgos dismórficos, estatura baja y múltiples anomalías congénitas, entre las que destacan monodactilia de ambas manos y pie en pinza (ectrodactilia). Presenta además obstrucción del conducto lacrimal, voz hipernasal, insuficiencia velofaríngea y campanilla ancha. Su caso fue descrito en 1976, a los 10 meses de edad <sup>157</sup>. Su hermana también presenta RM y anomalías de las extremidades, el padre y hermano displasia ectodérmica sin RM, y la madre RM moderado sin otras anomalías. El estudio citogenético reveló la presencia de una translocación no balanceada [t(17;22)(p13.3;q21),-22] en el paciente, su hermana y

su madre. El estudio mutacional del gen *p63* mostró la mutación R227Q en el padre y los 3 hijos.

En el estudio citogenético familiar de 1976 se comprobó que el abuelo materno del paciente era portador de la translocación balanceada 46,XY,t(17;22)(p13;q11), mientras que a partir de la siguiente generación (madre del paciente), el pequeño cromosoma derivativo(22), que contiene las regiones 17pter y 22q11 (DGS), se había perdido, resultando un cariotipo 45,XX,t(17;22)(p13;q11),-22<sup>157</sup>. La identificación de los puntos de rotura de la translocación se realizó mediante array CGH, FISH y marcadores microsatélite en el paciente, sus padres y hermanos. La translocación genera una deleción de ~400 Kb en 17pter, así como una deleción de 3 Mb en el cromosoma 22, que corresponde a la deleción mayor típica que aparece en el síndrome de DiGeorge (DGS/VCFS, MIM #188400, MIM #192430). La región delecionada en el cromosoma 17 contiene 3 genes (*RPH3AL*, *LOC400566* y *FAM101B*), así como el gen *VPS53*, interrumpido por el punto de rotura de la translocación. *RPH3AL* está implicado en la regulación de la exocitosis en células endocrinas y exocrinas; mientras que *VPS53* está relacionado con el transporte retrógrado de endosomas en el aparato de golgi. Ninguno de estos 4 genes tiene una función sugerente de estar implicada de manera directa en el fenotipo del paciente, su hermana o su madre.

La región delecionada en el cromosoma 22 (22pter→22q11) tiene un tamaño de 19 Mb. El punto distal de rotura coincide con la región de menor tamaño (1,5 Mb) delecionada en el síndrome de DiGeorge. Esta región contiene 74 genes descritos, entre ellos hay 30 en esta región de 1.5 Mb, incluyendo los genes de los síndrome

## DISCUSIÓN

de *cat-eye* y DiGeorge (*DGSCR2*, *DGSCR13*, *GNB1I*, *TBX1*, *HIRA*, etc). El síndrome de delección 22q11.2 es uno de los desórdenes genéticos más frecuentes, con una prevalencia estimada de 1:4000 recién nacidos vivos. Esta región está flanqueada por duplicaciones segmentarias, que facilitan una recombinación homóloga no alélica. El fenotipo de este síndrome es variable, e incluye desde anomalías cardíacas, insuficiencia velofaríngea o fisura palatina (acompañada de voz hiper nasal por las alteraciones del paladar) hasta dificultades de aprendizaje y talla baja <sup>158</sup>. En algunos casos los síntomas son tan leves que se diagnostican por tener hijos con este síndrome <sup>159</sup>. La madre del paciente tiene un espectro fenotípico que coincide con el síndrome de DiGeorge: talla baja, retraso mental moderado, voz hipernasal, leves rasgos dismórficos y sordera progresiva.

El gen *p63* (3q27) es un factor de transcripción homólogo a *p53* y *p73*. Mutaciones para este gen se han descrito en pacientes con síndromes EEC (*ectrodactily*, *ectodermal dysplasia and facial cleft*, MIM #129900) y SHFM4 (*split-hand / split foot malformation*, MIM #605289)<sup>160, 161</sup>. La mutación R227Q afecta principalmente al conducto lacrimal, pelo, uñas y dientes, y está asociada a ectrodactilia así como anomalías en las glándulas mamarias <sup>162</sup>. Hasta el momento, hay 4 familias (n=28 individuos) con esta mutación descrita <sup>163</sup>. La arginina 227 está localizada en exón 6 del gen, que pertenece al dominio de unión a ADN. Este residuo es necesario para las interacciones directas con secuencias diana; la mutación disminuye esta unión y por tanto la actividad de transactivación. En esta familia, los miembros que presentan esta mutación tienen un fenotipo de displasia ectodérmica, obstrucción del conducto lacrimal y reducción del sudor; y dos de ellos (el



paciente y su hermana) además hipoplasia unilateral de la glándula mamaria.

Parece por tanto que el fenotipo familiar es variable dependiendo de la presencia del reordenamiento cromosómico, de la mutación del gen *p63*, o de la coexistencia de ambas alteraciones. La coincidencia de las dos alteraciones genéticas en el paciente y su hermana genera un fenotipo más severo, si bien con expresión variable. Las anomalías en las extremidades sólo se manifiestan cuando coexisten deleciones y mutación, con lo que es posible que genes reguladores en uno o ambos cromosomas estén interaccionando en el desarrollo de las extremidades.

### **6.8 Translocación balanceada en un paciente con hipogonadismo hipogonadotrópico. Translocación 3.**

Hemos caracterizado los puntos de rotura de una translocación  $t(7;18)(p15.3;q21.1)$  en un paciente con hipogonadismo hipogonadotrópico mediante una estrategia de microdissección manual de uno de los cromosomas derivados [der(7)], FISH reverso, array de oligonucleótidos, selección de BACs y FISH. Este trastorno es una deficiencia hormonal en el eje hipotálamo-hipófisis, en el que hay una reducción en la secreción pulsátil de hormona GnRH (hipotálamo), lo que implica un descenso en la liberación de LH y FSH por la hipófisis. Se descartó el diagnóstico de síndrome de Kallman (OMIM # 308700), ya que el paciente no tiene alteraciones olfativas.

## DISCUSIÓN

En el cromosoma 7 no hay ningún gen descrito contenido en el BAC interrumpido por el punto de rotura de la translocación, mientras que en el cromosoma 18 el gen que puede estar afectado es *ST8SIA3* (*ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 3*). Este gen tiene expresión descrita en hígado fetal, así como en cerebro fetal y adulto. Pertenece a la familia de las sialotransferasas, que transfieren ácido siálico a las glicoproteínas o glicolípidos. *ST8SIA3* está implicado en la glicosilación (adición de carbohidratos) de proteínas. Un estudio de la expresión de este gen en *zebrafish* reveló su implicación durante la segmentación y formación de somitas, y por tanto en el desarrollo de vertebrados <sup>164</sup>. Las hormonas GnRH, FSH, LH, OT (oxitocina) y AVP (vasopresina) se unen a receptores glicosilados, por lo que una deficiencia en la glicosilación puede afectar a la función correcta de estas hormonas. Las gonadotropinas LH y FSH forman heterodímeros que están unidos a oligosacáridos por la parte N-terminal. Los errores congénitos de la glicosilación son un grupo de trastornos derivados de los defectos de síntesis en oligosacáridos unidos a la parte N-terminal. El fenotipo de los afectados por este trastorno incluye RM moderado, retinitis pigmentosa, neuropatía periférica, kifoescoliosis y endocrinopatías. En los varones hay presencia de testículos pequeños debido al hipogonadismo hipogonadotrópico <sup>165</sup>. Es dudoso si la disrupción por la translocación de un alelo de *ST8SIA3* puede causar fenotipo mediante un mecanismo similar, dado que la gran mayoría de trastornos de glicosilación son recesivos con disfunción de ambos alelos.

Para intentar definir el punto de rotura de la translocación directamente desde el ADN genómico del paciente con la t(7;18)

se secuenció este material mediante la tecnología de *Paired end mapping* (Illumina/Solexa). Se basa en la fragmentación del ADN a secuenciar (en fragmentos de tamaños ~300-800 pb), la unión a adaptadores, y la secuenciación a gran escala de los extremos (36 pb de cada extremo)<sup>99, 102, 103, 166</sup>. En nuestro caso el tamaño medio de los fragmentos obtenidos fue de 250 pb, de modo que la probabilidad de obtener un fragmento híbrido (formado por material de los cromosomas 7 y 18, es decir, que contenga uno de los puntos de rotura de la translocación) es excepcionalmente bajo. El total de lecturas específicas de un sólo *locus* obtenidas fue de 6.5 millones, de las cuales 72800 eran híbridas, es decir, tenían extremos correspondientes a dos cromosomas diferentes. En concreto 219/72000 de las lecturas tenían extremos del cromosoma 7 y 18, ninguna de ellas cercana a los puntos de rotura predichos por FISH.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la hibridación del material aislado por microdissección y amplificado por DOP-PCR sobre el array de oligonucleótidos, en el que el porcentaje de falsos negativos era muy alto (65-84%), la posible infrarrepresentación de ciertas regiones puede afectar a los resultados de la ultrasecuenciación, en el sentido de que el fragmento que contenga precisamente el punto de rotura no esté representado.

En la literatura hay 9 genes descritos cuyas mutaciones están asociadas a hipogonadismo hipogonadotrópico (OMIM #146110), detallados en la siguiente tabla (tabla 17):

## DISCUSIÓN

GEN	Nombre del gen	Locus
<i>PROK2</i>	<i>prokineticin-2 gene</i>	3p21.1
<i>GNRHR</i>	<i>gonadotropin-releasing hormone receptor gene</i>	4q21
<i>TACR3</i>	<i>tachykinin-3 receptor</i>	4q25
<i>FGFR1</i>	<i>fibroblast growth factor receptor-1 gene</i>	8p11.2
<i>GNRH1</i>	<i>gonadotropin-releasing hormone</i>	8p21
<i>CDH7</i>	<i>chromodomain helicase DNA-binding protein-7 gene</i>	8q12.1
<i>NELF</i>	<i>nasal embryonic LHRH factor gene</i>	9q34.3
<i>FGF8</i>	<i>fibroblast growth factor-8 gene</i>	10q24
<i>TAC3</i>	<i>tachykinin-3</i>	12q13
<i>GPR54</i>	<i>G protein-coupled receptor-54 gene</i>	19p13.3

Para comprobar la existencia de posibles desbalances en los puntos de rotura, además de descartar la presencia de otros reordenamientos en diferentes loci del genoma, se hibridó ADN genómico de este paciente con un array de SNPs de alta densidad (Illumina 370K), con una cobertura media de una sonda cada ~8 Kb. No se encontraron pérdidas ni ganancias en los puntos de rotura, ni en otros *loci* del genoma. Aún así, la cobertura de las sondas en el punto de rotura cromosoma 18 presentaba una región de casi 56 Kb sin cubrir, lo que no descarta que haya reordenamientos de menor tamaño precisamente en esa región.

En resumen, este paciente presenta una translocación *de novo* entre los cromosomas 7 y 18, cuyos puntos de rotura se han intentado caracterizar mediante diversas estrategias tecnológicamente novedosas: microdissección de cromosomas y array de oligonucleótidos, ultrasecuenciación y array de alta densidad de SNPs. En el cromosoma 18 el punto de rotura de la translocación está localizado en la parte proximal del gen

*ST8SIA3*, implicado en la transferencia de ácido siálico a glicoproteínas. El fenotipo de este paciente se debe a una deficiencia hormonal en el eje hipotálamo-hipófisis, que implica a las hormonas GnRH, LH y FSH. Aunque especulativo, una alteración en la glicosilación por disrupción de *ST8SIA3* podría estar relacionada con una disminución de la función de estas hormonas, resultando en un fenotipo de hipogonadismo hipogonadotrópico.

### **6.9 Translocación aparentemente balanceada en una paciente con retraso del lenguaje y TDAH. Translocación 4.**

Esta paciente es una niña de 13 años con fenotipo fundamental de retraso del lenguaje y diagnóstico de trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH). El análisis citogenético reveló la presencia de una translocación *de novo*: t(11;13)(q14.1;q14.3). Para identificar los puntos de rotura de la translocación se aisló mediante microdissección manual uno de los cromosomas derivados [der(13)], y el material amplificado se hibridó sobre un array de oligonucleótidos. Posteriormente, se seleccionaron los clones que flanqueaban los puntos de rotura predichos en el array de oligonucleótidos para realizar FISH.

En el cromosoma 11 el punto de rotura interrumpe el gen *PRCP* (*prolylcarboxipeptidase*). La función de este gen es escindir la región C-terminal de aminoácidos unidos a prolina en péptidos como angiotensina II, de modo que es uno de los genes candidatos para hipertensión esencial (primaria o idiopática). Está asociado con inflamación y se considera que tiene un papel

## DISCUSIÓN

protector sobre las enfermedades cardiovasculares <sup>167</sup>. Por otra parte, un estudio en ratones propone a este gen como candidato para obesidad, por su implicación en la vía de control de la hormona neuromoduladora anorexigénica estimulante de  $\alpha$ -melanocitos ( $\alpha$ -MSH), sugiriendo su participación en la vía de las melanocortinas <sup>168</sup>. La obesidad infantil se ha asociado con la presencia de TDAH <sup>169</sup> y recientemente se ha descrito la asociación entre una mutación en el gen receptor de la melanocortina 4 (MC4R) en pacientes obesos con TDAH <sup>170</sup>. Las melanocortinas son un grupo de hormonas que incluyen la hormona adrenocorticotropa (ACTH) y la hormona estimulante de melanocitos (MSH), entre otros. Este grupo está implicado en la respuesta inflamatoria e inmune, así como en el control de la pigmentación de la piel, ingesta, homeostasis y secreciones exocrinas. Los receptores de melanocortinas están distribuidos ampliamente por el cerebro <sup>171</sup>. Teniendo en cuenta que el TDAH es un trastorno heterogéneo en el que hay una regulación anómala del comportamiento, es posible que la disrupción del gen *PRCP* implique una disregulación en la vía de las melanocortinas, influyendo en la conducta de atención y resultando en un fenotipo de TDAH.

En el cromosoma 13 podrían estar interrumpidos los genes *RFP2* (*Ret finger protein 2*, *TRIM13*) y *KCNRG* (*potassium channel regulator*). Ambos están incluidos en la región mínima delecionada en la leucemia linfática crónica tipo B (LLC-B). La deleción de la región 13q14.3 se ha asociado a otros tipos tumorales (mieloma, linfoma del manto, linfoma difuso de célula grande y próstata, entre otros), por lo que están considerados como genes supresores de tumores <sup>172, 173</sup>. Debido a la orientación transcripcional opuesta de

no está predicha la formación de un nuevo gen de fusión en ninguno de los cromosomas derivativos.

El TDAH (OMIM #143465) es el trastorno más común de aparición en edad infantil, afectando entre 5-10% de niños y adolescentes. Se caracteriza por un déficit de atención persistente y/o por un comportamiento hiperactivo-impulsivo que implica problemas en la adaptación social y académica. Hay una prevalencia de niños sobre niñas de 8:1 <sup>174, 175</sup>. Desde el punto de vista genético, el TDAH es un trastorno heterogéneo, con varios *loci* asociados. En la literatura hay varios genes cuyas variantes polimórficas, mutaciones o por estudios de ligamiento están asociados con TDAH <sup>176</sup>, resumidos en la siguiente tabla (tabla 18):

GEN	Nombre del gen	Locus
<i>ADHD2</i>	<i>Attention deficit-hyperactivity disorder, susceptibility to, 2</i>	17p11
<i>ADHD1</i>	<i>Attention deficit-hyperactivity disorder, susceptibility to, 1</i>	16p13
<i>DRD4</i>	<i>dopamine receptor D4</i>	11p15.5
<i>HTR1B</i>	<i>5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1B</i>	6q12
<i>ADHD4</i>	<i>Attention deficit-hyperactivity disorder, susceptibility to, 4</i>	5p13
<i>SLC6A3</i>	<i>solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, dopamine), member 3</i>	5p15.3
<i>DRD5</i>	<i>dopamine receptor D5</i>	4p16.1
<i>ADRA2A</i>	<i>adrenergic, alpha-2A-, receptor</i>	10q24
<i>SCN8A</i>	<i>sodium channel, voltage gated, type VIII, alpha subunit</i>	12q13
<i>TPH2</i>	<i>tryptophan hydroxylase 2</i>	12q21
<i>SNAP25</i>	<i>synaptosomal-associated protein, 25kDa</i>	20p11.2
<i>COMT</i>	<i>catechol-O-methyltransferase</i>	22q11

## DISCUSIÓN

Ninguna de las regiones afectadas por los puntos de rotura de la translocación ha sido previamente asociada al TDAH.

En resumen, esta paciente con fenotipo de retraso del lenguaje y TDAH presenta una translocación *de novo*, en la que el gen *PRCP* está interrumpido por el punto de rotura en el cromosoma 11, mientras que en el cromosoma 13 podrían estar interrumpidos los genes *RFP2* y *KCNRG*. Como gen candidato a causar el fenotipo de TDAH proponemos a *PRCP* debido a su regulación en la vía de la melanocortina.

### **6.10 Translocación con otras alteraciones citogenéticas en un paciente con leucemia. Translocación 5.**

Este paciente tenía un diagnóstico de leucemia mielomonocítica crónica tipo 2 (LMMC-2) con cariotipo normal. Posteriormente, por evolución de la enfermedad se diagnosticó leucemia aguda mieloide (LAM) secundaria en médula ósea (MO), con nuevo cariotipo de 46,XY,t(4;15)(q24;q26),add(7)(qter)[15]/46,XY[5].

La revisión de la literatura muestra que las principales alteraciones en los pacientes con LMMC son la monosomía 7 y la delección 7q-, trisomía 8, ganancias del 1q, y la presencia de cariotipos complejos con tres o más alteraciones citogenéticas<sup>177</sup>. Las translocaciones recíprocas en la LMMC son poco frecuentes (menos del 1% de los casos), y entre ellas destaca la t(5;12)(q33;p13).



Para identificar los puntos de rotura de esta translocación se aisló uno de los cromosomas derivados [der(15)] mediante microdissección manual y posteriormente se hibridó el material amplificado sobre un array de oligonucleótidos.

En el cromosoma 4 el punto de rotura estaría en la región más distal del gen *MGC16169* (*TBC domain-containing protein kinase-like*), mientras que en el cromosoma 15 no hay genes descritos en la región implicada en el punto de rotura. En este caso, por tanto, no está predicha la formación de un nuevo gen de fusión en ninguno de los cromosomas derivados. En el cromosoma 4 hay una deleción de ~6 Mb proximal al punto de rotura, que incluye 38 genes descritos, entre ellos *TET2* (4q24, Mb 106). Este gen supresor de tumores se ha descrito recientemente asociado a alteraciones mieloides (síndromes mieloproliferativos y mielodisplásicos, así como leucemias agudas mieloides secundarias a leucemias mielomonocíticas crónicas<sup>122-127</sup>. Se han descrito pacientes con mutaciones heterocigotas y homocigotas en *TET2*, deleciones en 4q24 y LOH por UPD para el cromosoma 4.

*TET2*, localizado en 4q24 (Mb 106), tiene un tamaño de ~132 Kb y contiene 11 exones que codifican para 3 isoformas proteicas. Tiene funciones en el control de la hematopoyesis, relacionadas con la supervivencia, crecimiento y diferenciación celular. Su expresión es ubicua, con un aumento entre 10 y 100 veces en células hematológicas, en especial granulocitos<sup>123</sup>. En la literatura están descritas mutaciones de *TET2* en un 10-20% de pacientes con síndromes mielodisplásicos (SMD), síndromes mieloproliferativos, LAM secundarias o leucemia crónica mielomonocítica (LMMC). En concreto, en LAM secundaria hay

## DISCUSIÓN

entre 24% y 42% de pacientes con mutaciones y/o deleciones de *TET2*.<sup>124, 126</sup> La presencia de mutaciones en *TET2* se correlaciona con un recuento elevado de WBC, monocitosis y sexo masculino<sup>126</sup>, al igual que en este caso. En cambio, no se estableció correlación entre los casos homocigotos, heterocigotos o hemocigotos, así como relación con supervivencia.

Teniendo en cuenta el patrón de evolución de la alteración mielodisplásica en el paciente, creemos que la deleción del gen *TET2* puede estar implicada en la etiología de la enfermedad. Respecto a la alteración en el cromosoma 7, no podemos descartar la posible contribución de los genes del material adicional en el cromosoma 7 (de origen desconocido) al fenotipo en este caso, así como otras alteraciones en otros loci del genoma. Es bien conocido que las anomalías del cromosoma 7 se asocian a un mal pronóstico<sup>177, 178</sup>. Por ello, el curso agresivo de la enfermedad podría explicarse por la implicación de dicho cromosoma.

### **6.11 Microdissección con aguja o láser como método de aislamiento de cromosomas.**

La **microdissección manual con aguja y micromanipulador** permite aislar cromosomas enteros y bandas cromosómicas. Es un método muy preciso, y laborioso, en el que el número de cromosomas obtenidos es bastante reducido (1-20 cromosomas). La identificación no supone un problema, al realizar una tinción muy similar a la citogenética clásica, con bandas G. Sin embargo, para que un cromosoma pueda ser aislado con este método debe encontrarse en la periferia de la metafase para evitar

contaminaciones en el momento del aislamiento. Es un proceso que requiere destreza en el manejo del micromanipulador, y experiencia citogenética en la identificación de cromosomas. En nuestro caso, el número máximo de cromosomas que pudimos aislar fue de 10 unidades. Una de las principales ventajas del método de microdissección es poder aislar cromosomas marcadores o portadores de alteraciones que estén en bajo mosaicismo<sup>38, 46, 87, 91</sup>. La limitación en la cantidad de material que se puede aislar es una de las mayores desventajas de esta técnica, puesto que requiere una amplificación previa a cualquier tipo de análisis. En nuestro caso, esta amplificación se realizó mediante DOP-PCR. Para visualizar los resultados con FISH reverso, realizamos 3 rondas de 40 ciclos de DOP-PCR. El FISH reverso mostró señales de hibridación continua y específica, sin cohibridaciones, a excepción de los centrómeros de cromosomas acrocéntricos cuando se amplificaba un cromosoma de este grupo. La resolución en este caso es la misma que la de la citogenética convencional, puesto que depende de la calidad de las metafases sobre las que se está hibridando.

En cuanto a la hibridación del material microdisseccionado sobre arrays, para evitar una distorsión en los resultados debido a la sobre o infrarrepresentación de determinadas regiones, hibridamos el producto de la primera amplificación de DOP-PCR. En la muestra de la translocación 4 [t(11;13)(q21;q22)] el material obtenido del der(13) se hibridó sobre el array de BACs de qGenomics. Posteriormente se hibridó sobre el array de oligonucleótidos de Agilent 244k. Los materiales amplificados de los der(7) [translocación 4] y der(15) [translocación 5] también se hibridaron sobre este array de oligonucleótidos. En lugar de

## DISCUSIÓN

comparar la intensidad de ratio de los dos canales de fluorescencia, se analizaron los datos teniendo en cuenta la presencia o ausencia de señal de hibridación sobre los oligonucleótidos localizados en los cromosomas de interés<sup>38, 88</sup>. En estos casos solo se analizó el canal de hibridación de la muestra, a partir de los datos crudos, sin normalizar, considerando positivos los valores mayores que 0.

En el análisis de resultados del array de oligonucleótidos, constatamos que el porcentaje de falsos negativos por sonda era muy alto (60-88%), mientras que el de falsos positivos era excepcionalmente bajo (0.4-0.7%), es decir, una baja sensibilidad y una muy alta especificidad. En el caso de la t(7;18), en el que aislamos tan sólo seis cromosomas der(7), el porcentaje de falsos negativos fue significativamente mayor (hasta 88% en el cromosoma 18) que en el caso de la t(11;13), en la que alcanzamos un 65% de falsos negativos con 7 derivados (13) aislados. Esto puede ser debido a desviación generada por el método de amplificación, en este caso DOP-PCR, de modo que algunas regiones genómicas se amplifiquen preferentemente sobre otras e incluso que algunas secuencias no estén representadas<sup>38, 88</sup>. En un trabajo en el que se compararon los efectos de la amplificación por DOP-PCR en la sensibilidad y especificidad de la CGH sobre metafases y el array CGH, en cuanto a la detección del número de copias en diversas diluciones de ADN de una línea celular tumoral, se comprobó que la DOP-PCR no afectaba prácticamente la sensibilidad pero sí disminuía la especificidad<sup>179</sup>. Los artefactos generados en productos amplificados mediante PCR se deben a diferentes factores: contenido en GC, reanillamiento de los productos, diferentes eficiencias en la unión

de los cebadores, deaminación de citosinas debido a la temperatura de desnaturalización y formación de homodúplex durante la rampa de desnaturalización a anillamiento <sup>180</sup>. Todos estos factores pueden generar hasta un 70% de artefactos inespecíficos en la amplificación, resultando en una cobertura incompleta. En un estudio realizado comparando la tasa de error de estas técnicas han demostrado que el 80% de las secuencias generadas por DOP-PCR no se pueden localizar en los genomas de referencia mediante la técnica de secuenciación de 454 (Roche) <sup>180</sup>. Teniendo en cuenta que el tamaño de los fragmentos obtenidos por la amplificación con DOP-PCR está entre 200-1000 pb, esto puede resultar en una limitación cuando se emplean tecnologías que requieran la presencia de tamaños mayores, o mayor cobertura, como ultrasecuenciación o array de oligonucleótidos.

La comprobación de los productos amplificados por DOP-PCR mediante técnicas con resolución similar al tamaño del BAC (CGH sobre metafases, FISH reverso o array de BACs) es suficiente para comprobar la presencia del material. Sin embargo, las técnicas de mayor resolución (PCR, array de oligonucleótidos) requieren un alto porcentaje de secuencias representadas. Una comparación entre los distintos métodos de amplificación inespecífica (Genomiphi, *ligation adaptor-mediated* PCR) sería de gran ayuda para determinar cual es el método más adecuado.

En resumen, el método de aislar cromosomas manualmente mediante micromanipulador y posterior análisis mediante array de oligonucleótidos permite seleccionar los BACs próximos al punto de rotura. Esto no permite acotar una región de un tamaño

## DISCUSIÓN

asequible para la técnica de PCR. El rango de tamaños que se puede obtener con esta estrategia es de 30-300 Kb. En este caso, no sería necesaria la hibridación con un array de alta resolución de oligonucleótidos, puesto que la resolución que obtenemos es equivalente a la un array de BACs.

La **microdissección láser** es un método más rápido para aislar cromosomas que la microdissección manual con micromanipulador y aguja. Sin embargo, cuando se hace sobre un soporte de cubreobjetos con membrana, la identificación de los cromosomas es más compleja, debido a que las pequeñas irregularidades en la superficie de la membrana empeoran la nitidez del patrón de bandas<sup>87, 181</sup>. Además, el cromosoma que queremos aislar debe estar separado de otros cromosomas en la metafase, ya que el grosor del láser (~3  $\mu\text{m}$ ) puede llegar a ser casi igual al tamaño del cromosoma (~5-8  $\mu\text{m}$ ). Por tanto, obtener extensiones de buena calidad, suficientemente extendidas y con una gran concentración de metafases es en ocasiones muy difícil.

Los intentos de aislar cromosomas extendidos en un cubreobjetos sin membrana fueron exitosos y más precisos, puesto que pudimos separar brazos cromosómicos relativamente pequeños (8p) sin tener contaminaciones aparentes. En esta modalidad no es necesario que las metafases estén tan extendidas, puesto que no hay que *recortar* una región que contenga el cromosoma, si no que el láser incide directamente sobre el cromosoma, lo que permite que la potencia usada del láser sea menor que en las muestras con membrana.

La eficiencia con la que el material aislado llega al tapón es del ~50%, valorando el número de núcleos que podemos visualizar en el tapón colector después de aislarlos. En nuestro caso, no hemos podido amplificar material a partir de los cromosomas aislados por microdissección láser, pese a que el número era muy superior (~200 unidades). En un trabajo previo, Gotter y cols. aíslan ~200 cromosomas por microdissección láser, que amplifican posteriormente mediante Genomiphi para usarlo como sustrato de PCR <sup>46</sup>. Es posible que en nuestro caso sea necesario incrementar el número de cromosomas aislados para obtener material suficiente para la amplificación. Sin embargo, para la preparación de sondas de pintado cromosómico en animales de granja, se han empleado tan solo 10 cromosomas y amplificación por DOP-PCR <sup>181</sup>. En otro estudio se consiguió incluso partiendo de un solo cromosoma mediante amplificación por *linker-adaptor* PCR <sup>86</sup>.

El hecho de que el láser incida directamente sobre los cromosomas puede estar fragmentando el material de tal manera que esté muy dañado antes de la amplificación. Esto explicaría por qué no hemos podido validar los resultados mediante PCR de locus específico o FISH reverso después de amplificar el material mediante las técnicas de DOP-PCR, *ligation-adaptor* PCR o Genomiphi, a pesar de que recuperamos prácticamente la mitad, y aislamos casi 500 núcleos.

En el caso de la translocación 2 [t(7;18)(p15.3;q21.1)], se aplicó la técnica de **ultrasecuenciación** mediante *Paired End Mapping* (Illumina/Solexa) desde ADN genómico. El ADN se fragmentó en tamaños de ~300 pb y se secuenciaron 36 pb de cada extremo de los fragmentos, suficiente para poder localizarlo en el genoma. Nos

## DISCUSIÓN

centramos en los fragmentos híbridos para los cromosomas 7 y 18, es decir, fragmentos en los que cada extremo pertenecía a un cromosoma diferente. De las lecturas obtenidas, 219/72000 tenían extremos en los cromosomas 7 y 18, ninguno de ellos cercano a los puntos de rotura predicho por FISH.

Para optimizar esta técnica sería necesario enriquecer la muestra de partida de la región de interés, es decir, aislando el derivativo de interés, o incluso la banda citogenética que contenga el reordenamiento. En el trabajo de Chen y cols.<sup>102</sup> identifican los puntos de rotura de translocaciones mediante *flow sorting* de uno de los derivativos y posterior ultrasecuenciación. El ensamblaje de las secuencias les permitió clonar los puntos de rotura a una distancia de ~1000 pb, de modo que se pueden diseñar cebadores directamente y realizar la PCR del punto de unión.



## **7. CONCLUSIONES**



1. La aplicación de distintas estrategias metodológicas: CGH, FISH con BACs, marcadores microsatélite, array CGH, microdissección y FISH reverso ha permitido caracterizar los orígenes, tamaños y contenidos génicos de seis cromosomas marcadores presentes en cinco pacientes con fenotipos diversos.
  - 1.1. Hemos caracterizado un cromosoma marcador originario de la región pericentromérica del brazo corto del cromosoma 6 en un paciente con un fenotipo de craniosinostosis. Este SMC(6) tiene ~16 Mb y contiene 60 genes descritos. Entre ellos, un gen candidato es *BMP5* (*bone morphogenetic protein 5*), cuya sobreexpresión puede contribuir a la osificación prematura de los huesos craneales.
  - 1.2. Hemos caracterizado un cromosoma marcador originario de la región pericentromérica del cromosoma 10 en un paciente con fisura palatina. Este SMC(10) de ~12 Mb contiene 140 genes descritos. Como genes candidatos proponemos *GDF2* (*Growth differentiation factor 2, BMP9*) y *GDF10* (*Growth differentiation factor 10, BMP3B*), cuya sobreexpresión puede alterar el patrón de migración y cierre del paladar.
  - 1.3. Hemos caracterizado los dos cromosomas marcadores procedentes de los cromosomas 10 y 14 en un paciente con mínimos rasgos dismórficos. El SMC(10) tiene un

## CONCLUSIONES

tamaño de ~3 Mb y contiene 22 genes descritos, mientras que el SMC(14) tiene ~1.2 Mb y contiene 121 genes.

- 1.4. Hemos caracterizado el contenido de un cromosoma marcador complejo originario del cromosoma 7 en un paciente con retraso del crecimiento y microcefalia. El SMC(7) contiene ~4.7 Mb desde 7p12.1 hasta el centrómero, y 1.7 Mb en 7q36.3, con 40 genes en total. Hay varios genes implicados en la regulación del ciclo celular candidatos a contribuir en el fenotipo: *CDK5 (cyclin dependent kinase 5)*, *RHEB (Ras homolog enriched in brain)*, *EGFR (epidermal growth factor receptor)* y *ECOP (EGFR-coamplified and overexpressed protein)*.
- 1.5. Hemos caracterizado un cromosoma marcador originario del brazo corto de los cromosomas 13 ó 21 en un paciente sin fenotipo aparente mediante microdissección manual y *painting* reverso.
2. Se han caracterizado mediante clonación posicional los puntos de rotura de cinco translocaciones presentes en cinco individuos. En 6 de los 10 puntos de rotura caracterizados existen genes descritos que son interrumpidos por la translocación.
  - 2.1. Hemos clonado los dos puntos de rotura a nivel de nucleótido en una translocación t(9;11)(q34.1;p11.2) *de novo* presente en una paciente con un fenotipo de retraso global fundamental del lenguaje mediante la estrategia clásica de clonación. En el cromosoma 9 se interrumpe el

gen *GOLGA1*, y hay una deleción de 2627 pb, mientras que en el cromosoma 11 se interrumpe el gen *PHF21A*, con inserción de un solo nucleótido. *PHF21A* es el gen candidato, por su expresión preferencial en cerebro, formar parte de un complejo represor de genes específicos de neuronas, y estar localizado en la región crítica asociada a RM del síndrome de Potocki-Shaffer.

2.2. Hemos caracterizado los dos puntos de rotura de una translocación t(17;22)(p13.3;q11.2) presente en una familia con fenotipo de expresión variable, con anomalías de desarrollo en las extremidades, así como presencia adicional de una mutación en el gen *p63* (3q28), que se asocia a displasia ectodérmica.

2.3. Hemos caracterizado los puntos de rotura de una translocación t(7;18)(p15.3;q21) *de novo* en un paciente con hipogonadismo hipogonadotrópico mediante la combinación de microdissección y array CGH, así como intentado definir los puntos de rotura mediante ultrasecuenciación desde el ADN genómico. En el punto de rotura del cromosoma 7 no está descrita la presencia de ningún gen, mientras que en el cromosoma 18 el BAC interrumpido contiene el gen *ST8SIA3* (*ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 3*), implicado en la glicosilación de proteínas. Este gen es un buen candidato para el fenotipo de hipogonadismo hipogonadotrópico puesto que las hormonas LH y FSH se unen a receptores glicosilados, de modo que una

## CONCLUSIONES

deficiencia en la glicosilación podría alterar la correcta función de estas gonadotropinas.

- 2.4. Hemos caracterizado los puntos de rotura de una translocación  $t(11;13)(q14.1;q14.3)$  en una paciente con retraso del lenguaje y TDAH mediante microdissección y array CGH. En el cromosoma 11 está interrumpido el gen *PRCP*, que codifica para una carboxipeptidasa, relacionado con la regulación de la tensión arterial y la obesidad. .
- 2.5. Hemos caracterizado los puntos de rotura de una translocación  $t(4;15)(q24;q26)$  en un paciente con leucemia mielomonocítica crónica mediante microdissección y array CGH; así como comprobado la delección del gen supresor de tumores *TET2*, implicado en alteraciones de la línea mielóide.
3. La microdissección manual de cromosomas y posterior análisis del material aislado mediante array CGH de oligonucleótidos ha demostrado ser una tecnología eficaz, permitiendo clonar puntos de rotura de reordenamientos balanceados en un intervalo de ~30-100 Kb, partiendo tan solo de seis cromosomas.







## BIBLIOGRAFÍA

1. Botstein D, Risch N: Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease, *Nat Genet* 2003, 33 Suppl:228-237
2. Collins FS: Positional cloning moves from perditional to traditional, *Nat Genet* 1995, 9:347-350
3. Morton NE: Genetic epidemiology, genetic maps and positional cloning, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003, 358:1701-1708
4. Altshuler D, Daly MJ, Lander ES: Genetic mapping in human disease, *Science* 2008, 322:881-888
5. Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, Naylor SL, Anderson MA, Tanzi RE, Watkins PC, Ottina K, Wallace MR, Sakaguchi AY, et al.: A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease, *Nature* 1983, 306:234-238
6. Collins A: Allelic association: linkage disequilibrium structure and gene mapping, *Mol Biotechnol* 2009, 41:83-89
7. Dean M: Approaches to identify genes for complex human diseases: lessons from Mendelian disorders, *Hum Mutat* 2003, 22:261-274
8. Bache I, Hjorth M, Bugge M, Holstebro S, Hilden J, Schmidt L, Brondum-Nielsen K, Bruun-Petersen G, Jensen PK, Lundsteen C, Niebuhr E, Rasmussen K, Tommerup N: Systematic re-examination of carriers of balanced reciprocal translocations: a strategy to search for candidate regions for common and complex diseases, *Eur J Hum Genet* 2006, 14:410-417
9. Tommerup N: Mendelian cytogenetics. Chromosome rearrangements associated with mendelian disorders, *J Med Genet* 1993, 30:713-727
10. Dattani MT: The candidate gene approach to the diagnosis of monogenic disorders, *Horm Res* 2009, 71 Suppl 2:14-21

## BIBLIOGRAFÍA

11. Bugge M, Bruun-Petersen G, Brondum-Nielsen K, Friedrich U, Hansen J, Jensen G, Jensen PK, Kristoffersson U, Lundsteen C, Niebuhr E, Rasmussen KR, Rasmussen K, Tommerup N: Disease associated balanced chromosome rearrangements: a resource for large scale genotype-phenotype delineation in man, *J Med Genet* 2000, 37:858-865
12. Tonk VS, Wyandt HE, Huang X, Patel N, Morgan DL, Kukolich M, Lockhart LH, Velagaleti GV: Disease associated balanced chromosome rearrangements (DBCR): report of two new cases, *Ann Genet* 2003, 46:37-43
13. Warburton D: De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints, *Am J Hum Genet* 1991, 49:995-1013
14. Takahashi N, Hashida H, Zhao N, Misumi Y, Sakaki Y: High-density cDNA filter analysis of the expression profiles of the genes preferentially expressed in human brain, *Gene* 1995, 164:219-227
15. Greenstein RM, Reardon MP, Chan TS, Middleton AB, Mulivor RA, Greene AE, Coriell LL: An (X;11) translocation in a girl with Duchenne muscular dystrophy. Repository identification No. GM1695, *Cytogenet Cell Genet* 1980, 27:268
16. van Karnebeek CD, Jansweijer MC, Leenders AG, Offringa M, Hennekam RC: Diagnostic investigations in individuals with mental retardation: a systematic literature review of their usefulness, *Eur J Hum Genet* 2005, 13:6-25
17. van Karnebeek CD, Scheper FY, Abeling NG, Alders M, Barth PG, Hoovers JM, Koevoets C, Wanders RJ, Hennekam RC: Etiology of mental retardation in children referred to a tertiary care center: a prospective study, *Am J Ment Retard* 2005, 110:253-267
18. Harris PC, Ward CJ, Peral B, Hughes J: Autosomal dominant polycystic kidney disease: molecular analysis, *Hum Mol Genet* 1995, 4 Spec No:1745-1749
19. Belloni E, Muenke M, Roessler E, Traverso G, Siegel-Bartelt J, Frumkin A, Mitchell HF, Donis-Keller H, Helms C, Hing AV, Heng HH, Koop B, Martindale D, Rommens JM, Tsui LC, Scherer SW: Identification of Sonic hedgehog as a candidate gene responsible for holoprosencephaly, *Nat Genet* 1996, 14:353-356

20. Holder JL, Jr., Butte NF, Zinn AR: Profound obesity associated with a balanced translocation that disrupts the SIM1 gene, *Hum Mol Genet* 2000, 9:101-108
21. Lai CS, Fisher SE, Hurst JA, Vargha-Khadem F, Monaco AP: A forkhead-domain gene is mutated in a severe speech and language disorder, *Nature* 2001, 413:519-523
22. Jacobs PA, Browne C, Gregson N, Joyce C, White H: Estimates of the frequency of chromosome abnormalities detectable in unselected newborns using moderate levels of banding, *J Med Genet* 1992, 29:103-108
23. Gajecka M, Glotzbach CD, Jarmuz M, Ballif BC, Shaffer LG: Identification of cryptic imbalance in phenotypically normal and abnormal translocation carriers, *Eur J Hum Genet* 2006, 14:1255-1262
24. Gribble SM, Prigmore E, Burford DC, Porter KM, Ng BL, Douglas EJ, Fiegler H, Carr P, Kalaitzopoulos D, Clegg S, Sandstrom R, Temple IK, Youngs SA, Thomas NS, Dennis NR, Jacobs PA, Crolla JA, Carter NP: The complex nature of constitutional de novo apparently balanced translocations in patients presenting with abnormal phenotypes, *J Med Genet* 2005, 42:8-16
25. Engel E, DeLozier-Blanchet CD: Uniparental disomy, isodisomy, and imprinting: probable effects in man and strategies for their detection, *Am J Med Genet* 1991, 40:432-439
26. Tuna M, Knuutila S, Mills GB: Uniparental disomy in cancer, *Trends Mol Med* 2009, 15:120-128
27. Kleinjan DJ, van Heyningen V: Position effect in human genetic disease, *Hum Mol Genet* 1998, 7:1611-1618
28. Vervoort VS, Viljoen D, Smart R, Suthers G, DuPont BR, Abbott A, Schwartz CE: Sorting nexin 3 (SNX3) is disrupted in a patient with a translocation t(6;13)(q21;q12) and microcephaly, microphthalmia, ectrodactyly, prognathism (MMEP) phenotype, *J Med Genet* 2002, 39:893-899
29. Astbury C, Christ LA, Aughton DJ, Cassidy SB, Kumar A, Eichler EE, Schwartz S: Detection of deletions in de novo "balanced" chromosome rearrangements: further evidence for their role in phenotypic abnormalities, *Genet Med* 2004, 6:81-89

## BIBLIOGRAFÍA

30. Baptista J, Mercer C, Prigmore E, Gribble SM, Carter NP, Maloney V, Thomas NS, Jacobs PA, Crolla JA: Breakpoint mapping and array CGH in translocations: comparison of a phenotypically normal and an abnormal cohort, *Am J Hum Genet* 2008, 82:927-936
31. Baptista J, Prigmore E, Gribble SM, Jacobs PA, Carter NP, Crolla JA: Molecular cytogenetic analyses of breakpoints in apparently balanced reciprocal translocations carried by phenotypically normal individuals, *Eur J Hum Genet* 2005, 13:1205-1212
32. Ciccone R, Giorda R, Gregato G, Guerrini R, Giglio S, Carozzo R, Bonaglia MC, Priolo E, Lagana C, Tenconi R, Rocchi M, Pramparo T, Zuffardi O, Rossi E: Reciprocal translocations: a trap for cytogenetists?, *Hum Genet* 2005, 117:571-582
33. De Gregori M, Ciccone R, Magini P, Pramparo T, Gimelli S, Messa J, Novara F, Vetro A, Rossi E, Maraschio P, Bonaglia MC, Anichini C, Ferrero GB, Silengo M, Fazzi E, Zatterale A, Fischetto R, Previdere C, Belli S, Turci A, Calabrese G, Bernardi F, Meneghelli E, Riegel M, Rocchi M, Gueneri S, Lalatta F, Zelante L, Romano C, Fichera M, Mattina T, Arrigo G, Zollino M, Giglio S, Lonardo F, Bonfante A, Ferlini A, Cifuentes F, Van Esch H, Backx L, Schinzel A, Vermeesch JR, Zuffardi O: Cryptic deletions are a common finding in "balanced" reciprocal and complex chromosome rearrangements: a study of 59 patients, *J Med Genet* 2007, 44:750-762
34. Fantes JA, Boland E, Ramsay J, Donnai D, Splitt M, Goodship JA, Stewart H, Whiteford M, Gautier P, Harewood L, Holloway S, Sharkey F, Maher E, van Heyningen V, Clayton-Smith J, Fitzpatrick DR, Black GC: FISH mapping of de novo apparently balanced chromosome rearrangements identifies characteristics associated with phenotypic abnormality, *Am J Hum Genet* 2008, 82:916-926
35. Gajecka M, Pavlicek A, Glotzbach CD, Ballif BC, Jarmuz M, Jurka J, Shaffer LG: Identification of sequence motifs at the breakpoint junctions in three t(1;9)(p36.3;q34) and delineation of mechanisms involved in generating balanced translocations, *Hum Genet* 2006, 120:519-526
36. Patsalis PC, Evangelidou P, Charalambous S, Sismani C: Fluorescence in situ hybridization characterization of apparently balanced translocation reveals cryptic complex chromosomal rearrangements with unexpected level of complexity, *Eur J Hum Genet* 2004, 12:647-653
37. Sismani C, Kitsiou-Tzeli S, Ioannides M, Christodoulou C, Anastasiadou V, Stylianidou G, Papadopoulou E, Kanavakis E,

Kosmaidou-Aravidou Z, Patsalis PC: Cryptic genomic imbalances in patients with de novo or familial apparently balanced translocations and abnormal phenotype, *Mol Cytogenet* 2008, 1:15

38. Backx L, Van Esch H, Melotte C, Kosyakova N, Starke H, Frijns JP, Liehr T, Vermeesch JR: Array painting using microdissected chromosomes to map chromosomal breakpoints, *Cytogenet Genome Res* 2007, 116:158-166

39. Thomas NS, Durkie M, Van Zyl B, Sanford R, Potts G, Youings S, Dennis N, Jacobs P: Parental and chromosomal origin of unbalanced de novo structural chromosome abnormalities in man, *Hum Genet* 2006, 119:444-450

40. Sakharkar MK, Chow VT, Kanguene P: Distributions of exons and introns in the human genome, *In Silico Biol* 2004, 4:387-393

41. Kurahashi H, Shaikh TH, Hu P, Roe BA, Emanuel BS, Budarf ML: Regions of genomic instability on 22q11 and 11q23 as the etiology for the recurrent constitutional t(11;22), *Hum Mol Genet* 2000, 9:1665-1670

42. Kurahashi H, Shaikh TH, Zackai EH, Celle L, Driscoll DA, Budarf ML, Emanuel BS: Tightly clustered 11q23 and 22q11 breakpoints permit PCR-based detection of the recurrent constitutional t(11;22), *Am J Hum Genet* 2000, 67:763-768

43. Zackai EH, Emanuel BS: Site-specific reciprocal translocation, t(11;22) (q23;q11), in several unrelated families with 3:1 meiotic disjunction, *Am J Med Genet* 1980, 7:507-521

44. Kato T, Inagaki H, Yamada K, Kogo H, Ohye T, Kowa H, Nagaoka K, Taniguchi M, Emanuel BS, Kurahashi H: Genetic variation affects de novo translocation frequency, *Science* 2006, 311:971

45. Kurahashi H, Shaikh T, Takata M, Toda T, Emanuel BS: The constitutional t(17;22): another translocation mediated by palindromic AT-rich repeats, *Am J Hum Genet* 2003, 72:733-738

46. Gotter AL, Nimmakayalu MA, Jalali GR, Hacker AM, Vorstman J, Conforto Duffy D, Medne L, Emanuel BS: A palindrome-driven complex rearrangement of 22q11.2 and 8q24.1 elucidated using novel technologies, *Genome Res* 2007, 17:470-481

## BIBLIOGRAFÍA

47. Li MM, Nimmakayalu MA, Mercer D, Andersson HC, Emanuel BS: Characterization of a cryptic 3.3 Mb deletion in a patient with a "balanced t(15;22) translocation" using high density oligo array CGH and gene expression arrays, *Am J Med Genet A* 2008, 146:368-375
48. Giglio S, Calvari V, Gregato G, Gimelli G, Camanini S, Giorda R, Ragusa A, Gueneri S, Selicorni A, Stumm M, Tonnie H, Ventura M, Zollino M, Neri G, Barber J, Wiczorek D, Rocchi M, Zuffardi O: Heterozygous submicroscopic inversions involving olfactory receptor-gene clusters mediate the recurrent t(4;8)(p16;p23) translocation, *Am J Hum Genet* 2002, 71:276-285
49. Gajecka M, Gentles AJ, Tsai A, Chitayat D, Mackay KL, Glotzbach CD, Lieber MR, Shaffer LG: Unexpected complexity at breakpoint junctions in phenotypically normal individuals and mechanisms involved in generating balanced translocations t(1;22)(p36;q13), *Genome Res* 2008, 18:1733-1742
50. Grati FR, Grimi B, Frascoli G, Di Meco AM, Liuti R, Milani S, Trotta A, Dulcetti F, Grosso E, Miozzo M, Maggi F, Simoni G: Confirmation of mosaicism and uniparental disomy in amniocytes, after detection of mosaic chromosome abnormalities in chorionic villi, *Eur J Hum Genet* 2006, 14:282-288
51. Kuliev A, Verlinsky Y: Meiotic and mitotic nondisjunction: lessons from preimplantation genetic diagnosis, *Hum Reprod Update* 2004, 10:401-407
52. Verlinsky Y, Strelchenko N, Kukhareno V, Zech NH, Shkumatov A, Zlatopolsky Z, Kuliev A: Impact of meiotic and mitotic non-disjunction on generation of human embryonic stem cell lines, *Reprod Biomed Online* 2009, 18:120-126
53. Engel E: A fascination with chromosome rescue in uniparental disomy: Mendelian recessive outlaws and imprinting copyrights infringements, *Eur J Hum Genet* 2006, 14:1158-1169
54. Mefford HC, Eichler EE: Duplication hotspots, rare genomic disorders, and common disease, *Curr Opin Genet Dev* 2009, 19:196-204
55. Liehr T, Claussen U, Starke H: Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans, *Cytogenet Genome Res* 2004, 107:55-67

56. Liehr T, Ewers E, Kosyakova N, Klaschka V, Rietz F, Wagner R, Weise A: Handling small supernumerary marker chromosomes in prenatal diagnostics, *Expert Rev Mol Diagn* 2009, 9:317-324
57. Liehr T, Weise A: Frequency of small supernumerary marker chromosomes in prenatal, newborn, developmentally retarded and infertility diagnostics, *Int J Mol Med* 2007, 19:719-731
58. Liehr T, Utine GE, Trautmann U, Rauch A, Kuechler A, Pietrzak J, Bocian E, Kosyakova N, Mrasek K, Boduroglu K, Weise A, Aktas D: Neocentric small supernumerary marker chromosomes (sSMC)--three more cases and review of the literature, *Cytogenet Genome Res* 2007, 118:31-37
59. Fickelscher I, Starke H, Schulze E, Ernst G, Kosyakova N, Mkrtchyan H, MacDermont K, Sebire N, Liehr T: A further case with a small supernumerary marker chromosome (sSMC) derived from chromosome 1--evidence for high variability in mosaicism in different tissues of sSMC carriers, *Prenat Diagn* 2007, 27:783-785
60. Kotzot D: Supernumerary marker chromosomes (SMC) and uniparental disomy (UPD): coincidence or consequence?, *J Med Genet* 2002, 39:775-778
61. Kotzot D: Complex and segmental uniparental disomy updated, *J Med Genet* 2008, 45:545-556
62. Crolla JA: FISH and molecular studies of autosomal supernumerary marker chromosomes excluding those derived from chromosome 15: II. Review of the literature, *Am J Med Genet* 1998, 75:367-381
63. Graf MD, Christ L, Mascarello JT, Mowrey P, Pettenati M, Stetten G, Storto P, Surti U, Van Dyke DL, Vance GH, Wolff D, Schwartz S: Redefining the risks of prenatally ascertained supernumerary marker chromosomes: a collaborative study, *J Med Genet* 2006, 43:660-664
64. Battaglia A: The inv dup (15) or idic (15) syndrome (Tetrasomy 15q), *Orphanet J Rare Dis* 2008, 3:30
65. Wu X, Xiao H: Progress in the detection of human genome structural variations, *Sci China C Life Sci* 2009, 52:560-567

## BIBLIOGRAFÍA

66. Pinkel D, Straume T, Gray JW: Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986, 83:2934-2938
67. Southern EM: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J Mol Biol* 1975, 98:503-517
68. Traeger-Synodinos J: Real-time PCR for prenatal and preimplantation genetic diagnosis of monogenic diseases, *Mol Aspects Med* 2006, 27:176-191
69. Wilhelm J, Pingoud A: Real-time polymerase chain reaction, *ChemBiochem* 2003, 4:1120-1128
70. Bustin SA, Mueller R: Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis, *Clin Sci (Lond)* 2005, 109:365-379
71. Maron JL, Bianchi DW: Prenatal diagnosis using cell-free nucleic acids in maternal body fluids: a decade of progress, *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2007, 145C:5-17
72. Elsea SH, Girirajan S: Smith-Magenis syndrome, *Eur J Hum Genet* 2008, 16:412-421
73. Qiao Y, Liu X, Harvard C, Hildebrand MJ, Rajcan-Separovic E, Holden JJ, Lewis ME: Autism-associated familial microdeletion of Xp11.22, *Clin Genet* 2008, 74:134-144
74. Weksberg R, Stachon AC, Squire JA, Moldovan L, Bayani J, Meyn S, Chow E, Bassett AS: Molecular characterization of deletion breakpoints in adults with 22q11 deletion syndrome, *Hum Genet* 2007, 120:837-845
75. Guenin S, Mauriat M, Pelloux J, Van Wuylswinkel O, Bellini C, Gutierrez L: Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references, *J Exp Bot* 2009, 60:487-493
76. den Dunnen JT, White SJ: MLPA and MAPH: sensitive detection of deletions and duplications, *Curr Protoc Hum Genet* 2006, Chapter 7:Unit 7 14



77. Patsalis PC, Kousoulidou L, Mannik K, Sismani C, Zilina O, Parkel S, Puusepp H, Tonisson N, Palta P, Remm M, Kurg A: Detection of small genomic imbalances using microarray-based multiplex amplifiable probe hybridization, *Eur J Hum Genet* 2007, 15:162-172
78. Patsalis PC, Kousoulidou L, Sismani C, Mannik K, Kurg A: MAPH: from gels to microarrays, *Eur J Med Genet* 2005, 48:241-249
79. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G: Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification, *Nucleic Acids Res* 2002, 30:e57
80. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D: Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors, *Science* 1992, 258:818-821
81. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, Gray JW, Albertson DG: High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays, *Nat Genet* 1998, 20:207-211
82. Slavotinek AM: Novel microdeletion syndromes detected by chromosome microarrays, *Hum Genet* 2008, 124:1-17
83. Koolen DA, Pfundt R, de Leeuw N, Hehir-Kwa JY, Nillesen WM, Neefs I, Scheltinga I, Siermans E, Smeets D, Brunner HG, van Kessel AG, Veltman JA, de Vries BB: Genomic microarrays in mental retardation: a practical workflow for diagnostic applications, *Hum Mutat* 2009, 30:283-292
84. Sharp AJ, Locke DP, McGrath SD, Cheng Z, Bailey JA, Vallente RU, Pertz LM, Clark RA, Schwartz S, Seagraves R, Oseroff VV, Albertson DG, Pinkel D, Eichler EE: Segmental duplications and copy-number variation in the human genome, *Am J Hum Genet* 2005, 77:78-88
85. Senger G, Ludecke HJ, Horsthemke B, Claussen U: Microdissection of banded human chromosomes, *Hum Genet* 1990, 84:507-511
86. Thalhammer S, Langer S, Speicher MR, Heckl WM, Geigl JB: Generation of chromosome painting probes from single chromosomes by

## BIBLIOGRAFÍA

laser microdissection and linker-adaptor PCR, *Chromosome Res* 2004, 12:337-343

87. Fominaya A, Linares C, Loarce Y, Ferrer E: Microdissection and microcloning of plant chromosomes, *Cytogenet Genome Res* 2005, 109:8-14

88. Rice GM, Qi Z, Selzer R, Richmond T, Thompson K, Pauli RM, Yu J: Microdissection-based high-resolution genomic array analysis of two patients with cytogenetically identical interstitial deletions of chromosome 1q but distinct clinical phenotypes, *Am J Med Genet A* 2006, 140:1637-1643

89. Fiegler H, Gribble SM, Burford DC, Carr P, Prigmore E, Porter KM, Clegg S, Crolla JA, Dennis NR, Jacobs P, Carter NP: Array painting: a method for the rapid analysis of aberrant chromosomes using DNA microarrays, *J Med Genet* 2003, 40:664-670

90. Gribble SM, Kalaitzopoulos D, Burford DC, Prigmore E, Selzer RR, Ng BL, Matthews NS, Porter KM, Curley R, Lindsay SJ, Baptista J, Richmond TA, Carter NP: Ultra-high resolution array painting facilitates breakpoint sequencing, *J Med Genet* 2007, 44:51-58

91. Carter NP, Ferguson-Smith MA, Perryman MT, Telenius H, Pelmeur AH, Leversha MA, Glancy MT, Wood SL, Cook K, Dyson HM, et al.: Reverse chromosome painting: a method for the rapid analysis of aberrant chromosomes in clinical cytogenetics, *J Med Genet* 1992, 29:299-307

92. Haider S, Matsumoto R, Kurosawa N, Wakui K, Fukushima Y, Isobe M: Molecular characterization of a novel translocation t(5;14)(q21;q32) in a patient with congenital abnormalities, *J Hum Genet* 2006, 51:335-340

93. Klar J, Asling B, Carlsson B, Ulvsback M, Dellsen A, Strom C, Rhedin M, Forslund A, Anneren G, Ludvigsson JF, Dahl N: RAR-related orphan receptor A isoform 1 (RORa1) is disrupted by a balanced translocation t(4;15)(q22.3;q21.3) associated with severe obesity, *Eur J Hum Genet* 2005, 13:928-934

94. Schule B, Albalwi M, Northrop E, Francis DI, Rowell M, Slater HR, Gardner RJ, Francke U: Molecular breakpoint cloning and gene expression studies of a novel translocation t(4;15)(q27;q11.2) associated with Prader-Willi syndrome, *BMC Med Genet* 2005, 6:18

95. Vandepoele K, Andries V, Van Roy N, Staes K, Vandesompele J, Laureys G, De Smet E, Berx G, Speleman F, van Roy F: A constitutional translocation t(1;17)(p36.2;q11.2) in a neuroblastoma patient disrupts the human NBPF1 and ACCN1 genes, *PLoS One* 2008, 3:e2207
96. Willis TG, Zalcborg IR, Coignet LJ, Wlodarska I, Stul M, Jadayel DM, Bastard C, Treleaven JG, Catovsky D, Silva ML, Dyer MJ: Molecular cloning of translocation t(1;14)(q21;q32) defines a novel gene (BCL9) at chromosome 1q21, *Blood* 1998, 91:1873-1881
97. Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjold M, Ponder BA, Tunnacliffe A: Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer, *Genomics* 1992, 13:718-725
98. Silander K, Saarela J: Whole genome amplification with Phi29 DNA polymerase to enable genetic or genomic analysis of samples of low DNA yield, *Methods Mol Biol* 2008, 439:1-18
99. Korbelt JO, Urban AE, Affourtit JP, Godwin B, Grubert F, Simons JF, Kim PM, Palejev D, Carriero NJ, Du L, Taillon BE, Chen Z, Tanzer A, Saunders AC, Chi J, Yang F, Carter NP, Hurles ME, Weissman SM, Harkins TT, Gerstein MB, Egholm M, Snyder M: Paired-end mapping reveals extensive structural variation in the human genome, *Science* 2007, 318:420-426
100. Mardis ER: Next-generation DNA sequencing methods, *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2008, 9:387-402
101. Mardis ER: The impact of next-generation sequencing technology on genetics, *Trends Genet* 2008, 24:133-141
102. Chen W, Kalscheuer V, Tzschach A, Menzel C, Ullmann R, Schulz MH, Erdogan F, Li N, Kijas Z, Arkesteijn G, Pajares IL, Goetz-Sothmann M, Heinrich U, Rost I, Dufke A, Grasshoff U, Glaeser B, Vingron M, Ropers HH: Mapping translocation breakpoints by next-generation sequencing, *Genome Res* 2008, 18:1143-1149
103. Campbell PJ, Stephens PJ, Pleasance ED, O'Meara S, Li H, Santarius T, Stebbings LA, Leroy C, Edkins S, Hardy C, Teague JW, Menzies A, Goodhead I, Turner DJ, Clee CM, Quail MA, Cox A, Brown C, Durbin R, Hurles ME, Edwards PA, Bignell GR, Stratton MR, Futreal PA: Identification of somatically acquired rearrangements in cancer using

## BIBLIOGRAFÍA

genome-wide massively parallel paired-end sequencing, *Nat Genet* 2008, 40:722-729

104. Allanson JE, Biesecker LG, Carey JC, Hennekam RC: Elements of morphology: introduction, *Am J Med Genet A* 2009, 149A:2-5

105. Hunter A, Frias JL, Gillessen-Kaesbach G, Hughes H, Jones KL, Wilson L: Elements of morphology: standard terminology for the ear, *Am J Med Genet A* 2009, 149A:40-60

106. Biesecker LG, Aase JM, Clericuzio C, Gurrieri F, Temple IK, Toriello H: Elements of morphology: standard terminology for the hands and feet, *Am J Med Genet A* 2009, 149A:93-127

107. Carey JC, Cohen MM, Jr., Curry CJ, Devriendt K, Holmes LB, Verloes A: Elements of morphology: standard terminology for the lips, mouth, and oral region, *Am J Med Genet A* 2009, 149A:77-92

108. Hennekam RC, Cormier-Daire V, Hall JG, Mehes K, Patton M, Stevenson RE: Elements of morphology: standard terminology for the nose and philtrum, *Am J Med Genet A* 2009, 149A:61-76

109. Allanson JE, Cunniff C, Hoyme HE, McGaughran J, Muenke M, Neri G: Elements of morphology: standard terminology for the head and face, *Am J Med Genet A* 2009, 149A:6-28

110. Hall BD, Graham JM, Jr., Cassidy SB, Opitz JM: Elements of morphology: standard terminology for the periorbital region, *Am J Med Genet A* 2009, 149A:29-39

111. Luckasson R CD, Polloway EA, Reiss S, Schalock RL, Snell ME, Spitalnik DM, Stark JA.: *Mental retardation: Definition, classification, and system of supports*. Edited by Washington, DC, American Association on Mental Retardation, 1992, p

112. Fredericks DW, Williams WL: New definition of mental retardation for the American Association of Mental Retardation, *Image J Nurs Sch* 1998, 30:53-56

113. Schalock RL, Stark JA, Snell ME, Coulter DL, Polloway EA, Luckasson R, Reiss S, Spitalnik DM: The changing conception of mental retardation: implications for the field, *Ment Retard* 1994, 32:181-193

114. Basel-Vanagaite L: Clinical approaches to genetic mental retardation, *Isr Med Assoc J* 2008, 10:821-826
115. Edelman L, Hirschhorn K: Clinical utility of array CGH for the detection of chromosomal imbalances associated with mental retardation and multiple congenital anomalies, *Ann N Y Acad Sci* 2009, 1151:157-166
116. Curry CJ, Stevenson RE, Aughton D, Byrne J, Carey JC, Cassidy S, Cunniff C, Graham JM, Jr., Jones MC, Kaback MM, Moeschler J, Schaefer GB, Schwartz S, Tarleton J, Opitz J: Evaluation of mental retardation: recommendations of a Consensus Conference: American College of Medical Genetics, *Am J Med Genet* 1997, 72:468-477
117. Tomblin JB, Records NL, Buckwalter P, Zhang X, Smith E, O'Brien M: Prevalence of specific language impairment in kindergarten children, *J Speech Lang Hear Res* 1997, 40:1245-1260
118. Bishop DV: Genes, cognition, and communication: insights from neurodevelopmental disorders, *Ann N Y Acad Sci* 2009, 1156:1-18
119. Highly significant linkage to the SLI1 locus in an expanded sample of individuals affected by specific language impairment, *Am J Hum Genet* 2004, 74:1225-1238
120. Nimer SD: Myelodysplastic syndromes, *Blood* 2008, 111:4841-4851
121. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D, Ohyashiki K, Toyama K, Aul C, Mufti G, Bennett J: International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes, *Blood* 1997, 89:2079-2088
122. Mohamedali AM, Smith AE, Gaken J, Lea NC, Mian SA, Westwood NB, Strupp C, Gattermann N, Germing U, Mufti GJ: Novel TET2 Mutations Associated With UPD4q24 in Myelodysplastic Syndrome, *J Clin Oncol* 2009,
123. Langemeijer SM, Kuiper RP, Berends M, Knops R, Aslanyan MG, Massop M, Stevens-Linders E, van Hoogen P, van Kessel AG, Raymakers RA, Kamping EJ, Verhoef GE, Verburgh E, Hagemeijer A, Vandenbergh P, de Witte T, van der Reijden BA, Jansen JH: Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes, *Nat Genet* 2009,

## BIBLIOGRAFÍA

124. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Masse A, Kosmider O, Le Couedic JP, Robert F, Alberdi A, Lecluse Y, Plo I, Dreyfus FJ, Marzac C, Casadevall N, Lacombe C, Romana SP, Dessen P, Soulier J, Viguie F, Fontenay M, Vainchenker W, Bernard OA: Mutation in TET2 in myeloid cancers, *N Engl J Med* 2009, 360:2289-2301
125. Abdel-Wahab O, Mullally A, Hedvat C, Garcia-Manero G, Patel J, Wadleigh M, Malinge S, Yao J, Kilpivaara O, Bhat R, Huberman K, Thomas S, Dolgalev I, Heguy A, Paietta E, Le Beau MM, Beran M, Tallman MS, Ebert BL, Kantarjian HM, Stone RM, Gilliland DG, Crispino JD, Levine RL: Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies, *Blood* 2009,
126. Jankowska AM, Szpurka H, Tiu RV, Makishima H, Afalse M, Huh J, O'Keefe CL, Ganetzky R, McDevitt MA, Maciejewski JP: Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms, *Blood* 2009, 113:6403-6410
127. Levine RL, Carroll M: A common genetic mechanism in malignant bone marrow diseases, *N Engl J Med* 2009, 360:2355-2357
128. Resta RG: Defining and redefining the scope and goals of genetic counseling, *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2006, 142C:269-275
129. Beauchamp T CJ: Principles of Biomedical Ethics. Edited by New York, Oxford university Press, 1994, p
130. Osoegawa K, Mammoser AG, Wu C, Frengen E, Zeng C, Catanese JJ, de Jong PJ: A bacterial artificial chromosome library for sequencing the complete human genome, *Genome Res* 2001, 11:483-496
131. Zhou RN, Hu ZM: The development of chromosome microdissection and microcloning technique and its applications in genomic research, *Curr Genomics* 2007, 8:67-72
132. Engelen JJ, Marcelis CL, Alofs MG, Loneus WH, Pulles-Heintzberger CF, Hamers AJ: De novo "pure" partial trisomy (6)(p22.1-->pter) in a chromosome 15 with an enlarged satellite, identified by microdissection, *Am J Med Genet* 2001, 99:48-53

133. Dominguez MG, Wong-Ley LE, Rivera H, Vasquez AI, Ramos AL, Sanchez-Urbina R, Morales JA, Figuera LE: Pure partial trisomy 6p due to a familial insertion (16;6)(p12;p21.2p23), *Ann Genet* 2003, 46:45-48
134. Ng D, Mowrey P, Ragoussis J, Mirza G, Coll E, Di Fazio MP, Turner C, Levin SW: Molecularly defined interstitial tandem duplication 6p case with mild manifestations, *Am J Med Genet* 2001, 103:320-325
135. Villa A, Gomez EG, Rodriguez L, Rastrollo RH, Martinez Tallo ME, Martinez-Frias ML: Interstitial tandem duplication of 6p: a case with partial trisomy (6)(p12p21.3), *Am J Med Genet* 2000, 90:369-375
136. Hehr U, Muenke M: Craniosynostosis syndromes: from genes to premature fusion of skull bones, *Mol Genet Metab* 1999, 68:139-151
137. Villa O, Del Campo M, Salido M, Gener B, Astier L, Del Valle J, Gallastegui F, Perez-Jurado LA, Sole F: Small supernumerary marker chromosome causing partial trisomy 6p in a child with craniosynostosis, *Am J Med Genet A* 2007, 143A:1108-1113
138. Blennow E, Tillberg E: Small extra ring chromosome derived from chromosome 10p: clinical report and characterisation by FISH, *J Med Genet* 1996, 33:399-402
139. Liehr T, Stumm M, Wegner RD, Bhatt S, Hickmann P, Patsalis PC, Meins M, Morlot S, Klaschka V, Ewers E, Hinreiner S, Mrasek K, Kosyakova N, Cai WW, Cheung SW, Weise A: 10p11.2 to 10q11.2 is a yet unreported region leading to unbalanced chromosomal abnormalities without phenotypic consequences, *Cytogenet Genome Res* 2009, 124:102-105
140. David L, Mallet C, Keramidas M, Lamande N, Gasc JM, Dupuis-Girod S, Plauchu H, Feige JJ, Bailly S: Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor, *Circ Res* 2008, 102:914-922
141. David L, Mallet C, Mazerbourg S, Feige JJ, Bailly S: Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells, *Blood* 2007, 109:1953-1961
142. Hino J, Kangawa K, Matsuo H, Nohno T, Nishimatsu S: Bone morphogenetic protein-3 family members and their biological functions, *Front Biosci* 2004, 9:1520-1529

## BIBLIOGRAFÍA

143. Kaihara S, Bessho K, Okubo Y, Sonobe J, Komatsu Y, Miura M, Miyatake S, Nakao K, Iizuka T: Over expression of bone morphogenetic protein-3b (BMP-3b) using an adenoviral vector promote the osteoblastic differentiation in C2C12 cells and augment the bone formation induced by bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) in rats, *Life Sci* 2003, 72:1683-1693
144. Majumdar MK, Wang E, Morris EA: BMP-2 and BMP-9 promotes chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcomes the inhibitory effect of IL-1, *J Cell Physiol* 2001, 189:275-284
145. Iwase S, Januma A, Miyamoto K, Shono N, Honda A, Yanagisawa J, Baba T: Characterization of BHC80 in BRAF-HDAC complex, involved in neuron-specific gene repression, *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 322:601-608
146. Klajn A, Ferrai C, Stucchi L, Prada I, Podini P, Baba T, Rocchi M, Meldolesi J, D'Alessandro R: The rest repression of the neurosecretory phenotype is negatively modulated by BHC80, a protein of the BRAF/HDAC complex, *J Neurosci* 2009, 29:6296-6307
147. Lan F, Collins RE, De Cegli R, Alpatov R, Horton JR, Shi X, Gozani O, Cheng X, Shi Y: Recognition of unmethylated histone H3 lysine 4 links BHC80 to LSD1-mediated gene repression, *Nature* 2007, 448:718-722
148. Bartsch O, Wuyts W, Van Hul W, Hecht JT, Meinecke P, Hogue D, Werner W, Zabel B, Hinkel GK, Powell CM, Shaffer LG, Willems PJ: Delineation of a contiguous gene syndrome with multiple exostoses, enlarged parietal foramina, craniofacial dysostosis, and mental retardation, caused by deletions in the short arm of chromosome 11, *Am J Hum Genet* 1996, 58:734-742
149. Potocki L, Shaffer LG: Interstitial deletion of 11(p11.2p12): a newly described contiguous gene deletion syndrome involving the gene for hereditary multiple exostoses (EXT2), *Am J Med Genet* 1996, 62:319-325
150. Wakui K, Gregato G, Ballif BC, Glotzbach CD, Bailey KA, Kuo PL, Sue WC, Sheffield LJ, Irons M, Gomez EG, Hecht JT, Potocki L, Shaffer LG: Construction of a natural panel of 11p11.2 deletions and further delineation of the critical region involved in Potocki-Shaffer syndrome, *Eur J Hum Genet* 2005, 13:528-540



151. Fisher SE, Scharff C: FOXP2 as a molecular window into speech and language, *Trends Genet* 2009, 25:166-177
152. Poot M, Beyer V, Schwaab I, Damatova N, Van't Slot R, Prothero J, Holder SE, Haaf T: Disruption of CNTNAP2 and additional structural genome changes in a boy with speech delay and autism spectrum disorder, *Neurogenetics* 2009,
153. Vernes SC, Newbury DF, Abrahams BS, Winchester L, Nicod J, Groszer M, Alarcon M, Oliver PL, Davies KE, Geschwind DH, Monaco AP, Fisher SE: A functional genetic link between distinct developmental language disorders, *N Engl J Med* 2008, 359:2337-2345
154. Osborne LR, Mervis CB: Rearrangements of the Williams-Beuren syndrome locus: molecular basis and implications for speech and language development, *Expert Rev Mol Med* 2007, 9:1-16
155. Somerville MJ, Mervis CB, Young EJ, Seo EJ, del Campo M, Bamforth S, Peregrine E, Loo W, Lilley M, Perez-Jurado LA, Morris CA, Scherer SW, Osborne LR: Severe expressive-language delay related to duplication of the Williams-Beuren locus, *N Engl J Med* 2005, 353:1694-1701
156. Van der Aa N, Rooms L, Vandeweyer G, van den Ende J, Reyniers E, Fichera M, Romano C, Delle Chiaie B, Mortier G, Menten B, Destree A, Maystadt I, Mannik K, Kurg A, Reimand T, McMullan D, Oley C, Brueton L, Bongers EM, van Bon BW, Pfund R, Jacquemont S, Ferrarini A, Martinet D, Schrandt-Stumpel C, Stegmann AP, Frints SG, de Vries BB, Ceulemans B, Kooy RF: Fourteen new cases contribute to the characterization of the 7q11.23 microduplication syndrome, *Eur J Med Genet* 2009, 52:94-100
157. Ballesta F, Hernandez JV: [Deafness and anomalies of the lacrimal duct in a family with translocation t(17;22)], *J Genet Hum* 1976, 24 Suppl:221-225
158. McDonald-McGinn DM, Kirschner R, Goldmuntz E, Sullivan K, Eicher P, Gerdes M, Moss E, Solot C, Wang P, Jacobs I, Handler S, Knightly C, Heher K, Wilson M, Ming JE, Grace K, Driscoll D, Pasquariello P, Randall P, Larossa D, Emanuel BS, Zackai EH: The Philadelphia story: the 22q11.2 deletion: report on 250 patients, *Genet Couns* 1999, 10:11-24
159. Digilio MC, Angioni A, De Santis M, Lombardo A, Giannotti A, Dallapiccola B, Marino B: Spectrum of clinical variability in familial deletion

## BIBLIOGRAFÍA

22q11.2: from full manifestation to extremely mild clinical anomalies, *Clin Genet* 2003, 63:308-313

160. Ianakiev P, Kilpatrick MW, Toudjarska I, Basel D, Beighton P, Tsipouras P: Split-hand/split-foot malformation is caused by mutations in the p63 gene on 3q27, *Am J Hum Genet* 2000, 67:59-66

161. Brunner HG, Hamel BC, Van Bokhoven H: The p63 gene in EEC and other syndromes, *J Med Genet* 2002, 39:377-381

162. Elliott AM, Evans JA: Genotype-phenotype correlations in mapped split hand foot malformation (SHFM) patients, *Am J Med Genet A* 2006, 140:1419-1427

163. Rinne T, Brunner HG, van Bokhoven H: p63-associated disorders, *Cell Cycle* 2007, 6:262-268

164. Bentrop J, Marx M, Schattschneider S, Rivera-Milla E, Bastmeyer M: Molecular evolution and expression of zebrafish St8SialIII, an alpha-2,8-sialyltransferase involved in myotome development, *Dev Dyn* 2008, 237:808-818

165. Krasnewich D, O'Brien K, Sparks S: Clinical features in adults with congenital disorders of glycosylation type Ia (CDG-Ia), *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2007, 145C:302-306

166. Bashir A, Volik S, Collins C, Bafna V, Raphael BJ: Evaluation of paired-end sequencing strategies for detection of genome rearrangements in cancer, *PLoS Comput Biol* 2008, 4:e1000051

167. Mallela J, Yang J, Shariat-Madar Z: Prolylcarboxypeptidase: a cardioprotective enzyme, *Int J Biochem Cell Biol* 2009, 41:477-481

168. Wallingford N, Perroud B, Gao Q, Coppola A, Gyengesi E, Liu ZW, Gao XB, Diament A, Haus KA, Shariat-Madar Z, Mahdi F, Wardlaw SL, Schmaier AH, Warden CH, Diano S: Prolylcarboxypeptidase regulates food intake by inactivating alpha-MSH in rodents, *J Clin Invest* 2009, 119:2291-2303

169. Agranat-Meged AN, Deitcher C, Goldzweig G, Leibenson L, Stein M, Galili-Weisstub E: Childhood obesity and attention deficit/hyperactivity disorder: a newly described comorbidity in obese hospitalized children, *Int J Eat Disord* 2005, 37:357-359

170. Agranat-Meged A, Ghanadri Y, Eisenberg I, Ben Neriah Z, Kieselstein-Gross E, Mitrani-Rosenbaum S: Attention deficit hyperactivity disorder in obese melanocortin-4-receptor (MC4R) deficient subjects: a newly described expression of MC4R deficiency, *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2008, 147B:1547-1553
171. Catania A: Neuroprotective actions of melanocortins: a therapeutic opportunity, *Trends Neurosci* 2008, 31:353-360
172. Ivanov DV, Tyazhelova TV, Lemonnier L, Kononenko N, Pestova AA, Nikitin EA, Prevarskaya N, Skryma R, Panchin YV, Yankovsky NK, Baranova AV: A new human gene KCNRG encoding potassium channel regulating protein is a cancer suppressor gene candidate located in 13q14.3, *FEBS Lett* 2003, 539:156-160
173. Lerner M, Corcoran M, Cepeda D, Nielsen ML, Zubarev R, Ponten F, Uhlen M, Hober S, Grander D, Sangfelt O: The RBCC gene RFP2 (Leu5) encodes a novel transmembrane E3 ubiquitin ligase involved in ERAD, *Mol Biol Cell* 2007, 18:1670-1682
174. Arcos-Burgos M, Castellanos FX, Lopera F, Pineda D, Palacio JD, Garcia M, Henao GC, Palacio LG, Berg K, Bailey-Wilson JE, Muenke M: Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD): feasibility of linkage analysis in a genetic isolate using extended and multigenerational pedigrees, *Clin Genet* 2002, 61:335-343
175. Dopheide JA, Pliszka SR: Attention-deficit-hyperactivity disorder: an update, *Pharmacotherapy* 2009, 29:656-679
176. Smith AK, Mick E, Faraone SV: Advances in genetic studies of attention-deficit/hyperactivity disorder, *Curr Psychiatry Rep* 2009, 11:143-148
177. Sole F, Luno E, Sanzo C, Espinet B, Sanz GF, Cervera J, Calasanz MJ, Cigudosa JC, Milla F, Ribera JM, Bureo E, Marquez ML, Arranz E, Florensa L: Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes, *Haematologica* 2005, 90:1168-1178
178. Haase D: Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes, *Ann Hematol* 2008, 87:515-526
179. Tsubosa Y, Sugihara H, Mukaisho K, Kamitani S, Peng DF, Ling ZQ, Tani T, Hattori T: Effects of degenerate oligonucleotide-primed

## BIBLIOGRAFÍA

polymerase chain reaction amplification and labeling methods on the sensitivity and specificity of metaphase- and array-based comparative genomic hybridization, *Cancer Genet Cytogenet* 2005, 158:156-166

180. Pinard R, de Winter A, Sarkis GJ, Gerstein MB, Tartaro KR, Plant RN, Egholm M, Rothberg JM, Leamon JH: Assessment of whole genome amplification-induced bias through high-throughput, massively parallel whole genome sequencing, *BMC Genomics* 2006, 7:216

181. Kubickova S, Cernohorska H, Musilova P, Rubes J: The use of laser microdissection for the preparation of chromosome-specific painting probes in farm animals, *Chromosome Res* 2002, 10:571-577

## ABREVIATURAS

**ADN** Ácido dextriribonucleico

**ADNc** Ácido desoxirribonucleico copia, a partir de la retrotranscripción de RNA

**ADNg** Ácido dextriribonucleico genómico

**ARN** Ácido ribonucleico

**BAC** *Bacterial artificial chromosome*

**CCR** *Cryptic chromosomal rearrangement*

**HGC** Hibridación genómica comparada

**CI** Coeficiente intelectual

**FISH** Hibridación in situ fluorescente

**FIV** Fecundación in vitro

**LA** Líquido amniótico

**LOH** *Lost of heterozygosity* (pérdida de heterocigosidad)

**MLPA** *Multiplex ligation-dependent probe amplification*

**PCR** Reacción en cadena de la polimerasa

**RM** Retraso mental

**SMC** *Small marker chromosome*

**TDAH** Trastorno por déficit de atención e hiperactividad

**TEL** Trastorno específico del lenguaje

**UPD** *Uniparental disomy* (disomía uniparental)



## GLOSARIO DE TÉRMINOS CLÍNICOS

**Angioma:** Neoplasia generalmente benigna de los vasos sanguíneos.

**Anosmia:** Ausencia de olfato.

**Anteversión nasal:** Inclinación de la nariz hacia delante, en la que la punta de la nariz está localizada por encima de la base nasal.

**Antihélix (orejas):** Zona exterior curva de las orejas que llena el espacio que separa la hélix (borde externo prominente de la oreja) de la fosa auricular.

**Blefarofimosis palpebral:** Estrechez anormal de las aberturas palpebrales en dirección horizontal, causada por desplazamiento hacia fuera de los cantos internos.

**Braquicefalia:** Deformidad craneal que consiste en cabeza corta, ancha y aplanada a nivel occipital.

**Clinodactilia:** Desviación de los dedos en el plano transversal, es decir, curvado en el plano de la palma de la mano.

**Craniosinostosis:** Cierre prematuro de una o varias suturas craneales.

**Displasia ectodérmica:** Anomalías en el desarrollo del ectodermo, afectando principalmente a piel, glándulas sudoríparas y lacrimales, pelo, dientes y uñas.

**Ectrodactilia:** Anomalía del desarrollo fetal que se caracteriza por la ausencia total o parcial de uno o varios dedos de manos o pies.

**Fisura palatina:** Paladar hendido, apertura en la parte superior del paladar que implica comunicación directa entre boca y nariz.

**Hendiduras palpebrales:** Aberturas longitudinales entre los párpados. Cuando los ojos están abiertos son de igual tamaño.

**Hipertelorismo:** Aumento entre la distancia intercantal (interorbitaria).

**Hipotelorismo:** Reducción entre la distancia intercantal (interorbitaria).

**Kifoescoliosis:** Encorvamiento y giro de la columna vertebral.

**Labio leporino:** Apertura uni o bilateral entre el labio superior y la nariz.

**Micrognatia:** Mandíbula pequeña.

**Narinas:** Aberturas de la nariz, desde el punto en que se bifurcan hasta el exterior.

**Oligoamnios:** Disminución de la cantidad de líquido amniótico.

**Plagiocefalia:** Aplastamiento lateral del cráneo.

**Puente nasal:** Ensanchamiento de la parte superior de la nariz.



**ANEXO**

Villa O, Del Campo M, Salido M, Gener B, Astier L, Del Valle J, Gallastegui F, Pérez-Jurado LA, Solé F. [Small supernumerary marker chromosome causing partial trisomy 6p in a child with craniosynostosis.](#)  
Am J Med Genet A. 2007 May 15;143A(10):1108-13.

